



Institut für Biologische Informationsverarbeitung

***Identifizierung regulatorischer Regionen
in der partikulären Guanylatzyklase
aus Photorezeptoraußensegmenten
ROS-GC1***

Christian Michael Lange

***Identifizierung regulatorischer Regionen
in der partikulären Guanylatzyklase
aus Photorezeptoraußensegmenten
ROS-GC1***

Christian Michael Lange

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3719
ISSN 0944-2952
Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3719
D 38 (Diss. Universität Köln, 1999)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

1	Einleitung	1
1.1	Signalverarbeitung in den Lichtsinneszellen der Wirbeltiernetzhaut	1
1.1.1	Aufbau der Lichtsinneszellen der Netzhaut	1
1.1.2	Die Lichtantwort der Sehzellen	2
1.1.3	Die Signaltransduktionskaskade	3
1.1.4	Die Lichtadaptation	5
1.2	Adenylat- und Guanylatzyklen	7
1.2.1	Adenylatzyklen	7
1.2.2	Lösliche Guanylatzyklen	8
1.2.3	Peptidrezeptoren und neuronale Guanylatzyklen	8
1.3	Die Regulation der Guanylatzyklen in Photorezeptoraußensegmenten	14
1.4	Zielsetzung und experimenteller Ansatz	18
1.4.1	Auswahl der untersuchten Domänen der ROS-GC1	18
2	Material und Methoden	21
2.1	Materialien und Chemikalien	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Geräte und Materialien	22
2.1.3	Lösungen und Puffer	23
2.1.4	Bakterienstämme	23
2.1.5	Plasmide	23
2.1.6	Molekulargewichtsstandards	24
2.2	Allgemeine Methoden	25
2.2.1	Bestimmung von Protein- und Peptidkonzentrationen	25
2.2.2	Elektrophoretische Trennung und Analyse von Proteinen	26
2.2.3	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.4	Reinigung von Plasmid-DNA	27
2.2.5	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	29
2.2.6	Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	29
2.2.7	Sequenzierung von DNA	29
2.2.8	Modifizierung von DNA	30
2.2.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	31
2.2.10	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	31
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.12	Kulturbedingungen für HEK293-Zellen	32
2.2.13	Ca ²⁺ -Puffer	33
2.3	Peptidsynthese	34
2.3.1	Synthese einer Peptidbibliothek aus ROS-GC1	34
2.3.2	Synthese einzelner Peptide	35

2.4	Expression und Reinigung von rekombinantem GCAP-1	35
2.4.1	Konstruktion des Expressionsplasmids	35
2.4.2	Expression	36
2.4.3	Solubilisierung des rekombinanten GCAP-1	36
2.4.4	Gelfiltration	36
2.4.5	Hydroxylapatitchromatographie	37
2.5	Massenspektrometrie	37
2.6	Analytische HPLC	37
2.7	Heterologe Expression der ROS-GC1 in HEK293-Zellen	38
2.7.1	Konstruktion der Expressionsplasmide	38
2.7.2	Transiente Expression	38
2.7.3	Immuncytochemische Färbung	38
2.7.4	Präparation von Zellmembranen	39
2.8	Präparation von Sehtäbchenaußensegmenten	40
2.9	Bestimmung der Guanylatzyklaseaktivität	41
2.9.1	Präparation gewaschener ROS-Membranen	42
2.9.2	Durchmusterung der Peptidbibliothek aus ROS-GC1	42
2.10	Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie	43
2.10.1	Einführung	43
2.10.2	Immobilisierung von Proteinen und Peptiden	43
2.10.3	Durchmusterung der Peptidbibliothek aus ROS-GC1	44
2.10.4	Sonstige SPR-spektroskopische Messungen	45
2.11	Affinitätschromatographie	46
2.11.1	Herstellung von Peptidaffinitäts-Sepharosen	46
2.11.2	Herstellung von solubilisierten ROS	46
2.11.3	Herstellung eines Dunkelextraktes löslicher Proteine aus ROS	47
2.11.4	Herstellung von solubilisierten ROS-Membranen	47
2.11.5	Durchführung der Bindungsexperimente	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Herstellung und Charakterisierung von rekombinantem GCAP-1	49
3.1.1	Verlauf der Reinigung	50
3.1.2	Charakterisierung des gereinigten rekombinanten GCAP-1	51
3.2	Synthese der Peptidbibliothek	54
3.3	Durchmusterung der Peptidbibliothek - Identifizierung inhibitorischer Peptide	55
3.4	Durchmusterung der Peptidbibliothek - Identifizierung GCAP-1-bindender Peptide ..	58
3.5	Einfluß der identifizierten Peptide auf die Aktivität der ROS-GC	61
3.5.1	Konzentrationsabhängige Inhibierung der GC-Aktivität in ganzen ROS	61

3.5.2	Konzentrationsabhängige Inhibierung der GC-Aktivität in gewaschenen ROS-Membranen	66
3.5.3	Aufhebung des Einflusses der Peptide # 5 und #36 durch GCAP-1	68
3.6	Bindung der identifizierten Peptide an Zielproteine.....	69
3.6.1	Affinitätschromatographie.....	69
3.6.2	Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie	75
3.7	Heterologe Expression und Charakterisierung der ROS-GC1 und ihrer mutierten Formen	81
3.7.1	Optimierung der Expressionsbedingungen	82
3.7.2	Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1	82
3.7.3	Charakterisierung der Deletionsmutanten.....	84
3.7.4	Charakterisierung der Punktmutanten LCA (F ⁵⁷⁰ S) und LCActr (F ⁶⁴⁷ S).....	87
4	Diskussion	89
4.1	Probleme des experimentellen Ansatzes	89
4.2	Die identifizierten Regionen der ROS-GC1	92
4.2.1	Die Eigenschaften der identifizierten Peptide.....	92
4.2.2	Die Eigenschaften der untersuchten mutierten Formen der ROS-GC1	95
4.2.3	Die Primärstrukturen der identifizierten Regionen.....	96
4.2.4	Die α 3- β 4-Loop-Region aus der CCD (SOKAL et al., 1999a).....	100
4.3	Modell für die Regulation der ROS-GC1	102
4.4	Ausblick	107
5	Literatur.....	109
	Anhang	
A	Der Ein-Buchstabenkode für Aminosäuren	A - 1
B	Die Primärstruktur der ROS-GC1	A - 1
C	DNA-Primer	A - 2
D	Die Sequenzen der eingesetzten Peptide	A - 3
E	Charakterisierung der Peptide aus der Peptidbibliothek	A - 4

ABCR	ATP Binding-cassette Transporter (rim-Protein)
AC	Adenylatzyklase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AS	Aminosäuren
AU	Absorptionseinheiten (Extinktion)
BES	N,N-Bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
Br ₂ BAPTA	1,2-Bis[2-amino-5-bromophenoxy]ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
[Ca ²⁺]	freie Ca ²⁺ -Konzentration
CCD	katalytische Domäne (der partikulären GC)
cDNA	komplementäre DNA (DNA-Kopie von messenger-RNA)
cGMP	Guanosin-3':5'-monophosphat (zyklisches Guanosinmonophosphat)
CHA	Cyclohexylamin
CNG	Zyklisch-Nukelotid-gesteuert
CNC	Zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Kationenkanal
CORD	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie
C-T	C-Terminus (der partikulären GC)
DD	putative Dimerisierungsdomäne (der partikulären GC)
DEX	Dunkelextrakt der löslichen Proteine aus ROS
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynucleosid-5'-triphosphat(e)
DTT	DL-1,4-Dithiothreitol
EC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung
ECD	extrazelluläre Domäne (der partikulären GC)
EDTA	1,2-Diaminoethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis[2-aminoethoxy]ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E _λ	Extinktion bei der Wellenlänge λ
Fmoc-	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
g	Einheit der Beschleunigung (9,81 m s ⁻²)
GARP-1 /-2	Glutamic Acid-rich Protein 1 / 2
GC	Guanylatzyklase(n)
GCAP	natives guanylatzyklaseaktivierendes Protein der Photorezeptoraußensegmente
GCAP-1 /-2 /-3	Guanylate Cyclase-activating Protein 1 / 2 / 3
GCIP	Guanylate Cyclase-inhibiting Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GRK1	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor-Kinase Typ 1 (Rhodopsinkinase)
G _T	Transducin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazino]ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckchromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Inhibierung
JMD	Juxtamembrandomäne (der partikulären GC)

KHD	Kinase-Homologiedomäne (der partikulären GC)
LCA	Leber'sche kongenitale Amaurose
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix-Laserdesorptions-Flugzeit(-Massenspektrometrie)
M _{app}	apparente Molmasse
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
min	Minute(n)
M _r	relatives Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichtsausschlußgrenze (cut-off)
NMT	N-Myristoyltransferase 1 (<i>S.cerevisiae</i>)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
II	mittlerer Porendurchmesser
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase Typ 6 (photorezeptorspezifisch)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rh	Rhodopsin
Rh*	meta-Rhodopsin II (photoaktiviertes Rhodopsin)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Sehstäbchenaußensegmente
ROS-GC	native partikuläre Guanylatzyklase der Photorezeptoraußensegmente
ROS-GC1 /-GC2	retinale Guanylatzyklase 1 / 2 (retGC-1 /-2; GC-E /-F)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiaminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
TM	Transmembrandomäne (der partikulären GC)
Tris	2-Amino-2-[hydroxymethyl]-1,3-propandiol
U	unit (Einheiten für Enzymaktivität)
UV/VIS	Ultraviolette und sichtbares Licht
XLRP	heterosomal erbliche Retinitis Pigmentosa
z.A.	zur Analyse
Zaprinast	1,4-Dihydro-5-[2-propoxyphenyl]-7H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-on
Ø	Durchmesser

Zusammenfassung

Die partikuläre Guanylatzyklase ROS-GC1 ist die vorherrschende Isoform der Guanylatzyklase in den Photorezeptoraußensegmenten der Wirbeltiere (ROS-GC). Sie ist eines der zentralen Elemente in der Signaltransduktionskaskade der Lichtantwort. Die ROS-GC1 ist das Prototyp-Protein der neuronalen Unterfamilie der partikulären Guanylatzyklasen. Ihre Regulation durch das Ca^{2+} -Sensorprotein GCAP-1 erfolgt durch einen neuartigen, noch unverstandenen Mechanismus.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Durchmusterung einer Peptidbibliothek, die ausgewählte Domänen der ROS-GC1 abbildet, Regionen identifiziert, die eine Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1 haben. Zwei dieser Regionen ($\text{M}^{501} - \text{L}^{512}$, repräsentiert durch das Peptid # 5, und $\text{D}^{563} - \text{R}^{574}$, repräsentiert durch das Peptid #36) wurden durch Peptid- und Mutagenesestudien genauer charakterisiert. Diese beiden Regionen sind Teile der Juxtamembrandomäne der ROS-GC1 und sind damit in der Primärstruktur mehr als 300 AS von der katalytischen Domäne entfernt. Die Deletion dieser Regionen führt zu einer erheblich reduzierten Aktivität der ROS-GC1; eine Aktivierung der entsprechenden Mutanten durch GCAP-1 ist kaum noch (# 5) bzw. nicht mehr (#36) möglich. Im Rahmen eines vorgeschlagenen Modells für die Regulation der ROS-GC1 werden für die beiden Regionen aufgrund aller erhaltenen Ergebnisse die folgenden Funktionen postuliert:

- Die Region $\text{M}^{501} - \text{L}^{512}$ (# 5) verankert die ROS-GC1 an Elementen des Zytoskeletts, wahrscheinlich an Tubulin. Diese Verankerung ist notwendig, damit die Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderungen von GCAP-1 im funktionellen Komplex der ROS-GC1 auf die katalytische Domäne übertragen werden können.
- Die Region $\text{D}^{563} - \text{R}^{574}$ (#36) ist als wahrscheinliche Dimerisierungsregion ein zentrales Strukturelement im funktionellen Komplex der ROS-GC1. Wahrscheinlich bildet diese Region auch einen Teil einer Kontaktfläche für GCAP-1.

1 Einleitung

1.1 Signalverarbeitung in den Lichtsinneszellen der Wirbeltiernetzhaut

Die Fähigkeit, Licht wahrzunehmen, findet sich in allen Reichen der Lebewesen. In drei Stämmen des Tierreichs (Arthropoden, Mollusken, Vertebraten) haben sich komplexe Organe zur zeitlich und räumlich hochaufgelösten Wahrnehmung von Lichtreizen ausgebildet, die Augen. Im Linsenauge der Wirbeltiere wird einfallendes Licht vom dioptrischen Apparat auf die Netzhaut fokussiert und dort von einer Klasse spezialisierter sensorischer Neurone, den Photorezeptoren, detektiert. Das Signal wird über die glutamatergen Synapsen der Photorezeptoren in der äußeren plexiformen Schicht an nachgeschaltete Nervenzellen weitervermittelt, in der Netzhaut zum Teil prozessiert und über den Sehnerv an das Gehirn weitergeleitet (zur Übersicht s. z.B. DOWLING, 1987; WÄSSLE und BOYCOTT, 1991; MASLAND, 1996).

1.1.1 Aufbau der Lichtsinneszellen der Netzhaut

In den Netzhäuten von Wirbeltieren gibt es zwei morphologisch verschiedene Typen von Photorezeptoren, die Stäbchen und Zapfen (→ Abbildung 1.1). Die Stäbchen sind extrem sensitiv und können einzelne Photonen detektieren. Sie dienen dem Sehen bei niedrigen Lichtintensitäten (skotopisches Sehen). Die Zapfen dienen dem Sehen bei höheren Lichtintensitäten (photopisches Sehen). Menschen besitzen drei Populationen von Zapfen mit unterschiedlichen Wellenlängen maximaler Empfindlichkeit. Dadurch kann Farbinformation verarbeitet werden. Die Netzhaut von Menschen und Rindern wird von Stäbchen dominiert. Die Photoreaktion und die entscheidenden Schritte der Signaltransduktionskaskade finden in den Außensegmenten der Photorezeptoren statt. Diese bestehen aus einem geordneten Stapel von etwa 1000 flachen Membranvesikeln, den Disks, umhüllt von einer Plasmamembran. In den Sebstäbchenaußensegmenten (ROS) sind die Disks von der Plasmamembran getrennt. Die Proteine der Signaltransduktionskaskade sind hauptsächlich in den Membranen der Disks und in den dazwischenliegenden schmalen Regionen des Zytoplasmas lokalisiert. Die Ionenkanäle und -pumpen, die die vom Apparat der Disks erzeugten chemischen Signale in elektrische Ströme umsetzen, liegen in der Plasmamembran (zur Übersicht s. z.B. MOLDAI, 1998; MÜLLER und KAUPP, 1998).

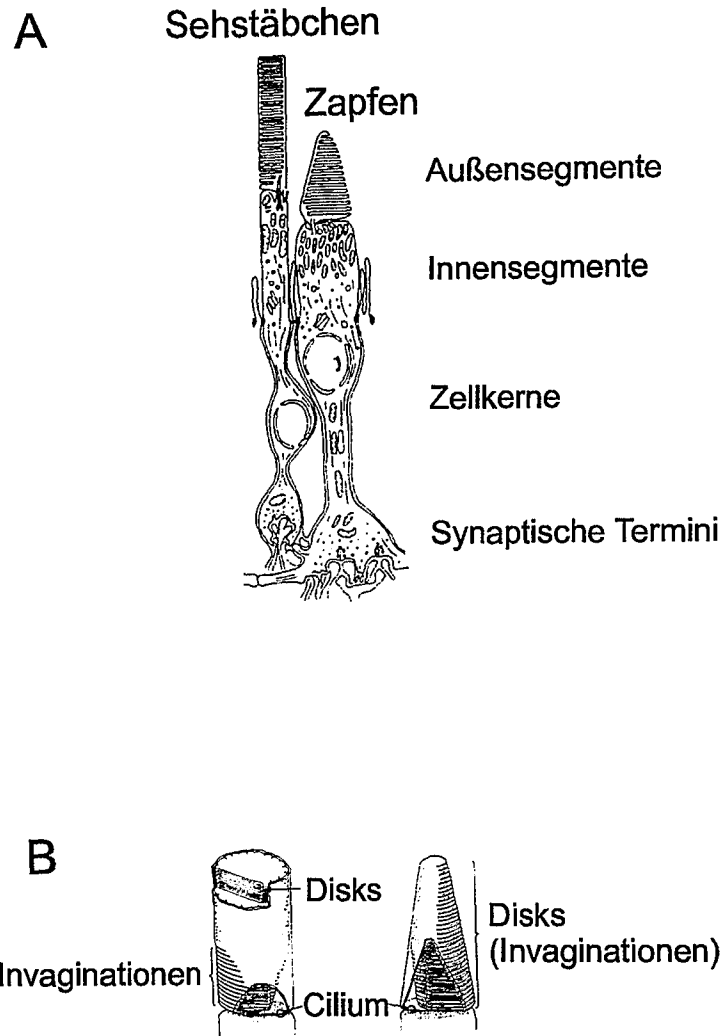


Abbildung 1.1 Photorezeptoren der Wirbeltiernetzhaut; A: Aufbau. B: Darstellung der Außensegmente; die Disks gehen aus Invaginationen der Plasmamembran hervor; die Außensegmente der Photorezeptoren sind durch ein Cilium mit den Innensegmenten verbunden. Nach McNAUGHTON (1990).

1.1.2 Die Lichtantwort der Sehstäbchen

Im Dunklen beträgt das Membranpotential eines Sehstäbchens etwa -35 mV. Die Gesamtkonzentration des intrazellulären Botenstoffs Guanosin-3':5'-monophosphat (cGMP) liegt im Außensegment bei etwa 60 μM , die freie cGMP-Konzentration beträgt etwa 5 μM . Die freie Ca^{2+} -Konzentration beträgt etwa 500 nM. Durch die cGMP-gesteuerten Kanäle der Plasmamembran (CNG-Kanäle) strömen Na^+ und Ca^{2+} entlang ihrer Konzentrationsgradienten in das Außensegment ein. Durch die Arbeit des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}, \text{K}^+$ -Austauschers in der Plasmamembran des Außensegments und die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und von K^+ -Kanälen im Innensegment entsteht ein geschlossener Stromkreis und die ionischen Bedingungen in der Zelle bleiben konstant. Dieser umlaufende Strom wird als Dunkelstrom bezeichnet. Der zentrale Botenstoff für die Lichtantwort der Photorezeptorzelle ist cGMP. Bei Belichtung fällt die

Konzentration von cGMP schnell und drastisch. Die CNG-Kanäle der Plasmamembran (CNC) schließen, der Dunkelstrom wird unterbrochen, und die Zelle hyperpolarisiert auf etwa -70 mV. Die freie Ca^{2+} -Konzentration sinkt durch die fortgesetzte Tätigkeit des $\text{Na}^+/\text{K}^+, \text{Ca}^{2+}$ -Austauschers auf Werte von unter 100 nM (zur Übersicht s. z.B. STRYER, 1988; YAU, 1994; MÜLLER und KAUPP, 1998).

1.1.3 Die Signaltransduktionskaskade

Der erste Schritt der Signaltransduktion in Photorezeptorzellen ist die Absorption eines Photons durch 11-*cis*-Retinal. Retinal ist die allosterische Gruppe des Pigmentproteins Rhodopsin, das etwa 50 % (w/w) des gesamten Proteins aus ROS ausmacht. Opsin, das Alloprotein des Rhodopsins, gehört zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Durch Absorption eines Photons isomerisiert 11-*cis*-Retinal zur all-*trans*-Form und verursacht dadurch eine über mehrere Zwischenstufen ablaufende Konformationsänderung des Rhodopsins (WALD, 1968; HOFMANN, 1986). Dies ist die einzige Photoreaktion des Sehprozesses. Die aktive Form des Rhodopsins, meta-Rhodopsin II (Rh^*), katalysiert einen GDP/GTP-Austausch an der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins Transducin (G_T) und induziert so dessen Dissoziation in $\text{G}_\text{T}\alpha\text{-GTP}$ und $\text{G}_\text{T}\beta\gamma$. Die freie $\text{G}_\text{T}\alpha$ -Untereinheit bindet an die inhibitorischen γ -Untereinheiten der photorezeptorspezifischen cGMP-Phosphodiesterase des Subtyps 6 (PDE). Die disinhibierte PDE katalysiert die Hydrolyse von cGMP (BAEHR et al. 1979; FUNG et al., 1981; HURLEY und STRYER, 1982). Der Rückgang der cGMP-Konzentration wird von den Kanälen der Plasmamembran in ein elektrisches Signal umgesetzt (FESENKO et al., 1985; HAYNES und YAU, 1985). Die Zeit von der primären Absorption eines Photons bis zum Maximum des elektrischen Signals beträgt in dunkeladaptierten Stäbchen von Amphibien bei 22°C etwa 0,5 s, in Zapfen etwa 0,1 s. Die Lichtantwort in den Photorezeptoren der Säugetiere ist unter physiologischen Bedingungen um etwa eine Größenordnung schneller (zur Übersicht über die kinetischen Parameter für die Aktivierung der Lichtantwort in den Stäbchen und Zapfen verschiedener Spezies s. PUGH und LAMB, 1993). Die biochemische Kaskade der Lichtantwort wird über mehrere Mechanismen abgeschaltet.

- Photoaktiviertes Rhodopsin wird von einem spezialisierten Enzym, der Rhodopsinkinase (GRK1), mehrfach phosphoryliert (KÜHN und DREYER, 1972) und in diesem Zustand durch die Bindung des löslichen Proteins Arrestin (WILDEN et al., 1986) deaktiviert. Dieser Komplex dissoziiert nach der Abspaltung von Retinal, und Opsin steht zur Regeneration zur Verfügung.
- Die Deaktivierung von aktiviertem G_T ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Abschaltung der Lichtantwort (SAGOO und LAGNADO, 1997). $\text{G}_\text{T}\alpha$ besitzt eine langsame intrinsische GTP-ase-Aktivität (KÜHN, 1980), die in Gegenwart seines Effektors, $\text{PDE}\gamma$, durch einen Komplex des GTPase-aktivierenden Proteins RGS9 mit dem Subtyp 5 der G-

- Protein- β -Untereinheit ($G\beta 5$) auf physiologische Umsatzraten beschleunigt wird (ANGELSON und WENSEL, 1993; ANGELSON und WENSEL, 1994; HE et al., 1998; MAKINO et al., 1999). Die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP führt zur Reassoziierung der $G_T\alpha$ -Untereinheit mit $G_T\beta\gamma$. Die inhibitorische PDE- γ -Untereinheit wird frei, reassoziiert mit den katalytischen Untereinheiten der PDE und schaltet so das Enzym ab.
- cGMP wird durch die partikuläre Guanylatzyklase der Photorezeptoraußensegmente (ROS-GC) neu synthetisiert (PANNBACKER, 1973; FLEISCHMAN und DENISEVICH, 1979; KOCH, 1991).

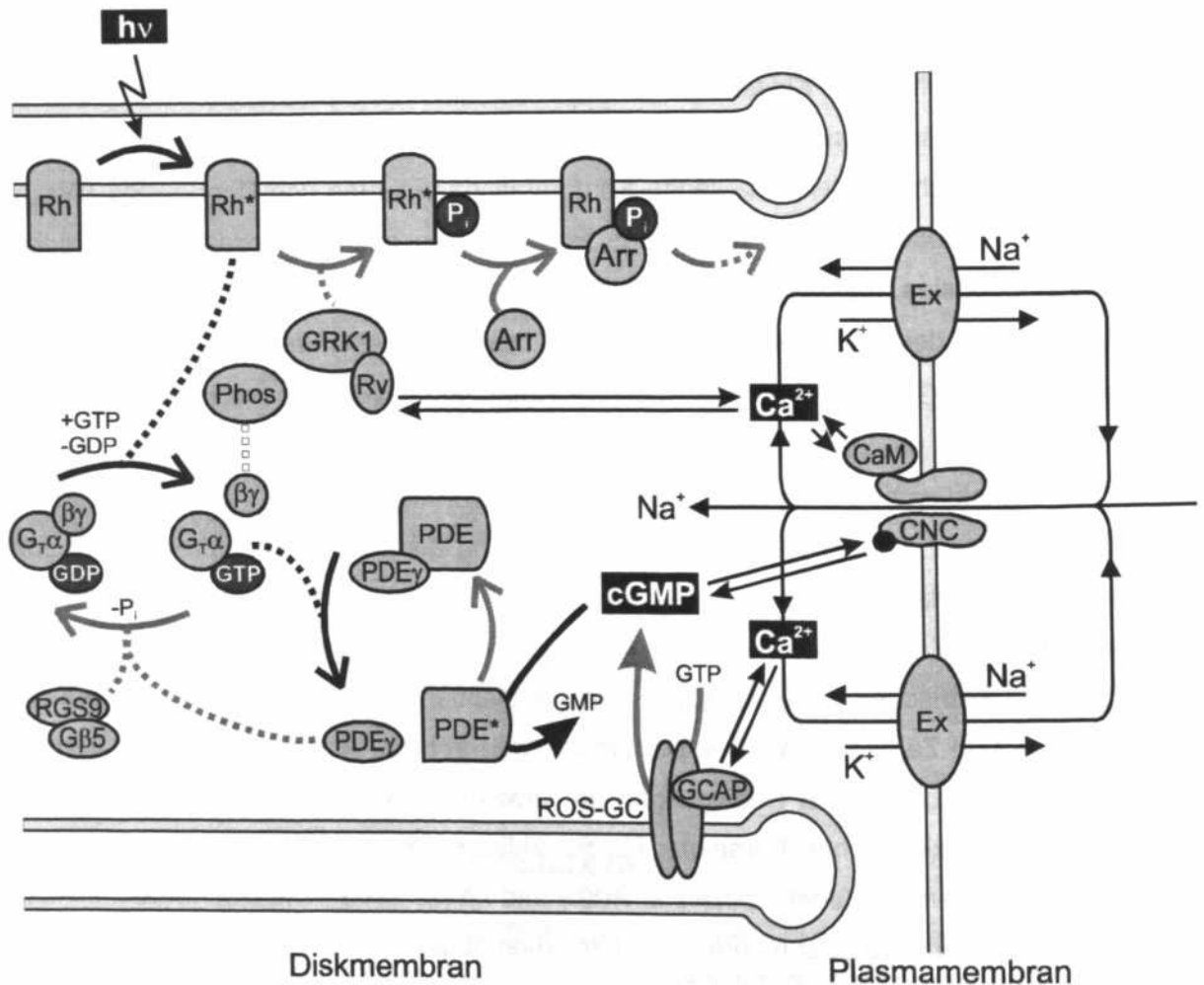


Abbildung 1.2 Schema der Aktivierungs- und Deaktivierungsreaktionen bei der Lichtantwort der Photorezeptoren von Wirbeltieren; dicke schwarze Pfeile: Reaktionen der Aktivierungskaskade; dicke graue Pfeile: Reaktionen, die an der Deaktivierung der Lichtantwort beteiligt sind; dicke gepunktete Linien: katalytische und regulatorische Protein-Protein-Wechselwirkungen; Doppelpfeile: Regulation durch cGMP bzw. Ca^{2+} ; dünne schwarze Pfeile: Ionenströme. Abkürzungen s.Text, außer Arr: Arrestin; CaM: Calmodulin; Ex: $Na^+/K^+, Ca^{2+}$ -Austauscher; Phos: Phosducin; P_i : Phosphat; Rv: Recoverin; hv: Absorption eines Photons

1.1.4 Die Lichtadaptation

Das Sehsystem des Menschen ist über zehn Größenordnungen der Lichtintensität funktionsfähig. Die Anpassung der Empfindlichkeit des Sehsystems an die herrschenden Lichtverhältnisse wird als Adaptation bezeichnet. Den überwiegenden Teil der notwendigen Anpassungsleistung erbringen die Photorezeptorzellen.

Die Sehzäpfchen der Netzhaut reagieren im dunkeladaptierten Zustand bereits auf einzelne Lichtquanten (Photonen). Ihre elektrische Antwort auf transiente Stimulation ist bei einigen hundert Photonen pro Zäpfchen in der Sättigung. Die Zapfen sind etwa einhundertmal weniger lichtempfindlich. Ihr dynamischer Bereich für die Antwort auf Lichttransienten umfaßt ebenfalls etwa drei Größenordnungen.

Bei konstanter Hintergrundbeleuchtung verringert sich die Empfindlichkeit der Photorezeptoren für zusätzliche Reize. Dabei ist das Verhältnis der Reizschwelle ΔI für die Erzeugung einer gegebenen elektrischen Antwort zur Intensität I des Hintergrundlichts über eine breite Spanne der Lichtintensität konstant ($\Delta I/I = c$; Weber-Fechner-Beziehung), d.h. der dynamische Bereich der Photorezeptoren ist immer etwa gleich weit (zur Übersicht s. z.B. DOWLING, 1987; PERLMAN und NORMAN, 1998). Eine Reihe biochemischer Mechanismen ist für die Empfindlichkeitsanpassung der Photorezeptoren verantwortlich.

Belichtetes Rhodopsin zerfällt nach seiner Deaktivierung in Opsin und die *all-trans*-Form des Chromophors Retinal. Dadurch sinkt die Konzentration an aktivierbarem Rhodopsin in den Außensegmenten. Dieser Mechanismus, das Ausbleichen, beeinflußt die Empfindlichkeit der Photorezeptoren erst bei Lichtintensitäten, bei denen im Menschen das Zapfensystem die optische Wahrnehmung dominiert. Er erlaubt den Sehzapfen die Empfindlichkeitsanpassung über die sechs Größenordnungen der Lichtintensität, die zwischen einem elektrisch beleuchteten Raum und hellem Mittagslicht liegen. Zusätzliche biochemische Anpassungen der Photorezeptoren bei hohen Lichtintensitäten werden möglicherweise über die freie Ca^{2+} -Konzentration (MATTHEWS et al., 1996; SAMPATH et al., 1998) reguliert. Die Empfindlichkeit der Photorezeptoren wird während der Readaptation an dunklere Verhältnisse bei Zapfen innerhalb von Minuten und bei Stäbchen innerhalb von etwa einer Stunde wiederhergestellt. Das entspricht dem Zeitverlauf für die Regeneration von Opsin zu Rhodopsin mit 11-*cis*-Retinal.

Bei skotopischem Sehen und im unteren Empfindlichkeitsbereich der Sehzapfen spielt das Ausbleichen keine Rolle für die Adaptation. In diesem Bereich, der etwa vier Größenordnungen der Lichtintensität umfaßt, sind biochemische Mechanismen an der Empfindlichkeitsanpassung beteiligt, die durch die freie Ca^{2+} -Konzentration gesteuert werden und auf einer Zeitskala unterhalb einer Sekunde ablaufen (MATTHEWS et al., 1990; MATTHEWS, 1996; CALVERT et al., 1998). Bei Belichtung eines Sehzäpfchens sinkt die freie Ca^{2+} -Konzentration von ihrem Dunkelwert von etwa 500 nM abhängig von der Lichtintensität auf Werte bis unter

50 nM (CERVETTO et al., 1989; LAGNADO et al., 1992; GRAY-KELLER und DETWILER, 1994; SAMPATH et al., 1999). Drei zentrale Mechanismen der Signaltransduktionskaskade unterliegen der Rückkopplung durch Ca^{2+} .

- Die Deaktivierung von Rh^* durch GRK1 wird wahrscheinlich bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen im Dunklen durch das neuronale Ca^{2+} -Sensorprotein Recoverin gehemmt (GRAY-KELLER et al., 1993; KAWAMURA, 1993; SENIN et al., 1997; ERICKSON et al., 1998; s. aber OTTO-BRUC et al., 1998). Dadurch steigt die Lebensdauer der aktivierten PDE (KAWAMURA und MURAKAMI, 1991).
- Durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen im Dunkelzustand wird über ein lösliches regulatorisches Protein die Affinität des CNG-Kanals für cGMP verringert (NAKATANI et al., 1995; SAGOO und LAGNADO, 1996). Der verantwortliche Ca^{2+} -bindende Faktor ist wahrscheinlich Calmodulin (HSU und MOLDAV, 1993; BAUER, 1996; s. aber GORDON et al., 1995; REBRIK und KORENBROT, 1998).
- Die ROS-GC wird bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen durch ein lösliches regulatorisches Protein aktiviert ($\rightarrow$ 1.3; KOCH und STRYER, 1988; DIZHOOR et al., 1994). Zwei Isoformen der ROS-GC (ROS-GC1 und ROS-GC2; KOCH, 1991; SHYJAN et al., 1992; LOWE et al., 1995) und drei Isoformen des regulatorischen Proteins, das die ROS-GC bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert (GCAP-1, -2 und -3; PALCZEWSKI et al., 1994; DIZHOOR et al., 1995; FRINS et al., 1996; HAESELEER et al., 1999) sind bisher in den Photorezeptoren von Säugetieren beschrieben worden.

Diese Ca^{2+} -abhängigen Rückkoppelungsmechanismen sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden, so daß ein quantitatives Modell für die Deaktivierung der Antwort auf Lichttransienten ausgearbeitet werden konnte (NIKONOV et al., 1998). Eine ähnlich genaue Theorie der Lichtadaptation ist bis jetzt nicht erarbeitet worden. Wahrscheinlich sind neben den oben beschriebenen Ca^{2+} -abhängigen Prozessen noch andere Rückkoppelungsmechanismen an der Adaptation beteiligt (GRAY-KELLER und DETWILER, 1996). Eine Reihe zusätzlicher Mechanismen wurde vorgeschlagen.

- Das Protein Phosducin bindet in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungszustand $\text{G}_\text{T}\beta\gamma$ und kontrolliert so die Konzentration an aktivierbarem G_T (LEE et al., 1992; YOSHIDA et al., 1994; GAUDET et al., 1996).
- Die Affinität der inhibitorischen PDE γ -Untereinheit für die katalytischen Untereinheiten der PDE wird durch die Bindung von cGMP an hochaffine, nicht-katalytische cGMP-Bindungsstellen der PDE kontrolliert (ARSHAVSKY et al., 1992; COTE et al., 1994; YAMAZAKI et al., 1996; MOU et al., 1999).
- Das Protein GARP, das in drei Spleißformen (GARP-1, -2 und GARP-Domäne der CNC1 β -Untereinheit) spezifisch in Sehtäbchen vorkommt, inhibiert die PDE (KÖRSCHEN et al., 1999).

- Freies $G_{\alpha}\beta\gamma$ vermittelt eine lichtabhängige Inhibierung der ROS-GC (WOLBRING et al., 1999).
- Das Transducin-GTPase-aktivierende Protein RGS9 inhibiert die ROS-GC (SENO et al., 1998).

Die tatsächliche physiologische Bedeutung dieser Mechanismen ist bis jetzt nicht geklärt. Die bekannten Prozesse, die an der Lichtantwort der Photorezeptorzelle und ihrer Regulation beteiligt sind, werden in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Als Schnittstelle zwischen dem cGMP-Signal und dem Ca^{2+} -Signal der Lichtantwort spielt die partikuläre Guanylatzyklase ROS-GC eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion der Photorezeptoren.

1.2 Adenylat- und Guanylatzyklasen

Die zyklischen Nukleotide Adenosin-3':5'-monophosphat (cAMP) und Guanosin-3':5'-monophosphat (cGMP) gehören in allen Reichen der Lebewesen zu den wichtigsten intrazellulären Botenstoffen. Sie regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse von der Transkription in Bakterien bis zur Signalverarbeitung in den sensorischen Neuronen des Menschen. Die Enzyme, die cAMP bzw. cGMP synthetisieren, die Adenylat- bzw. Guanylatzyklasen, bilden die Proteinsuperfamilie der Purinnukleotidzyklasen. Das gemeinsame Merkmal aller Adenylat- und Guanylatzyklasen ist ihre hoch konservierte katalytische Domäne. Einige wenige zentrale Aminosäuren in dieser Domäne bestimmen die Substratspezifität der Zyklen (SUNAHARA et al., 1998; TUCKER et al., 1998; zur Übersicht über die Struktur der katalytischen Domäne s. HURLEY, 1998). Abgesehen von der konservierten katalytischen Domäne haben die Adenylat- und Guanylatzyklasen in den verschiedenen Reichen und Stämmen der Lebewesen sehr verschiedene Primärstrukturen (s. z.B. DANCHIN, 1993). In Wirbeltieren sind bis jetzt eine Familie der Adenylat- und zwei Familien der Guanylatzyklasen bekannt.

1.2.1 Adenylatzyklasen

Die Adenylatzyklasen (AC) der Wirbeltiere sind große integrale Membranproteine mit 12 Transmembrandomänen und zwei cytosolischen katalytischen Domänen. Bis jetzt wurden neun verschiedene Subtypen der AC in Wirbeltieren gefunden, die sich nach ihrer Gewebespezifität und ihrer Regulation durch verschiedene Faktoren (heterotrimere G-Proteine, Phosphorylierung, Ca^{2+} , Ca^{2+} -Calmodulin) unterscheiden (zur Übersicht s. z.B. GILMAN, 1995; TAUSSIG und GILMAN, 1995; HURLEY, 1999; SIMONDS, 1999). In Modellsystemen aus heterolog exprimierten katalytischen Domänen verschiedener AC-Subtypen wurde kürzlich die Tertiärstruktur der katalytischen Domäne aufgeklärt (TESMER et al., 1997; ZHANG et al., 1997). Die funktionelle Einheit der katalytischen Domäne ist ein Dimer.

1.2.2 Lösliche Guanylatzyklen

Die löslichen Guanylatzyklen (sGC) der Wirbeltiere sind heterodimere Proteine aus α - und β -Untereinheiten. In Säugetieren wurden bis jetzt jeweils zwei Isoformen der α - und der β -Untereinheit gefunden. Jede der Untereinheiten besteht aus einer N-terminalen Bindedomäne für die prosthetische Häm-Gruppe des Holoenzym, einer zentralen Dimerisierungsdomäne und der C-terminalen katalytischen Domäne. Die Aktivität der sGC wird durch den Botenstoff NO $\cdot$ und möglicherweise durch CO reguliert. Durch die Bindung von NO $\cdot$ an das zentrale Eisenatom der prosthetischen Hämgruppe wird die sGC-Aktivität um das bis zu 400-fache gesteigert. Die sGC der Säugetiere ist ein ubiquitäres Protein. Bis jetzt sind keine funktionellen Unterschiede zwischen den verschiedenen bekannten Isoformen der sGC bekannt (zur Übersicht s. z.B. HOBBS, 1997; DENNINGER und MARLETTA, 1999; KOESLING und FRIEBE, 1999). Über die Tertiärstruktur der sGC ist bis jetzt sehr wenig Information verfügbar. Die Tertiärstruktur der katalytischen Domäne wurde auf der Grundlage der bekannten Struktur der katalytischen Domäne der AC modelliert (LIU et al., 1997). Mutationsstudien haben die Gültigkeit des Modells bestätigt (YUEN et al., 1994; SUNAHARA et al., 1998). Wie bei den AC ist die funktionelle katalytische Domäne der sGC ein Dimer.

1.2.3 Peptidrezeptoren und neuronale Guanylatzyklen

Die zweite Familie der Guanylatzyklen in Wirbeltieren wird durch die partikulären Guanylatzyklen (GC) gebildet. Ihre Domänenstruktur wird in Abbildung 1.3 gezeigt.

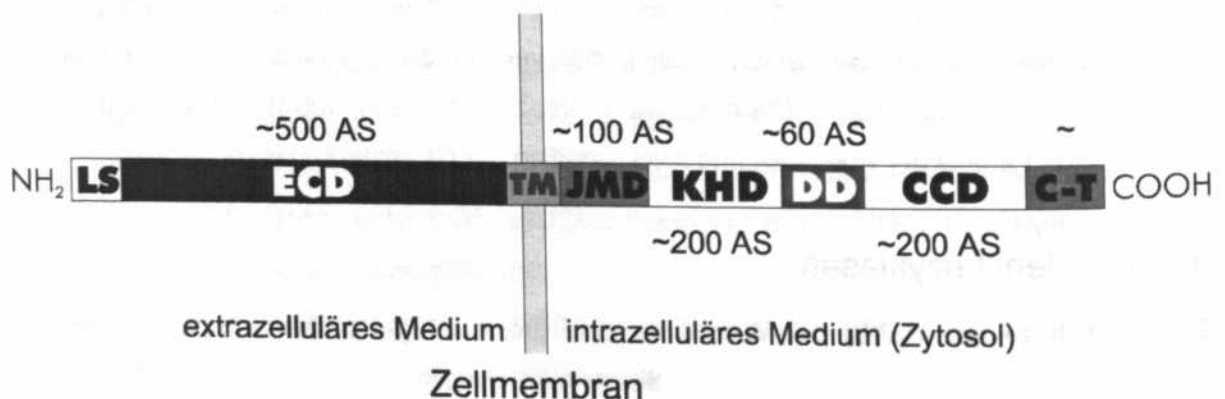


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Domänenstruktur der partikulären Guanylatzyklen; LS: N-terminales Signalpeptid; ECD: Extrazelluläre Domäne, TM: Transmembrandomäne JMD: Juxtamembrandomäne, KHD: Tyrosinkinase-Homologiedomäne, DD: Putative Dimerisierungsdomäne, CCD: Katalytische Domäne, C-T: C-Terminus.

Die partikulären GC sind integrale Membranproteine mit einer einzelnen Transmembrandomäne (→ Abbildung 1.3, TM). Die große, extrazelluläre N-terminale Domäne (→ Abbildung 1.3, ECD), die fast die Hälfte des Proteins (etwa 500 AS) umfaßt, hat je nach Subtyp (s.u.) eine sehr verschiedene Primärstruktur. Eine Reihe homologer Cysteinreste in der ECD ist

aber zwischen den Subtypen konserviert (s. z.B. YU et al., 1997; SCHULZ et al., 1998) Diese Cysteinreste tragen wahrscheinlich durch konservierte Cystin-Brücken zur Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur der ECD und zur Dimerisierung der GC bei (ITAKURA et al., 1994; STULTS et al., 1994; LABRECQUE et al., 1999). An die Transmembrandomäne (TM) schließt sich intrazellulär eine Domäne von etwa 100 AS an, die als Juxtamembrandomäne (→ Abbildung 1.3, JMD) bezeichnet wird. Die Primärstruktur der JMD ist innerhalb einer Unterfamilie (s.u.) der partikulären GC konserviert, aber nicht zwischen den Unterfamilien. Die JMD hat wahrscheinlich jeweils eine Funktion für die subtypspezifische Regulation der partikulären GC (GORACZNAK et al., 1992; KOLLER et al., 1992; DUDA et al., 1993; DESHMANE et al., 1997; POTTER und HUNTER, 1998a,b). C-terminal schließt sich an die JMD eine Domäne mit hoher Homologie zur katalytischen Domäne von Rezeptortyrosinkinasen (→ Abbildung 1.3, KHD) an. Die KHD umfaßt etwa 200 AS und ist in allen partikulären GC konserviert. Die Sequenz der KHD weicht in einigen kritischen Aminosäurepositionen von der Konsensussequenz des katalytischen Zentrums der Tyrosinkinasen ab (s. z.B. FOSTER et al., 1999). Damit ist wahrscheinlich keine der bekannten partikulären GC eine Tyrosinkinase. In einer biochemischen Präparation der partikulären Guanylatzyklase ROS-GC1 wurde aber eine Serin-/Threoninkinaseaktivität gefunden, die auch die Phosphorylierung der ROS-GC1 selbst katalysiert (APARICIO und APPLEBURY, 1996). Die genaue Funktion der KHD für die partikulären GC ist nicht bekannt. Die Deletion der KHD führte in Mutationsstudien mit verschiedenen partikulären GC zum Verlust der jeweiligen physiologischen Regulation (CHINKERS und GARBERS, 1989; KOLLER et al., 1992; DUDA et al., 1996a; DESHMANE et al., 1997). Nach der KHD folgt eine kleine Domäne von etwa 50 AS, die wahrscheinlich eine amphipathische, α -helikale Sekundärstruktur ausbildet und an der Dimerisierung der partikulären GC beteiligt ist (Dimerisierungsdomäne; → Abbildung 1.3, DD; WILSON und CHINKERS, 1995). Homologe Domänen¹ finden sich auch in den Untereinheiten der sGC, in den meisten Subtypen der AC in Wirbeltieren und in den Purinnukleotidzyklasen niederer Organismen und erfüllen dort möglicherweise eine ähnliche Funktion. Unmittelbar auf die DD folgt die katalytische Domäne (→ Abbildung 1.3, CCD). Ihre Tertiärstruktur wurde, wie die der sGC, auf der Grundlage der bekannten Struktur der katalytischen Domäne der AC modelliert (LIU et al., 1997). Die Gültigkeit des Modells wurde durch Mutationsstudien bestätigt (THOMPSON und GARBERS, 1995; TUCKER et al., 1998). Die minimale funktionelle Einheit der partikulären GC ist also ein Dimer. Die Region, die C-terminal auf die CCD (C-Terminus; → Abbildung 1.3, C-T) folgt, ist zwischen den verschiedenen Subtypen der partikulären GC nicht konserviert. Die Länge des C-T beträgt je nach Subtyp 5 AS - 70 AS. Über die Funktion des C-T ist nur wenig bekannt (zur Funktion des C-T im Subtyp C der partikulären GC s. WADA et al., 1996).

¹ Domäne #520; ProDom protein domain family database, release 99.1; <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html> (CORPET et al., 1999).

Bis jetzt sind in Säugetieren sechs Subtypen der partikulären GC molekular identifiziert worden, nämlich GC-A (SINGH et al., 1988; CHINKERS et al., 1989), GC-B (SCHULZ et al., 1989), GC-C (SCHULZ et al., 1990), GC-D (FÜLLE et al., 1995), GC-E (RetGC-1, ROS-GC1; SHYJAN et al., 1992; GORACZNAK et al., 1994), GC-F (Ret-GC2, ROS-GC2; LOWE et al., 1995; YANG et al., 1995) und GC-G (SCHULZ et al., 1998). Durch den Vergleich der Primärstrukturen kann man die partikulären GC der Säugetiere in drei Unterfamilien einteilen. Die erste wird durch GC-A, -B und -G gebildet, die zweite durch GC-D, GC-E (ROS-GC1) und GC-F (ROS-GC2). Die GC-C kann in keine dieser beiden Unterfamilien eingeordnet werden und bildet deswegen alleine die dritte (→ Abbildung 1.4).

Aufgrund ihrer bekannten oder wahrscheinlichen Funktion und Regulation lassen sich die partikulären GC in Peptidrezeptoren (GC-A, -B und -C) und neuronale GC einteilen (GC-D, GC-E und GC-F; die GC-E bzw. die GC-F werden im folgenden als ROS-GC1 bzw. ROS-GC2 bezeichnet, um sie als die Isoformen der Guanylatzyklase in Photorezeptoraußensegmenten, ROS-GC, zu kennzeichnen). Die Peptidrezeptor-GC werden hauptsächlich durch die Bindung extrazellulärer Liganden reguliert (→ 1.2.3.1), während die neuronalen GC hauptsächlich auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reagieren (→ 1.3). Außerdem existieren biochemische Daten, die darauf hindeuten, daß es in glattem Muskelgewebe eine partikuläre GC-Aktivität gibt, die durch heterotrimere G-Proteine reguliert wird (LIPPO DE BÉCEMBERG et al., 1995). Die molekulare Identität der verantwortlichen GC und die physiologische Bedeutung eines solchen Regulationsmechanismus sind jedoch unklar.

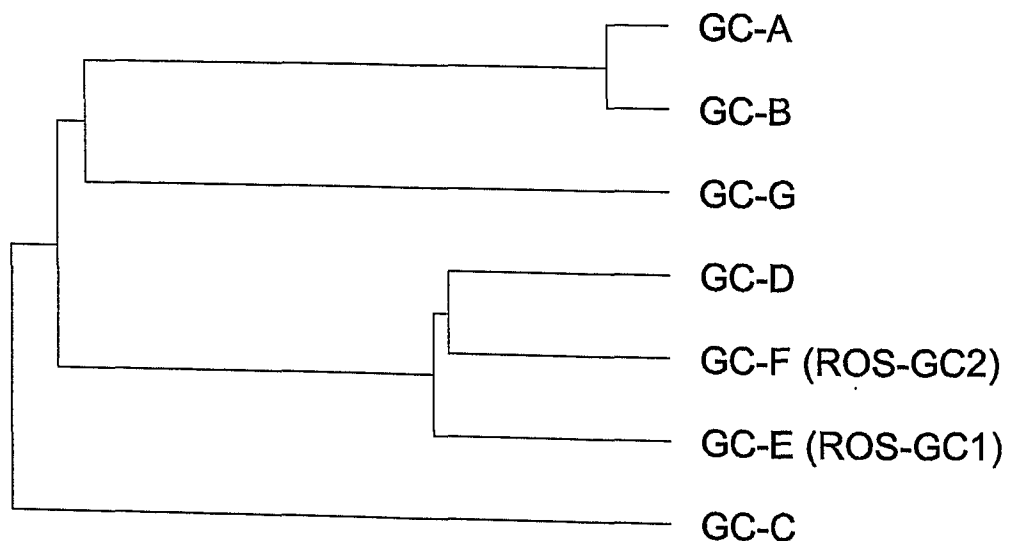


Abbildung 1.4 Primärstrukturvergleich der partikulären Guanylatzyklasen aus Säugetieren - Dendrogramm; Ergebnis der Primärstrukturanalyse mit dem Programm CLUSTAL (HIGGINS und SHARP, 1988).

1.2.3.1 Peptidrezeptoren

Die GC-A bzw. -B sind Rezeptoren für die natriuretischen Peptidhormone der Typen A und B bzw. C. Die Peptidliganden binden kooperativ an die ECD eines GC-Rezeptordimers und aktivieren damit die CCD. Die Aktivierung der CCD erfordert die Bindung von ATP an eine Bindungsstelle in der JMD (DUDA et al., 1993; GORACZNAK et al., 1992). Der genaue Mechanismus, mit dem das Aktivierungssignal auf die CCD übertragen wird, ist noch nicht vollständig geklärt (s. z.B. WILSON und CHINKERS, 1995; LABRECQUE et al., 1999; MISONO et al., 1999). Die Rezeptoren GC-A oder GC-B sind im Endothel aller Organe und in einer Reihe anderer Zelltypen vorhanden und steuern über die zelluläre cGMP-Konzentration z.B. den Blutdruck und die Harnsekretion in der Niere (zur Übersicht s. z.B. SCHULZ und WALDMAN, 1999). Die Disruption des Gens für GC-A führt in transgenen Mäusen zu konstitutivem Bluthochdruck (LOPEZ et al., 1995). Mehr als 90 % der Bindestellen für die natriuretischen Peptide im Endothel werden aber nicht durch die Rezeptor-Guanylatzyklasen GC-A und -B, sondern durch den Rezeptor NPR-C gebildet, der die Primärstruktur einer „halben“ partikulären Guanylatzyklase hat (FULLER et al., 1988). Die ECD und die Transmembrandomäne des NPR-C sind den entsprechenden Domänen der GC-A und -B homolog, die intrazelluläre Domäne des NPR-C besteht aber nur aus 37 AS. Möglicherweise koppelt diese kurze intrazelluläre Domäne des NPR-C bei Bindung eines Liganden über heterotrimere G-Proteine an einen intrazellulären Signalweg, der zur Aktivierung der endothelialen $\cdot$ NO-Synthase und damit schließlich zur Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase führt (sGC, → 1.2.2; MURTHY et al., 1998; MURTHY und MAKHLOUF, 1999).

Für die partikuläre Guanylatzyklase GC-G, die am nächsten mit den Peptidrezeptoren GC-A und -B verwandt ist (→ Abbildung 1.4), ist bis jetzt noch kein Ligand und keine Funktion bekannt.

Die GC-C kommt hauptsächlich in den Bürstensäumen der Dünndarmschleimhaut vor und ist dort und in anderen Geweben wahrscheinlich an der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes beteiligt. Die physiologischen Liganden, die die GC-C durch die Bindung an die ECD aktivieren, sind die Peptide der Guanylin-Familie (zur Übersicht s. z.B. FORTE, 1999). Die hitzestabilen Enterotoxine (STa), die von einer Reihe pathogener Darmbakterien gebildet werden, binden ebenfalls an die ECD der GC-C und aktivieren sie (SCHULZ et al., 1990). Durch die erhöhte cGMP-Konzentration in den Zellen der Dünndarmwand wird die Regulation des Flüssigkeitstransports gestört, was zu den typischen Durchfallssymptomen einer Darminfektion führt. Transgene Mäuse, deren Gen für die GC-C disruptiert wurde, sind scheinbar normal lebensfähig, aber resistent gegen die Wirkung von STa (MANN et al., 1997).

1.2.3.2 Neuronale partikuläre Guanylatzyklen

Die Unterfamilie der partikulären Guanylatzyklen der Säugetiere, die durch die GC-D, die ROS-GC1 und die ROS-GC2 gebildet wird, unterscheidet sich von den anderen Unterfamilien dadurch, daß ihre Mitglieder nur in den Nervenzellen sensorischer Gewebe und dabei hauptsächlich in ciliären sensorischen Neuronen vorkommen.

Die GC-D wurde zuerst aus dem olfaktorischen Epithel kloniert (FÜLLE et al., 1995) und wird spezifisch in einer begrenzten Subpopulation der olfaktorischen Rezeptorneurone exprimiert, die sich auch durch das Vorkommen einer cAMP-/cGMP-Phosphodiesterase des Subtyps 2 (cGMP-aktiviert) von den anderen olfaktorischen Rezeptorneuronen unterscheidet (JUILFS et al., 1997). Möglicherweise existiert also in dieser Subpopulation eine Signaltransduktionskaskade, die sich von der gut untersuchten cAMP-Kaskade der olfaktorischen Transduktion unterscheidet (zur Übersicht s. z.B. FRINGS, 1999).

Die ROS-GC1 (retGC-1, GC-E) wurde aus Photorezeptoraußensegmenten biochemisch gereinigt und kloniert (SHYJAN et al., 1992; GORACZNAK et al., 1994) und ihre Expression in der Retina und im Pinealorgan (YANG et al., 1995; VENKATARAMAN et al., 1998) nachgewiesen. Bei einer PCR-Studie wurde die cDNA für ROS-GC1 außerdem im Corti'schen Organ der Hörschnecke gefunden (SEEBACHER et al., 1999). Die Haarzellen des Corti'schen Organs sind, wie die Photorezeptoren der Netzhaut und die olfaktorischen Rezeptorneurone des Riechepithels, ciliäre sensorische Neurone. Die ROS-GC1 wurde in Photorezeptoraußensegmenten immunhistochemisch nachgewiesen (DIZHOOR et al., 1994; LIU et al., 1994; COOPER et al., 1995; HALLET et al., 1996). Die Außensegmente der Zapfen wurden dabei durch Antikörper gegen ROS-GC1 immer deutlich stärker markiert als die Außensegmente der Sehtäbchen. Die zweite Isoform der ROS-GC, ROS-GC2 (retGC2, GC-F) wurde aus einer retinalen cDNA-Bibliothek kloniert. Ihre Expression in Photorezeptoren wurde nachgewiesen (LOWE et al., 1995). Bis jetzt wurde die ROS-GC2 in keinem anderen Gewebe als der Netzhaut gefunden. In Sehtäbchenaußensegmenten kommen sowohl ROS-GC1 als auch ROS-GC2 vor (YANG und GARBERS, 1997). Die ROS-GC1 ist aber wahrscheinlich die vorherrschende Isoform der ROS-GC in Sehtäbchenaußensegmenten (ROS). Die Sequenzen von Peptiden, die aus biochemisch gereinigten Präparationen der ROS-GC gewonnen wurden, stimmten immer mit den Sequenzen der entsprechenden Regionen der ROS-GC1, nicht aber der ROS-GC2, überein (MARGULIS et al., 1993; KOCH et al., 1994). Mehr als 90 % der GC-Aktivität in einer Präparation von Photorezeptoraußensegmenten aus der stäbchen-dominierten Netzhaut des Rindes können durch einen Antikörper, der spezifisch gegen ROS-GC1 gerichtet ist, immunpräzipitiert werden². Auch in den Außensegmenten der Zapfen ist die ROS-GC1 wahrscheinlich die vorherrschende Isoform der ROS-GC. Bei erblichen Netzhauterkrankungen (Leber'sche kongenitale Amaurose, LCA, und Zapfen-Stäbchen-Dys-

trophie, CORD), die durch einen Defekt im Gen für ROS-GC1 verursacht werden, sind die Zapfen der Netzhaut stark geschädigt, wohingegen der begleitende Verlust der Sehkörbchenfunktion beim Krankheitsbild der CORD ein sekundärer Effekt zu sein scheint (PERRAULT et al., 1996; KELSELL et al., 1998). Transgene Mäuse, deren Gen für ROS-GC1 disruptiert wurde, verlieren innerhalb weniger Wochen nach der Geburt ihre Zapfen. Die Zapfen dieser Tiere zeigen von Anfang an keine elektrische Antwort auf Licht. Die Sehkörbchen der transgenen Mäuse haben eine normale Morphologie. Die elektrische Lichtantwort der Sehkörbchen unterscheidet sich von der Lichtantwort der Sehkörbchen einer Wildtyp-Maus u.a. durch höhere Lichtsensitivität und eine beschleunigte Deaktivierungskinetik (YANG et al., 1999). In den Sehkörbchen kann der Verlust der ROS-GC1 also wahrscheinlich durch die ROS-GC2 kompensiert werden, wobei sich ein verschobenes Gleichgewicht zwischen den Rückkoppelungsmechanismen einstellt, die die Sensitivität der Signaltransduktionskaskade regulieren (→ 1.1.4). In den Zapfen ist eine Kompensation des Verlustes der ROS-GC1 nicht möglich. Bis jetzt ist keine erbliche Netzhauterkrankung bekannt, die durch einen Defekt im Gen für die ROS-GC2 hervorgerufen wird. Nach der chromosomalen Lokalisation des menschlichen Gens für ROS-GC2 (GUC2F) besteht jedoch die Möglichkeit einer Verbindung mit dem Krankheitsbild der heterosomal erblichen (X-gekoppelten) Retinitis Pigmentosa (XLRP), das durch eine langsame progressive Degeneration der Sehkörbchen gekennzeichnet ist (YANG et al., 1996).

Bei einigen der oben erwähnten immunocytochemischen Studien wurden neben den Außensegmenten von Photorezeptoren auch die Synapsen der Photorezeptoren und bestimmte Neurone der inneren Retina durch Antikörper gegen ROS-GC1 angefärbt (LIU et al., 1994; COOPER et al., 1995). Diese Anfärbung war aber immer schwächer als die der Photorezeptoraußensegmente. Die Vorstellung, daß eine der Isoformen der ROS-GC in Neuronen der inneren Retina exprimiert wird, wird dadurch unterstützt, daß auch GCAP-2 in der inneren Retina gefunden wurde (OTTO-BRUC et al., 1997a; CUENCA et al., 1998; HOWES et al., 1998; KACHI et al., 1999). Das Ca^{2+} -bindende Protein GCAP-2 ist ein spezifischer physiologischer Regulator der ROS-GC (→ 1.3).

² K.-W. Koch, pers. Mitteilung.

1.3 Die Regulation der Guanylatzyklase in Photorezeptoraußensegmenten

Eine der zentralen Eigenschaften der Guanylatzyklase der Photorezeptoraußensegmente (ROS-GC) ist ihre Regulation durch die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$). Durch die Belichtung der Photorezeptoren sinkt die $[\text{Ca}^{2+}]$ von etwa 500 nM auf etwa 50 nM ab. Diese Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]$ führt zur Erhöhung der GC-Aktivität in ROS um etwa eine Größenordnung. Der Einfluß der $[\text{Ca}^{2+}]$ auf die Aktivität der ROS-GC wird durch ein lösliches Protein der Photorezeptoraußensegmente (GCAP, s.u.) vermittelt (KOCH und STRYER, 1988; DIZHOOR et al., 1994). Die gereinigte ROS-GC ist unempfindlich gegenüber der $[\text{Ca}^{2+}]$. Außer durch Ca^{2+} -freies GCAP wird die ROS-GC auch durch ATP allosterisch aktiviert (LAMBRECHT UND KOCH, 1991; FRINS, 1996; LAURA et al., 1996). Der Einfluß von ATP ist wahrscheinlich nicht auf eine Phosphorylierung zurückzuführen, da nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga den gleichen Effekt haben. Das ATP bindet intrazellulär an eine Bindungsstelle in der JMD oder der KHD, die bis jetzt nicht identifiziert wurde (LAURA et al., 1996). Die intrazelluläre allosterische Regulation durch ATP ist ein gemeinsames Merkmal der ROS-GC und der Peptidrezeptor-GC (→ 1.2.3.1).

Bis jetzt wurden zwei Isoformen der ROS-GC gefunden, ROS-GC1 und ROS-GC2 (→ 1.2.3.2). Die erste Isoform des löslichen Proteins (GCAP), das für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der ROS-GC verantwortlich ist, GCAP-1, wurde biochemisch aus Photorezeptoraußensegmenten gereinigt und kloniert (GORCZYCA et al., 1994; PALCZEWSKI et al., 1994; FRINS et al., 1996). GCAP-1 ist wahrscheinlich die häufigste Isoform von GCAP in Photorezeptoraußensegmenten (OTTO-BRUC et al., 1997a). Zwei weitere Isoformen, GCAP-2 (DIZHOOR et al., 1995) und GCAP-3 (HAESELEER et al., 1999), wurden aus der Netzhaut kloniert. Alle drei Isoformen von GCAP aktivieren jeweils beide Isoformen der ROS-GC, allerdings mit unterschiedlichen EC_{50} -Werten und unterschiedlichen Werten für die maximale Aktivierung durch GCAP. GCAP-1 ist danach ein effektiverer Aktivator für die ROS-GC1, während GCAP-2 effektiver auf die ROS-GC2 wirkt (s. z.B. GORACZNAK et al., 1998; LAURA und HURLEY, 1998; HAESELEER et al., 1999). Diese Unterschiede sind allerdings wahrscheinlich zum Teil auf die Eigenschaften der verschiedenen verwendeten Expressionssysteme zurückzuführen, so daß dadurch nicht eine GCAP-Isoform einer ROS-GC-Isoform eindeutig als physiologischer Aktivator zugeordnet werden kann. Bei immunhistochemischen Lokalisationsstudien (FRINS et al., 1996; CUENCA et al., 1998; HOWES et al., 1998; KACHI et al., 1999) wurde die stärkste Anfärbung mit GCAP-1-spezifischen Antikörpern immer in den Außensegmenten der Zapfen beobachtet. Auch die Sebstäbchenaußensegmente wurden immer durch Antikörper gegen GCAP-1 angefärbt. Dieses Verteilungsmuster entspricht dem, das für die ROS-GC1 beobachtet wurde (→ 1.2.3.2). Die Immunreaktivität gegen GCAP-2-spezifische Antikörper

war in den immunhistochemischen Studien jeweils sowohl in Stäbchen als auch in Zapfen zu beobachten, wobei neben den Außensegmenten auch Innensegmente und die synaptischen Regionen angefärbt wurden. Außerdem wurde GCAP-2 auch in Zellen der inneren Retina gefunden (OTTO-BRUC et al., 1997a; CUENCA et al., 1998; HOWES et al., 1998; KACHI et al., 1999). Auch diese Untersuchungen erlauben es nicht, GCAP-1 oder GCAP-2 eindeutig als Aktivatoren einer bestimmten ROS-GC-Isoform zu identifizieren. Die Verteilung von GCAP-3 wurde bis jetzt nicht untersucht.

Die Ca^{2+} -abhängige Regulation der ROS-GC durch GCAP erfolgt intrazellulär. Eine Deletion der ECD hat keinen Einfluß auf die Regulation durch GCAP (DUDA et al., 1996a; LAURA et al., 1996; GORACZNAK et al., 1998). Es ist unklar, ob die ECD überhaupt eine Funktion für die Regulation der neuronalen partikulären Guanylatzyklen GC-D, ROS-GC1 und ROS-GC2 hat. Ein extrazellulärer Ligand wurde bis jetzt für keine dieser drei partikulären GC gefunden. In den Außensegmenten von Sehstäbchen ist die ROS-GC hauptsächlich in den Membranen der Disks zu finden (HALLET et al., 1996; YANG und GARBERS, 1997). Damit hat die ECD der ROS-GC hier keinen Kontakt zum extrazellulären Medium. Die GC-D der olfaktorischen Rezeptorneurone wird möglicherweise ebenfalls intrazellulär durch ein GCAP-ähnliches Protein reguliert (MOON et al., 1998).

An der intrazellulären Regulation der ROS-GC durch GCAP sind wahrscheinlich mehrere Regionen der ROS-GC beteiligt. Wenn gleichzeitig die JMD und die KHD in der ROS-GC1 deletiert werden, wird die Regulation durch GCAP-1 massiv beeinträchtigt (DUDA et al. 1996a; LAURA et al., 1996). Folgestudien des Labors von Dr. R.K. Sharma zeigten, daß die Regulation durch GCAP-2 bei Deletion der JMD und der KHD erhalten bleibt und daß die Affinität der ROS-GC1 und der ROS-GC2 für GCAP-2 durch die katalytische Domäne (CCD) bestimmt werden (KRISHNAN et al., 1997; GORACZNAK et al., 1998). Im Widerspruch dazu zeigten Studien des Labors von Dr. J.B. Hurley, daß GCAP-2 die JMD/KHD der ROS-GC1 vor dem proteolytischen Abbau durch Trypsin schützt und daß die JMD/KHD die Affinität der jeweiligen ROS-GC-Isoform für GCAP-2 bestimmt (TUCKER et al., 1997; LAURA und HURLEY, 1998). Die widersprüchlichen Ergebnisse der erwähnten Studien sind möglicherweise zum Teil auf die unterschiedlichen verwendeten Expressionssysteme zurückzuführen. GCAP-2, eine Ca^{2+} -unabhängig aktivierende Mutante von GCAP-1 (s.u.) und das homologe, Ca^{2+} -unabhängig inhibierende Protein GCIP (s.u.) können sich gegenseitig aus dem Komplex mit der ROS-GC verdrängen (LI et al., 1998; RUDNICKA-NAWROT et al., 1998). Während die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, wurde durch eine Peptidstudie eine Region in der CCD der ROS-GC1 identifiziert, die wahrscheinlich eine zentrale Funktion für die Regulation durch GCAP-1 hat. Die Affinität des entsprechenden Peptides für GCAP-2 ist dabei größer als für GCAP-1 (SOKAL et al., 1999a). Die Ergebnisse der verschiedenen erwähnten Studien führen zu einem Modell, nach dem GCAP-1 und GCAP-2 in der Quartärstruktur des Komplexes mit ROS-GC1 bzw. ROS-GC2 sterisch identische oder stark überlappende Positionen einneh-

men, aber unterschiedlich stark mit verschiedenen Regionen der ROS-GC-Isoformen wechselwirken.

GCAP-1 und -2 sind homologe Ca^{2+} -bindende Proteine. Sie gehören, wie Recoverin, zur Unterfamilie der neuronalen Ca^{2+} -Sensoren in der Familie der 4-EF-Hand-Proteine, deren Prototyp das ubiquitäre Protein Calmodulin ist. In den Isoformen von GCAP bilden jeweils drei der vier EF-Hand-Signaturen (EF-Hand 2 - 4) funktionelle Ca^{2+} -Bindungsstellen. Sowohl natives GCAP-1 als auch natives GCAP-2 sind N-terminal mit Myristinsäure oder einer verwandten Fettsäure modifiziert (PALCZEWSKI et al., 1994; OLSHEVSKAYA et al., 1997). Obwohl GCAP-1 und -2 funktionell sehr ähnlich sind, ist ihre Primärstruktur nicht sehr stark konserviert (29 % Identität und 53 % Homologie der Aminosäuresequenz bei GCAP-1 und -2 aus dem Rind). Die homologen Aminosäureaustausche Y^{99}C (GCAP-1) und Y^{104}C (GCAP-2) haben unterschiedliche funktionelle Konsequenzen (DIZHOOR et al., 1998). Wahrscheinlich ist die große funktionelle Ähnlichkeit der beiden Proteine in einer homologen Tertiärstruktur mit konservierten Sekundärstrukturelementen begründet. Mutanten, bei denen die drei funktionellen EF-Hände nicht mehr fähig sind, Ca^{2+} zu binden, aktivieren die ROS-GC unabhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]$. Das gilt sowohl für GCAP-1 als auch für GCAP-2 (DIZHOOR und HURLEY, 1996; RUDNICKA-NAWROT et al., 1998). Ein homologes Protein aus Amphibien, GCIP, dessen Primärstruktur, außer einer dysfunktionellen EF-Hand 4, keine unmittelbar auffälligen Abweichungen von der Konsensussequenz für GCAP-1 und -2 zeigt (35 % bzw. 31 % Homologie zwischen GCIP und GCAP-1 bzw. GCAP-2 aus *Rana pipiens*), ist ein Ca^{2+} -unabhängiger Inhibitor der ROS-GC (LI et al., 1998). Zwei kürzlich durchgeführte Mutagenesestudien, bei denen Chimären aus GCAP-1 und Recoverin bzw. aus GCAP-2 und dem neuronalen Ca^{2+} -Sensorprotein Neurocalcin δ untersucht wurden, zeigten, daß bei GCAP-1 und GCAP-2 jeweils in etwa die selben Bereiche der Primärstruktur für die verschiedenen funktionellen Aspekte der Regulation der ROS-GC verantwortlich sind. Die verschiedenen untersuchten Mutanten hatten jeweils gleiche Einflüsse auf die Regulation der nativen ROS-GC, der heterolog exprimierten ROS-GC1 und der heterolog exprimierten ROS-GC2 (KRYLOV et al., 1999; OLSHEVSKAYA et al., 1999). Zusammengenommen unterstützen diese Studien die Vorstellung, daß der Mechanismus für die Regulation der ROS-GC durch GCAP in seinen zentralen Aspekten isoformunabhängig ist. Die Tertiärstruktur von GCAP-2 im Ca^{2+} -gebundenen Zustand wurde kürzlich aufgeklärt (AMES et al., 1999). Während der nächsten Jahre ist die Aufklärung der Struktur von Ca^{2+} -freiem GCAP-2 und die Aufklärung der Struktur von GCAP-1 zu erwarten. Damit wird es möglich sein, die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung beider Proteine im Detail zu verstehen.

Nach den oben erwähnten Mutagenesestudien ist sowohl bei GCAP-1 als auch bei GCAP-2 die Region zwischen den EF- Händen 2 und 3 zentral an der Aktivierung der ROS-GC beteiligt. Durch eine Peptidstudie, die parallel zu der vorliegenden Arbeit in unserem Labor durchgeführt wurde, wurde eine Region von 15 AS Länge zwischen den EF- Händen 2 und 3

von GCAP-1 als zentrale, Ca^{2+} -unabhängige Bindungsstelle für ROS-GC identifiziert (SCHREM et al., 1999). Auch bei anderen Studien waren Hinweise darauf gefunden worden, daß die ROS-GC und GCAP in Photorezeptoraußensegmenten unabhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]$ einen Komplex bilden (DUDA et al., 1996a; OTTO-BRUC et al., 1997b; RUDNICKA-NAWROT et al., 1998).

Ein weiteres Ergebnis der Arbeit von SCHREM et al. (1999) war, daß die ROS-GC wahrscheinlich einen Komplex mit Tubulin bildet. Bereits in frühen Arbeiten zur Charakterisierung der partikulären Guanylatzyklase aus Photorezeptoraußensegmenten wurde festgestellt, daß die GC-Aktivität selektiv in zytoskeletalen Fraktionen angereichert wurde (FLEISCHMAN und DENISEVICH, 1979; FLEISCHMAN et al., 1980). Bei der biochemischen Reinigung wird die ROS-GC zusammen mit dem Zytoskelett von den solubilisierten Membranproteinen getrennt und kann nur durch hohe Salzkonzentrationen aus der partikulären Fraktion extrahiert werden (KOCH, 1991). Von HALLETT et al. (1996) wurde gezeigt, daß das Strukturprotein Actin in einem Overlayexperiment an die ROS-GC bindet. Ob die Wechselwirkung der ROS-GC mit dem Zytoskelett nur eine Funktion für die Lokalisierung in Photorezeptoraußensegmenten hat, oder ob dadurch auch die Aktivität der ROS-GC reguliert wird, ist nicht geklärt.

1.4 Zielsetzung und experimenteller Ansatz

Die partikuläre Guanylatzyklase aus Photorezeptoraußensegmenten, ROS-GC, hat als Schnittstelle zwischen dem cGMP-Signal und dem Ca^{2+} -Signal der Lichtantwort eine zentrale Funktion für die Phototransduktion in Wirbeltieren. Die vorherrschende Isoform der ROS-GC, ROS-GC1, ist gleichzeitig der Prototyp für die neuronale Unterfamilie der partikulären Guanylatzyklasen der Wirbeltiere. Die intrazelluläre Ca^{2+} -abhängige Regulation der neuronalen Guanylatzyklasen ROS-GC1 bzw. -GC2 durch die Isoformen des Ca^{2+} -bindenden Proteins GCAP erfolgt durch einen neuartigen, noch weitgehend ungeklärten Mechanismus. Es war das Ziel dieser Arbeit, Regionen der ROS-GC1 zu identifizieren, die eine zentrale Funktion für die Regulation durch GCAP-1 haben, um dadurch zum Verständnis dieses neuartigen Regulationsmechanismus beizutragen.

Für die Identifizierung regulatorischer Regionen der ROS-GC1 sollte eine Peptidbibliothek hergestellt werden, die ausgewählte ($\rightarrow$ 1.4.1) intrazelluläre Domänen der ROS-GC1 in einem feinen Raster abbildet. Die Peptide dieser Bibliothek sollten dann in zwei Durchmusterungsansätzen eingesetzt werden, um solche Peptide zu identifizieren, die die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der ROS-GC durch GCAP stören, und um Peptide zu finden, die direkt mit GCAP-1 wechselwirken. Die identifizierten Peptide sollten dann näher untersucht werden, um die Funktion der entsprechenden Regionen der ROS-GC1 für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1 aufzuklären. Parallel dazu sollten Mutanten der ROS-GC1 hergestellt werden, bei denen die entsprechenden Regionen deletiert worden waren, um deren Funktion durch einen zweiten, unabhängigen Ansatz zu untersuchen. Die gewonnenen Ergebnisse sollten dann in einem Modell für die Ca^{2+} -abhängige Regulation der neuronalen partikulären Guanylatzyklasen integriert werden, um die Zielsetzung für weitergehende Untersuchungen definieren zu können.

1.4.1 Auswahl der untersuchten Domänen der ROS-GC1

Die ROS-GC1 ist ein großes Transmembranprotein von 1110 AS Länge. Die hergestellte Peptidbibliothek sollte die Sequenz der ROS-GC1 in einer möglichst dichten Folge überlappender Peptide abbilden, um nicht durch ein zu grobes Raster der Abbildung entscheidende Information zu verlieren. Gleichzeitig sollte der experimentelle Aufwand für die Herstellung und die Durchmusterung der Peptidbibliothek vernünftig begrenzt werden. Daher war es notwendig, eine Auswahl abzubildender Domänen aus der gesamten Primärstruktur der ROS-GC1 zu treffen.

Als diese Arbeit begonnen wurde, war bekannt, daß die Ca^{2+} -abhängige Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-1 intrazellulär erfolgt und die ECD keine Funktion für diese Regulation hat. Außerdem war bekannt, daß die Deletion der JMD/KHD zum Verlust der Regulation durch GCAP-1 führt. Nur partikuläre Guanylatzyklasen aus der neuronalen Unterfamilie wer-

den durch die Isoformen von GCAP Ca^{2+} -abhängig reguliert, im Gegensatz zu den Peptidrezeptoren GC-A, -B und -C, die durch Ligandenbindung an ihre ECD aktiviert werden. Daher wurde die Annahme gemacht, daß die Primärstruktur der Regionen der ROS-GC1, die für die Regulation durch GCAP-1 verantwortlich sind, zwischen der ROS-GC1 und der ROS-GC2 (und möglicherweise der GC-D), nicht aber zwischen der ROS-GC1 und den Peptidrezeptor-GC konserviert ist.

In Abbildung 1.5 wird der paarweise Primärstrukturvergleich der ROS-GC1 mit den neuronalen Guanylatzyklasen ROS-GC2 und GC-D (Abbildung 1.5 A,B) bzw mit den Peptidrezeptoren GC-A und GC-C (Abbildung 1.5 C,D) bildhaft in Form eines Dotplots gezeigt. Homologe Regionen in den verglichenen Proteinen erscheinen dabei als Linien, die parallel zur Diagonalen der jeweiligen Schaubilder verlaufen. Man erkennt, daß die ECD und die JMD innerhalb der Unterfamilie der neuronalen partikulären GC konserviert sind, aber nicht zwischen den neuronalen partikulären GC einerseits und den Peptidrezeptor-GC andererseits. Damit war es sehr wahrscheinlich, daß die intrazelluläre JMD Regionen enthält, die eine spezifische Funktion für die Regulation durch GCAP-1 haben. Also wurde die JMD (R⁴⁹³ bis G⁶⁰⁸ in der ROS-GC1 aus dem Rind) als erstes in die Auswahl abzubildender Domänen aufgenommen.

Keine andere Domäne der ROS-GC1 erfüllt die aufgestellten Kriterien (intrazelluläre Lokalisation und Homologie innerhalb der neuronalen Unterfamilie der partikulären GC bei gleichzeitiger Divergenz zu den Peptidrezeptor-GC). Daher wurden nach sekundären Überlegungen noch zwei weitere Domänen der ROS-GC1 in die Auswahl für die Peptidbibliothek aufgenommen. Der C-T (D¹⁰⁷⁶ - G¹¹⁰⁹) ist zwischen der ROS-GC1 und der ROS-GC2 nicht konserviert (Abbildung 1.5 A). Damit könnten Sequenzmotive im C-T der ROS-GC1 für die differentielle Regulation durch GCAP-1 und GCAP-2 verantwortlich sein oder eine Rolle für subtypspezifische Unterschiede in der Lokalisation der ROS-GC1 bzw. -GC2 spielen. Für die DD der GC-A war bekannt, daß sie eine Funktion für die Dimerisierung hat und daß eine funktionelle DD notwendig für die Aktivität der GC-A ist. Die Untersuchung von Peptiden aus der homologen DD der ROS-GC1 (R⁸⁰⁰ - P⁸⁶³) sollte Aufschluß über die Funktion dieser Domäne für die ROS-GC1 geben.

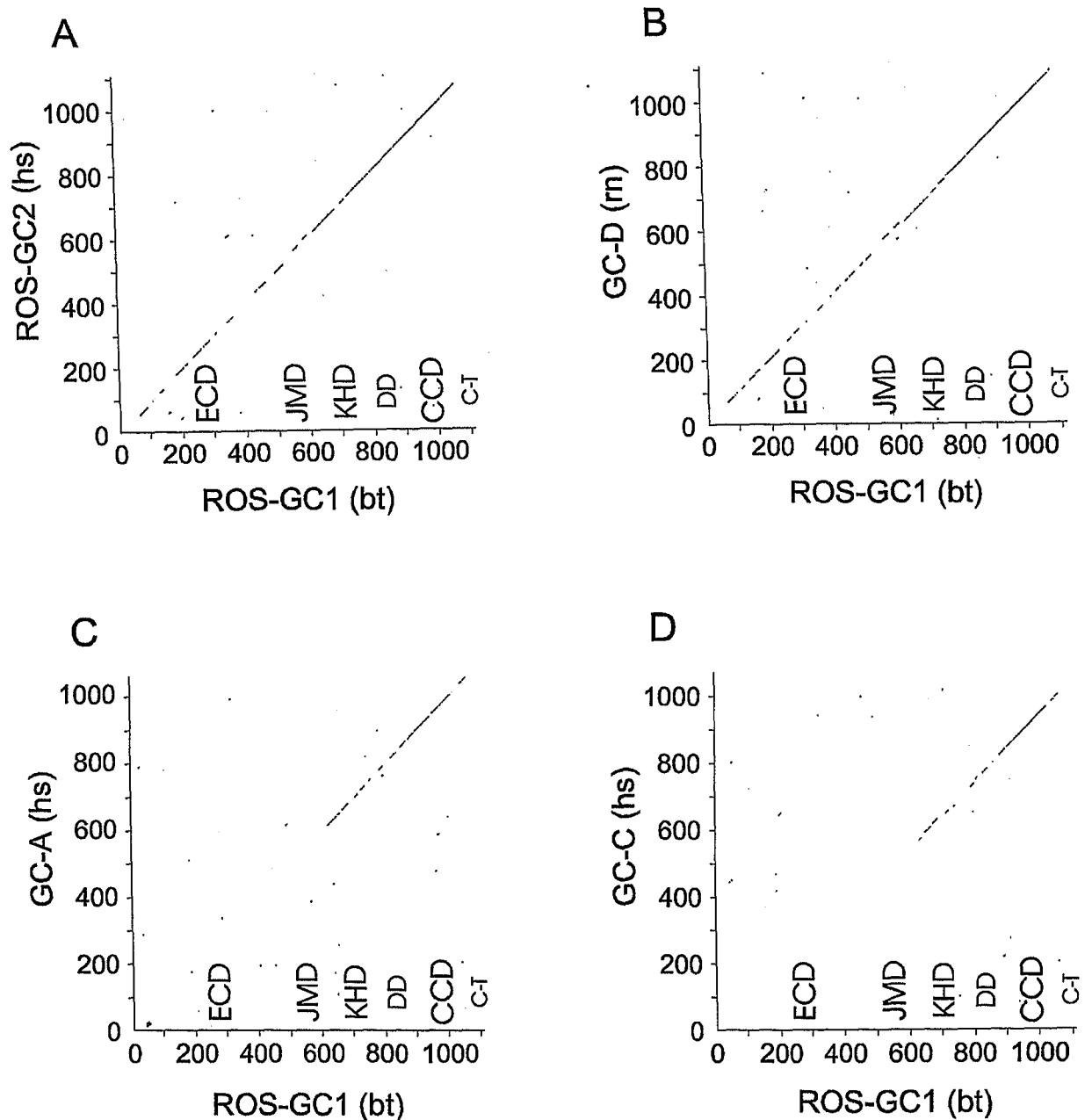


Abbildung 1.5 Primärstrukturvergleich der ROS-GC1 mit den partikulären Guanylatzyklasen ROS-GC2 (A), GC-D (B), GC-A (C) und GC-C (D) - Dotplot; Ergebnisse des paarweisen Primärstrukturvergleichs mit dem Programm PDOTPLOT, Version 3.13 (Dr. W. Bönick, IBI-1, FZ Jülich); folgende Parameter wurden eingesetzt: Vergleichsmatrix MDM-78 (SCHWARTZ und DAYHOFF, 1978), Fenster 12 AS, cutoff score 300. Schwarze Linien, die parallel zur Diagonalen eines Schaubildes verlaufen, zeigen eine signifikante Homologie zwischen Regionen der verglichenen Proteine; die Positionen der entsprechenden Regionen in den Aminosäuresequenzen der verglichenen Proteine lassen sich durch Projektion der schwarzen Linien auf die x- bzw. y-Achse ermitteln; die gepunkteten Linien zeigen die Grenzen zwischen den Projektionen von Domänen (→ Abbildung 1.3) der verglichenen partikulären GC. bt: *bos taurus*, hs: *homo sapiens*, rn: *rattus norvegicus*.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel stammten von ALEXIS, APPLICHEM, BIOMOL, BIO-RAD, BIOZYM, FLUKA, ICN, MERCK, PIERCE, RIEDEL DEHAEN, ROTH, SERVA oder SIGMA. Die Substanzen hatten die Qualität z.A. oder einen höheren Reinheitsgrad. Stickstoffgas wurde von LINDE geliefert. DNA-modifizierende Enzyme und die dazugehörigen Inkubationspuffer wurden von AMBION, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, BIOMETRA, BOEHRINGER MANNHEIM, NEW ENGLAND BIOLABS oder USB bezogen.

2.1.1.1 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc-)geschützte Aminosäurederivate

Fmoc-L-alanin	NOVABIOCHEM
N _α -Fmoc-N _γ -trityl-L-asparagin	NOVABIOCHEM
Fmoc-L-asparaginsäure-4- <i>t</i> -butylester	FLUKA
N _α -Fmoc-N _ω -[2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl]-L-arginin	NOVABIOCHEM
N _α -Fmoc-N _δ -trityl-L-glutamin	NOVABIOCHEM
Fmoc-L-glutaminsäure-5- <i>t</i> -butylester	FLUKA
Fmoc-glycin	NOVABIOCHEM
N _α -Fmoc-N _{im} - <i>t</i> -butoxycarbonyl-L-histidin·CHA	NOVABIOCHEM
N _α -Fmoc-N _{im} -trityl-L-histidin	SIGMA
Fmoc-L-isoleucin	NOVABIOCHEM
Fmoc-L-leucin	NOVABIOCHEM
N _α -Fmoc-N _ε - <i>t</i> -butoxycarbonyl-L-lysin	NOVABIOCHEM
Fmoc-L-methionin	NOVABIOCHEM
Fmoc-L-prolin	NOVABIOCHEM
Fmoc-L-phenylalanin	NOVABIOCHEM
Fmoc-O- <i>t</i> -butyl-L-serin	NOVABIOCHEM
Fmoc-O- <i>t</i> -butyl-L-threonin	FLUKA
N _α -Fmoc-N _{in} - <i>t</i> -butoxycarbonyl-L-tryptophan	SIGMA
Fmoc-O- <i>t</i> -butyl-L-tyrosin	FLUKA
Fmoc-L-valin	NOVABIOCHEM

2.1.1.2 Antikörper für den immunchemischen Nachweis von Proteinen

Protein	Antikörper	Verdünnung (v/v) (→ 2.2.2.3)
ABCR	pAK, rim A2374 (Serum; SUN und NATHANS, 1997)	1:4000
Actin	mAK, Klon C4 (ICN #69100)	1:16.000
Calmodulin	mAK (UPSTATE BIOTECHNOLOGY #05-173)	1:10.000
CNC α 1	pAK, #39 (Serum; KÖRSCHEN et al., 1999)	1:4000
CNC β 1	pAK, #21 (Serum; WIESNER et al., 1998)	1:2000
GARP	pAK, FPc52K (Serum; KÖRSCHEN et al., 1999)	1:1000
GCAP	pAK, #35+ (Serum; FRINS et al., 1996)	1:10.000
GRK1	pAK, C-20 (SANTACRUZ BIOTECHNOLOGY #sc501)	1:1000
G τ α	pAK, K-20 (SANTACRUZ BIOTECHNOLOGY #sc389)	1:10.000
PDE	pAK, #77/5 (Serum; A. Mataruga, IBI-1, FZ Jülich, Jülich)	1:2000
Recoverin	pAK, #2/3 (Serum; LAMBRECHT und KOCH, 1992)	1:5000
RGS9	pAK, CT317 (Serum; Dr. M. Zoche, CalTech, Pasadena, USA)	1:10.000
ROS-GC	pAK, #3+ (gereinigtes Serum; KOCH et al., 1994)	1:5000
Tubulin α	mAK, Klon B-5-1-2 (SIGMA T-5168)	1:50.000

2.1.2 Geräte und Materialien

Die chromatographischen Schritte bei Proteinreinigungen wurden an einer FPLC-Anlage (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) oder einer HPLC-Anlage (LKB BROMMA) durchgeführt. Nukleotid- und Peptidlösungen wurden mit einer HPLC-Anlage (WATERS) chromatographisch aufgetrennt. Die Extinktion von Protein- und DNA-Lösungen wurde mit einem U-1100 Photometer (HITACHI) bestimmt. UV/VIS-Spektren wurden mit einem Cary 1 UV/Visible Spektralphotometer (VARIAN) gemessen. SPR-spektroskopische Messungen wurden mit einem BIAcore Gerät (BIAcore, vorm. PHARMACIA BIOSENSOR) durchgeführt. Oligonukleotide wurden mit einem DNA Synthesizer 391 (APPLIED BIOSYSTEMS) synthetisiert. Dialysen wurden mit Visking Dialysesschläuchen (SERVA) oder Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (PIERCE) durchgeführt. Es wurden Ultrazentrifugen der Typen L7-65 und TL100 (BECKMAN) und Laborzentrifugen der Typen J2-21 (BECKMAN), 2K15, 3K12 (SIGMA) und 5415C (EPPENDORFF) eingesetzt. Ein Speedvac Plus SC110 Vakuumkonzentrator (SAVANT) wurde benutzt, um Proben zu lyophilisieren.

Rinderaugen wurden vom Schlachthof Düsseldorf bezogen.

2.1.3 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt, wenn nicht anders angegeben.

Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Tris-EDTA-Puffer (TE)	
137 mM NaCl	10 mM Tris·HCl	pH 8,0
2,7 mM KCl	1 mM Na ₂ EDTA	
6,5 mM Na ₂ HPO ₄		
1,5 mM KH ₂ PO ₄		pH 7,4

2.1.4 Bakterienstämme

XL1-blue (<i>E.coli</i> K12)	<i>recA1 endA1 gyrA96(Naf) thi-1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 relA1 lac [F':proA⁺B⁺, lac^r Δ(lacZ)M15 Tn10(tet^r)]</i> ; (BULLOCK et al., 1987; STRATAGENE).
BL21(DE3) (<i>E.coli</i> B)	F ⁻ <i>ompT [lon] hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal[dcn]</i> (DE3); (NOVAGEN).

2.1.5 Plasmide

pBluescript SK(-)	wurde als Vektor für die Klonierung und Vermehrung rekombinanter DNA verwendet; (STRATAGENE).
pBB131	wurde für die Expression der N-Myristoyltransferase-1 aus <i>S.cerevisiae</i> in <i>E.coli</i> eingesetzt; (DURONIO et al., 1990).
pcDNA3	wurde als Vektor für die transiente Expression von ROS-GC1 in HEK293-Zellen verwendet; (INVITROGEN).
pET21a(+)	wurde als Vektor für die Expression von GCAP-1 in <i>E.coli</i> BL21(DE3) verwendet; (NOVAGEN).
pRSV-Tag	wurde zur Expression von SV40 T-Antigen in HEK293-Zellen eingesetzt; (DHALLAN et al., 1990).

2.1.6 Molekulargewichtsstandards

2.1.6.1 Proteinstandards für die SDS-PAGE

„Low Molecular Weight Calibration Kit“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

Phosphorylase b	94 kDa	128 µg/ml
BSA	67 kDa	166 µg/ml
Ovalbumin	43 kDa	294 µg/ml
Carbonatanhydrase	30 kDa	166 µg/ml
Soyabohnen-Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa	176 µg/ml
α-Lactalbumin	14,4 kDa	242 µg/ml

„High Molecular Weight Calibration Kit“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)

Myosin	212 kDa	50 µg/ml
α ₂ -Makroglobulin	170 kDa	200 µg/ml
β-Galaktosidase	116 kDa	32 µg/ml
Transferrin	76 kDa	34 µg/ml
Glutamatdehydrogenase	53 kDa	36 µg/ml

2.1.6.2 DNA-Standard für die Elektrophorese

λ-DNA, EcoRI-/HindIII-Fragmente (MBI FERMENTAS)

21226 bp	29,18 ng/µl
5148 bp	7,08 ng/µl
4973 bp	6,84 ng/µl
4268 bp	5,87 ng/µl
3530 bp	4,85 ng/µl
2027 bp	2,79 ng/µl
1904 bp	2,62 ng/µl
1584 bp	2,35 ng/µl
1375 bp	1,89 ng/µl
947 bp	1,30 ng/µl
831 bp	1,14 ng/µl
564 bp	0,78 ng/µl
125 bp	0,17 ng/µl

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 Bestimmung von Protein- und Peptidkonzentrationen

2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen löslicher Proteine wurden nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt.

Dafür wurde das „Protein Assay“ Farbstoffkonzentrat (BIO-RAD) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Extinktion bei 595 nm wurde gemessen. Als Standard wurde Albumin aus Rinderserum verwendet.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz 10B

Die Proteinkonzentrationen von Proben, die Detergentien oder Lipide enthielten, wurden mit dem Farbstoff Amidoschwarz 10B bestimmt.

Dafür wurde die Proteinprobe mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Nacheinander wurden 20 µl 10 % (w/v) SDS, 30 µl 1 M Tris-HCl pH 7.5 mit 1 % (w/v) SDS und 60 µl 104 % (w/v) Trichlor-essigsäure (TCA) zugegeben. Nach 3 - 30 min Inkubation wurde die Lösung auf eine MILLIPORE HA-Filtermembran II 0,45 µm aufgetragen, die mit 6 % (w/v) TCA gewaschen worden war. Die Membran wurde mit 2 - 3 ml 6 % (w/v) TCA nachgewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine 10 min mit Amido-Färbelösung (0,5 % (w/v) Amidoschwarz 10B in Methanol, Essigsäure und Wasser (45:10:45 v/v)) gefärbt. Die Membran wurde nacheinander einmal mit Wasser, dreimal mit Amido-Entfärbelösung (Methanol, Essigsäure und Wasser (90:2:8 v/v)) und einmal mit Wasser gewaschen. Der gebundene Farbstoff wurde in Lösung gebracht, indem die Membran 20 min mit 1 ml Amido-Lösungsmittel (25 mM NaOH; 50 µM Na₂EDTA; 50 % (v/v) Ethanol) inkubiert wurde. Die Extinktion der Lösung bei 630 nm wurde gemessen. Als Standard wurde Albumin aus Rinderserum verwendet.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure

Die Konzentrationen von Peptidlösungen wurden durch die Bildung von Cu²⁺-Bicinchoninsäurekomplexen bestimmt (SMITH et al., 1985).

Dafür wurde das „BCA Protein Assay Reagent Kit“ (PIERCE) eingesetzt. Das „Kit“ enthielt zwei Reagenzlösungen, aus denen nach Angaben des Herstellers eine Arbeitslösung hergestellt wurde. Für die Farbreaktion wurden 50 µl Peptidlösung mit 1 ml der Arbeitslösung gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 60°C inkubiert. Nachdem der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Als Standard wurde Albumin aus Rinderserum verwendet.

2.2.2 Elektrophoretische Trennung und Analyse von Proteinen

2.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in pH-diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von LAEMMLI (1970) elektrophoretisch getrennt (SDS-PAGE). Die Sammelgele enthielten 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS und 5,1 % (w/v) Polyacrylamid. Die Trenngele enthielten 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS und 7,5 - 20 % (w/v) Polyacrylamid. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid betrug 37,5:1 (w/w). Der Elektrodenpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS. Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,2; 12,5 % (v/v) Glycerin; 1 % (w/v) β -Mercaptoethanol; 1,6 % (w/v) SDS; 0,13 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in Minigel-Kammern (BIOMETRA; 1 x 80 x 100 mm) mit 15 - 30 mA pro Gel. Die aufgetrennten Proteine wurden mit COOMASSIE Brilliant Blue R250 (MEYER UND LAMBERTS, 1965) oder kolloidalem Silber (WRAY et al., 1981) gefärbt oder auf Blotmembranen übertragen ($\rightarrow$ 2.2.2.2).

2.2.2.2 Transfer von Proteinen auf Blotmembranen

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach dem Halbtrockenverfahren (TOWBIN et al., 1979) auf ImmobilonP Blotmembranen (MILLIPORE) übertragen (geblottet). Der Transfer wurde mit einer Milliblot-Kammer (MILLIPORE) entsprechend der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die Stromstärke betrug 2,5 mA/cm².

2.2.2.3 Immunchemischer Nachweis geblotteter Proteine

Die übertragenen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern markiert, die über Meerrettichperoxidase-(HRP-)gekoppelte Zweitantikörper nachgewiesen wurden.

Nach dem Transfer der Proteine wurden unspezifische Bindungsstellen der Blotmembran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit 1 % (w/v) Magermilchpulver und 0,05 % (w/v) Tween20 in PBS blockiert. Die Membran wurde mit Waschpuffer (PBS, 0,05 % (w/v) Tween20) gewaschen und 1 h mit einer Verdünnung des Erstantikörpers ($\rightarrow$ 2.1.1.2) in Waschpuffer markiert. Anschließend wurde die Membran gewaschen, um nicht-gebundenen Erstantikörper zu entfernen und 1 h mit Zweitantikörper (anti-mouse- bzw. anti-rabbit-HRP, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH; 1:5000 (v/v)) in Waschpuffer mit 0,1 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Danach wurde mit PBS gewaschen und der Antigen-Antikörperkomplex mit dem „ECL Westernblot Detection Kit“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) oder dem „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ (PIERCE) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers nachgewiesen.

Die gebundenen Antikörper wurden nach Bedarf von der Blotmembran abgewaschen (gestrippt), um weitere Proteine immunchemisch nachzuweisen. Dafür wurde die Membran in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris·HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol) 1 h auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit PBS gewaschen und das nächste Protein nach der oben beschriebenen Methode nachgewiesen.

Wenn keine weiteren Proteine immunchemisch nachgewiesen werden sollten, wurden alle gebundenen Proteine mit Amidoschwarz 10B gefärbt. Dafür wurde die Membran 5 min in Amido-Färbelösung ($\rightarrow$ 2.2.1.2) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Amido-Entfärbelösung und Methanol gewaschen und getrocknet.

2.2.3 Anzucht von *Escherichia coli*

Escherichia coli wurden in LB-Medium (10 g/l NaCl, 10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt) oder auf LB-Agarplatten (15 g/l Agar in LB-Medium) bei 37°C kultiviert. Die Zellen in Flüssigkulturen mit 5 ml Volumen wurden in einem Rotationsinkubator (NEW BRUNSWICK) vermehrt. Für größere Kulturen wurde ein Warmluftschüttler (BRAUN-DISSEL) verwendet. Die Kulturen wurden mindestens 8 h bei 37°C inkubiert. Zur Selektion wurden dem Medium nach Bedarf Antibiotika zugesetzt. Dabei wurden die folgenden Konzentrationen eingesetzt: 100 μ g/ml Ampicillin, 12,5 μ g/ml Chloramphenicol, 30 μ g/ml Kanamycin, 15 μ g/ml Tetracyclin. Flüssigkulturen und Platten wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.1 Kompetente Zellen für die Transformation mit DNA-Plasmiden

Kompetente Zellen wurden nach der Methode von MANDEL und HIGA (1970) hergestellt. LB-Medium (50 ml) wurde mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,3 - 0,4 vermehrt. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden bei 4°C mit 3000 g pelletiert und in 25 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in 5 ml 0,1 M $CaCl_2$ mit 25 % Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert und 3 - 4 h auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.4 Reinigung von Plasmid-DNA

2.2.4.1 Alkalische Minipräparation

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von BIRNBOIM und DOLY (1979) gereinigt. Die Zellen aus 1 - 3 ml Kultur wurden mit 15.000 g pelletiert, in 50 μ l Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris·HCl pH 8,0, 10 mM Na_2EDTA) resuspendiert und mit 60 μ l Lösung II (0,1 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) lysiert. Die Lösung wurde mit 75 μ l 3 M Kaliumacetat pH 4,8 angesäuert. Der entstandene Kaliumdodecylsulfat-Niederschlag wurde bei 4°C mit 17.000 g ab-

zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 180 µl Phenol und CHCl_3 (1:1 v/v) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgenommen. Die Plasmid-DNA und RNA wurden mit 550 µl Ethanol ausgefällt. Die Nukleinsäuren wurden mit 17.000 g pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in TE mit 4 µg/ml RNase-Mix (AMBION) aufgenommen, um die enthaltene RNA zu verdauen. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde für Klonierungen (→ 2.2.8, 2.2.9) und für die PCR (→ 2.2.11) verwendet.

2.2.4.2 Lithiumchlorid-Präparation

Für die Transfektion von HEK293-Zellen (→ 2.7.2) wurden größere Mengen Plasmid-DNA nach der Lithiumchlorid-Methode gereinigt.

Dafür wurden die Zellen aus 250 ml Kultur pelletiert und in 20 ml Lösung I (→ 2.2.4.1) resuspendiert. Nacheinander wurden 24 ml Lösung II und 30 ml 3 M Kaliumacetat pH 4,8 zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde mit 5000 g abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden mit 75 ml Isopropanol die Plasmid-DNA und RNA gefällt und mit 5000 g pelletiert. Die Nukleinsäuren wurden in 1,5 ml 33 mM Tris·HCl pH 7,5 gelöst. Die RNA wurde mit 2,5 ml eiskaltem 4 M LiCl gefällt und 5 min mit 5000 g abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 10 ml Ethanol (-20°C) aus dem Überstand gefällt und pelletiert. Die DNA wurde in 500 µl TE mit 10 µg/ml RNase-Mix (AMBION) gelöst und 10 min bei 37°C inkubiert, um die restliche RNA zu verdauen. Die Lösung wurde zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol und CHCl_3 (1:1 v/v) und einmal mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Anschließend wurden 50 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 zugegeben. Die Plasmid-DNA wurde mit 1,5 ml Ethanol ausgefällt und mit 17.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in TE aufgenommen.

2.2.4.3 Lithiumchlorid-Minipräparation

Für die Sequenzierung (→ 2.2.7) wurde Plasmid-DNA durch eine alkalische Minipräparation mit zusätzlichem LiCl-Fällungsschritt gereinigt.

Die Zellen aus 5 ml Kultur wurden pelletiert und in 150 µl Lösung I resuspendiert. Nacheinander wurden 180 µl Lösung II (→ 2.2.4.1) und 225 µl 3 M Kaliumacetat pH 4,8 zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde mit 17.000 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Plasmid-DNA und RNA mit 1,5 ml kaltem Ethanol gefällt (17.000 g bei 4°C) und in 60 µl 33 mM Tris·HCl pH 7,5 gelöst. Die RNA wurde mit 100 µl 4 M LiCl gefällt und abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit 500 µl Ethanol gefällt und pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in TE mit 4 µg/ml RNase-Mix (AMBION) aufgenommen.

2.2.5 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

2.2.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Oligonukleotiden (Primern) wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Der spezifische dekadische Extinktionskoeffizient von Oligonukleotiden bei 260 nm beträgt $0,03 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung durch Ethidiumbromid-Fluoreszenzfärbung

DNA-Proben wurden in Agarosegelen, denen $1 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugesetzt worden war, elektrophoretisch getrennt ($\rightarrow$ 2.2.6). Die DNA wurde durch UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht. Die DNA-Menge in der Probe wurde durch einen Vergleich mit dem Molekulargewichtsstandard ($\rightarrow$ 2.1.6.2) abgeschätzt.

2.2.6 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern (GNA 100, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) mit 120 mV elektrophoretisch getrennt. Die Gele enthielten 0,75 - 1,5 % (w/v) Agarose und $1 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in Elektrophoresepuffer. Der Elektrophoresepuffer enthielt 40 mM Tris-Essigsäure pH 7,5 und 1 mM Na_2EDTA . Die DNA-Proben wurden in Elektrophoresepuffer mit 5 % (w/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau und 0,02 % (w/v) Xylencyanol aufgenommen.

2.2.7 Sequenzierung von DNA

DNA wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977) sequenziert.

2.2.7.1 Sequenzierung mit radioaktiv markierten Nukleotiden

Die Sequenzierung mit radioaktiv markierten Nukleotiden wurde mit dem „Sequenase 2.0 Kit“ (USB) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Sequenzierungen von DNA im Plasmidvektor pBluescript SK(-) wurden die Primer M13 Uni und M13 Rev (USB; $\rightarrow$ Anhang C.2) eingesetzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt etwa 250 ng Plasmid-DNA pro kbp und $2,5 \mu\text{Ci}$ ($\alpha^{35}\text{S}$)dATP, um die Kettenabbruchfragmente radioaktiv zu markieren. Die Reaktionsgemische wurden in einer S2 Gelkammer (BRL) elektrophoretisch getrennt. Die 0,4 mm dicken Gele enthielten 6 % (w/v) Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (19:1) und 7 M Harnstoff in Elektrophoresepuffer. Der Elektrophoresepuffer enthielt 40 mM Tris-Borsäure pH 7,8 und 1 mM Na_2EDTA . Nach der Elektrophorese (2 h mit 65 W bzw. 16 h mit 20 W) wurden die Gele 20 min mit 5 % (w/v) Essigsäure in 5 % (v/v) Ethanol fixiert und auf Filterpa-

pier (WHATMAN) im Vakuum getrocknet. Die radioaktiv markierten Kettenabbruchfragmente wurden durch Autoradiographie mit XAR5 Röntgenfilmen (KODAK) nachgewiesen.

2.2.7.2 Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern

Für die Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern wurde eine PCR (→ 2.2.10) durchgeführt. Für Sequenzierungen von DNA im Plasmidvektor pBluescript SK(-) wurden die Primer #9001 und #9002 (MWG BIOTECH; → Anhang C.2) eingesetzt. Die Sequenzreaktionen wurden mit dem „Thermo Sequenase-Kit“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) nach den Angaben des Herstellers in einem Volumen von je 3 µl angesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten etwa 100 ng Plasmid-DNA pro kbp und je 86 nM der beiden Primer. Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 min	94°C	}	30 Zyklen
40 s	94°C		
40 s	50°C		
1 min	70°C		

Anschließend wurden 3 µl Stoppuffer (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) zugegeben und die Reaktionsgemische 2 min auf 70°C erhitzt. Die Reaktionsgemische wurden in einem LICOR DNA Sequencer Long ReadIR 4200 (MWG BIOTECH) elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Die Gele (66 cm x 0,25 mm) enthielten 11,2 % (v/v) RapidGel XL (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH; 4,6 % (w/v) Acrylamid), 1 % (v/v) DMSO und 7 M Harnstoff in Elektrophoresepuffer. Der Elektrophoresepuffer enthielt 134 mM Tris, 45 mM Borsäure und 2,5 mM Na₂EDTA. Während der Elektrophorese (8 - 12 h mit 45 W bei 45°C) wurde die Fluoreszenz der markierten Kettenabbruchfragmente automatisch registriert. Die Daten wurden mit dem Programmpaket BaselmageIR (LICOR) aufgezeichnet und ausgewertet.

2.2.8 Modifizierung von DNA

2.2.8.1 Restriktionsverdau

Doppelsträngige DNA (Plasmide oder PCR-Produkte) wurde nach Bedarf mit 1 - 2 U Restriktionsendonuclease pro µg DNA unter den vom Hersteller angegebenen Inkubationsbedingungen verdaut (geschnitten).

2.2.8.2 Auffüllen einzelsträngiger Enden

Überhängende 5'-Enden von geschnittener DNA wurden nach Bedarf mit dem Klenow-Fragment der *E.coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Der Reaktionsansatz enthielt 2 U Klenow-Polymerase pro µg DNA und 100 µM dNTP in NEB 3 Restriktionspuffer (NEW ENGLAND BIOLABS). Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.9.1 Isolation aus Agarosegelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im Gel durch UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Gelstücke mit der DNA wurden mit 7000 g über eine Fritte aus silanisierter Glaswolle zentrifugiert. Aus dem Eluat wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 3 Volumina Ethanol gefällt und pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in Wasser oder TE aufgenommen.

2.2.9.2 Ligation

Die DNA-Fragmente wurden in geeignet geschnittene und nach Bedarf aufgefüllte (→ 2.2.8) Plasmidvektoren ligiert. Die Ligationsansätze enthielten 30 - 100 ng Plasmidvektor, das DNA-Fragment im 3- bis 4-fachen molaren Überschuß und 1 U T4-DNA-Ligase (BOEHRINGER MANNHEIM) in 20 µl des dazugehörigen Inkubationspuffers. Die Reaktionsdauer betrug 2 h bei 22°C bzw. 18 h bei 16°C.

2.2.9.3 Transformation

Für die Transformation von *E.coli* wurden die Ligationsansätze mit Wasser auf 50 - 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1/10 Volumen 10 x CM (100 mM CaCl₂ und 400 mM MgCl₂) zugegeben. Die Ansätze wurden mit dem gleichen Volumen kompetenter Zellen (→ 2.2.3.1) vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde für 1 min auf 42°C erhitzt und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension mit dem gleichen Volumen LB-Medium (→ 2.2.3) verdünnt und 30 min bei 37°C inkubiert, damit sich die Antibiotika-Resistenz der transformierten Zellen ausprägen konnte. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.2.10 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide (Primer) wurden mit einem automatischen DNA Synthesizer (APPLIED BIOSYSTEMS) dargestellt. Die synthetisierten Primer wurden über Nacht bei 55°C mit 33 % (w/v) NH₃ von der Festphase abgespalten. Die entstandene Lösung wurde lyophilisiert und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Aus dem Überstand wurden die Oligonukleotide mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und drei Volumina Ethanol gefällt und mit 17.000 g pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in Wasser oder TE aufgenommen.

Die Sequenzen aller verwendeten Primer werden in Anhang C aufgeführt.

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion PCR (SAIKI et al., 1988) wurde eingesetzt, um ein DNA-Fragment mit der kodierenden Sequenz für GCAP-1 zu amplifizieren und für die Klonierung vorzubereiten (→ 2.4.1).

Der Reaktionsansatz enthielt etwa 100 ng Plasmid-DNA, je 200 ng der Primer, je 200 nM dNTP und 1 U PrimeZyme DNA-Polymerase (BIOMETRA) in 100 µl des dazugehörigen Inkubationspuffers. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 min	94°C	}	15 Zyklen
45 s	94°C		
45 s	45°C		
90 s	72°C		
2 min	72°C		

Außerdem wurde die PCR eingesetzt, um DNA zu sequenzieren (→ 2.2.7.2).

2.2.12 Kulturbedingungen für HEK293-Zellen

HEK293 ist eine humane, embryonale, adenoviral transformierte Zelllinie.

Die Zellen wurden in Nährmedium M10 (Minimal Essential Medium mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1 % nichtessentiellen Aminosäuren und 1 % Antibiotika / Antimykotika; GIBCO BRL) bei 37°C, 5 % (p/p) CO₂ und etwa 95 % Luftfeuchtigkeit auf Petrischalen kultiviert. Ihre Generationszeit beträgt unter diesen Bedingungen etwa 24 h.

Bei einer Zelldichte von etwa 10⁷, entsprechend 90 % Konfluenz, wurden die Zellen aufgeteilt und in neue Kulturschalen umgesetzt (gesplittet). Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (GIBCO BRL) bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 8 - 10 ml Medium aufgenommen und ihre Dichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Zellerhaltung wurden 1,5 x 10⁵ Zellen pro Ø 9 cm-Schale in frischem Medium ausgesät. Nachdem die Zellen 25-mal umgesetzt worden waren, wurden sie verworfen und ein neues Aliquot tiefgefrorener Zellen wurde in Kultur genommen.

Für die Lagerung wurden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (60 - 70 % Konfluenz) geerntet und in einer Dichte von 2 x 10⁶ Zellen/ml in M10 mit 10 % (v/v) DMSO in flüssigem N₂ eingefroren. Für die Wiederaussaat wurden die Zellen aufgetaut und in 10 ml Medium, das auf 37°C vorgewärmt worden war, aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min mit 200 g abzentrifugiert, in 3 - 5 ml Medium resuspendiert und zu 5 x 10⁵ auf Ø 9 cm-Schalen ausgesät.

2.2.13 Ca^{2+} -Puffer

Die freie Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) in experimentellen Ansätzen wurde mit EGTA gepuffert. Dafür wurden den Ansätzen Stammlösungen von 0,5 M $\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$ und 0,5 M K_2CaEGTA in bestimmten Verhältnissen zugesetzt. Die Lösung von 0,5 M K_2CaEGTA wurde nach der photometrischen Methode von TSIEN und POZZAN (1989) hergestellt. Die $[\text{Ca}^{2+}]$ in den experimentellen Ansätzen wurde mit dem Programm CHELATOR (SCHOENEMAKERS et al., 1992) mit Stabilitätskonstanten nach MARTELL und SMITH (1974) berechnet. In Tabelle 2.1 werden die berechneten $[\text{Ca}^{2+}]$ in MgGC-Puffer ($\rightarrow$ 2.9) bei 30°C und einer EGTA-Gesamtkonzentration ($[\text{EGTA}]_{\text{total}}$) von 2 mM angegeben.

Tabelle 2.1 **Berechnete $[\text{Ca}^{2+}]$ in EGTA- Ca^{2+} -Puffern;** die Berechnungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt: Temperatur 30°C, Äquivalentenstärke 0,11 M, pH 7,1, 40 mM pH-Puffer (MOPS-KOH), 2 mM GTP, 2 mM $[\text{EGTA}]_{\text{total}}$ und 10 mM Mg^{2+} .

$[\text{K}_2\text{CaEGTA}]/[\text{EGTA}]_{\text{total}}$	$[\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}]$ (mM)	$[\text{K}_2\text{CaEGTA}]$ (mM)	$[\text{Ca}^{2+}]$ (berechnet)
0	2,0	- ¹	0,8 nM
0,1	1,8	0,2	34,8 nM
0,2	1,6	0,4	78,5 nM
0,3	1,4	0,6	135 nM
0,4	1,2	0,8	210 nM
0,5	1,0	1,0	315 nM
0,6	0,8	1,2	473 nM
0,7	0,6	1,4	737 nM
0,8	0,4	1,6	1,26 μM
0,9	0,2	1,8	2,81 μM
1,0	-	2,0	23,5 μM

¹ in die Berechnung wurde eine Ca^{2+} -Gesamtkonzentration von 5 μM eingesetzt, um den Restgehalt von Ca^{2+} in bidestilliertem Wasser zu berücksichtigen.

Die Stammlösungen wurden photometrisch überprüft. Dafür wurden die Stammlösungen in bestimmten Verhältnissen gemischt und mit Br_2BAPTA -Puffer (95 mM KCl; 10 mM HEPES-KOH pH 7,0; 10 μM Br_2BAPTA) auf 2 mM $[\text{EGTA}]_{\text{total}}$ verdünnt. Die Extinktion bei 264 nm wurde gemessen ($\rightarrow$ Abbildung 2.1).

Mit einer apparenten Dissoziationskonstante $K^{Ca}(\text{Br}_2\text{BAPTA})$ von 1,58 μM (HARRISON und BERS, 1987) wurde eine Eichkurve berechnet.

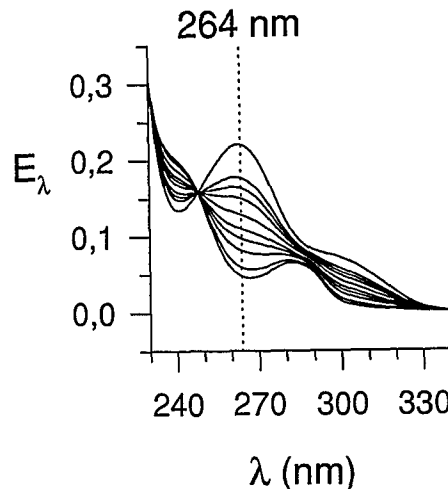


Abbildung 2.1 Ca^{2+} -Abhängigkeit des Spektrums von Br_2BAPTA ; 10 μM Br_2BAPTA in 95 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH pH 7,0 und 2 mM $[\text{EGTA}]_{\text{total}}$; $[\text{K}_2\text{CaEGTA}]/[\text{EGTA}]_{\text{total}} = 0, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0$ und 1,5 (2 mM K_2CaEGTA + 1 mM CaCl_2); das entspricht $[\text{Ca}^{2+}] = <1 \text{ nM}, 535 \text{ nM}, 781 \text{ nM}, 1,09 \mu\text{M}, 1,80 \mu\text{M}, 2,80 \mu\text{M}, 3,97 \mu\text{M}, 6,50 \mu\text{M}, 22,0 \mu\text{M}$ und 1 mM. Die Spektren wurden bei 22°C gemessen.

2.3 Peptidsynthese

2.3.1 Synthese einer Peptidbibliothek aus ROS-GC1

Eine Bibliothek von 92 überlappenden 12-meren Peptiden aus der Sequenz der ROS-GC1 ($\rightarrow$ Anhang D.1) wurde mit dem „Multipin Peptide Synthesis (MPS) Kit“ (CHIRON MIMOTOPES) hergestellt. Als Festphase wurden Kronen (MacroCrown) mit einer Kapazität von 10 μmol eingesetzt, die mit Rink'schen Amidankern (RINK, 1987) funktionalisiert waren. Mit dieser Ankergruppe erhält man Peptide, deren C-Terminus als Säureamid vorliegt. Die Synthese erfolgte in wasserfreiem DMF. Für die Kopplung wurden Fmoc-geschützte Aminosäurederivate ($\rightarrow$ 2.1.1.1; 200 mM) mit N,N'-Diisopropylcarbodiimid (200 mM) und 1-Hydroxybenzotriazol (240 mM) aktiviert. Die gekoppelten Aminosäurederivate wurden mit 20 % (v/v) Piperidin in DMF N-terminal entschützt. Nach 12 Kopplungszyklen wurden die synthetisierten Peptide mit 3 % (v/v) Essigsäureanhydrid und 0,5 % (v/v) N,N-Diisopropylamin in DMF N-terminal acetyliert. Die Peptide wurden mit einem Gemisch von Trifluoressigsäure (TFA), Dichlormethan, Wasser und Triethylsilan (100:100:4:6 v/v) von der Festphase abgespalten, womit gleichzeitig die Seitenketten der Aminosäuren entschützt wurden. Aus der entstandenen Lösung wurden die Peptide mit vier Volumina Diethylether, *n*-Hexan und β -Mercaptoethanol (500:500:1 v/v) ausgefällt und im N_2 -Strom getrocknet. Der Rückstand wurde in Essigsäure, Wasser und Acetonitril (10:110:80 v/v) aufgenommen und im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt.

Die synthetisierten Rohpeptide wurden bei -20° C gelagert.

2.3.2 Synthese einzelner Peptide

Einzelne Peptide für weiterführende Untersuchungen wurden von Dr. M. Beyermann, FMP Berlin, synthetisiert und gereinigt (ZOCHE et al., 1996). Die lyophilisierten Peptide wurden bei -20° C gelagert.

Die Identität der synthetisierten Peptide wurde massenspektrometrisch bestätigt. Die Reinheit der Präparationen wurde von Dr. Beyermann durch analytische HPLC bestimmt.

Die Konzentration dieser Peptide wurde in den damit durchgeführten Experimenten aus der Einwaage berechnet.

2.4 Expression und Reinigung von rekombinantem GCAP-1

2.4.1 Konstruktion des Expressionsplasmids

Das Ausgangsmaterial für die Konstruktion eines Expressionsplasmides für GCAP-1 war der cDNA-Klon GCAP(5) (FRINS et al., 1996). Die für GCAP-1 kodierende cDNA wurde durch eine PCR (→ 2.2.10; 15 Zyklen) mit GCAP(5) als Matrize amplifiziert. Als Primer wurden die Oligonukleotide #1940 und #1941 (→ Anhang C.1) eingesetzt. Dadurch enthielt das Reaktionsprodukt 5'-wärts vom Startcodon der kodierenden Sequenz Restriktionsschnittstellen für BamHI und NcoI, 3'-wärts von der kodierenden Sequenz ein zusätzliches Stopcodon und eine Schnittstelle für EcoRI. Das Reaktionsprodukt wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten, in den entsprechend geschnittenen Vektor pBluescript SK(-) kloniert und sequenziert (→ 2.2.7).

Das GCAP-1/pBluescript-Plasmid wurde mit NcoI linearisiert und die Enden mit Klenow-Polymerase geglättet (→ 2.2.8.2). Die für GCAP-1 kodierende cDNA wurde mit EcoRI ausgeschnitten. Der Expressionsvektor pET21a(+) wurde mit NdeI linearisiert, mit Klenow-Polymerase geglättet und mit EcoRI geschnitten. Die ausgeschnittene für GCAP-1 kodierende cDNA wurde dann in den so vorbereiteten Expressionsvektor kloniert.

2.4.2 Expression

Escherichia coli BL21(DE3) wurden mit den Plasmiden GCAP-1/pET21a(+) und pBB131 (→ 2.1.5) kotransformiert. Eine Kolonie transformierter Zellen wurde in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin über Nacht vermehrt. Die Kultur wurde 3:1 (v/v) mit 87 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Expression wurde 1 l LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin enthielt, mit 1 ml der Glycerinkultur angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 vermehrt. Dann wurden 50 µg/ml Myristinsäure zugesetzt. Nach 30 min wurde die Expression von GCAP-1 mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach weiteren 4 h wurden die Zellen 15 min mit 1800 g pelletiert, in 250 ml eiskaltem Tris·HCl pH 8,0 resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

2.4.3 Solubilisierung des rekombinanten GCAP-1

Die Bakteriensuspension (→ 2.4.2) wurde aufgetaut. Die Suspension wurde mit 100 µg/ml Lysozym (SERVA), 10 units/ml DNaseI (TAKARA) und 0,1 % (w/v) Tween20 versetzt und 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 1 mM DTT und 0,1 mM PMSF zugegeben. Die unlöslichen Bestandteile wurden 20 min mit 370.000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 250 ml Solubilisierungspuffer (6 M Guanidinium·HCl; 0,1 mM PMSF; 1 mM DTT) aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandene Lösung wurde bei 4°C dreimal gegen 5 l 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 1 mM DTT und 1 mM EDTA und zweimal gegen 5 l 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 1 mM DTT und 200 µM CaCl₂ dialysiert. Das ausgefallene Material wurde 20 min mit 370.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Centriplus Zentrifugalkonzentratoren (AMICON; MWCO 10 kDa) bei 3000 g und 4°C auf höchstens 5 ml eingengt.

2.4.4 Gelfiltration

Eine Superdex75 XK16/60 Gelfiltrationssäule (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) wurde mit 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 100 mM NaCl und 200 µM CaCl₂ äquilibriert. Das Totvolumen der Säule beträgt etwa 40 ml, das Gesamtvolumen 120 ml. Das eingengte Dialysat (→ 2.4.3) wurde aufgetragen und mit einer Flußrate von 0,2 - 1 ml/min aufgetrennt. Fraktionen von jeweils 2 ml wurden gesammelt. Die Extinktion des Eluats bei 280 nm wurde aufgezeichnet. Die Proteinzusammensetzung der Fraktionen wurde durch SDS-PAGE analysiert (2.2.2.1; Nachweis mit COOMASSIE Brilliant Blue R250). Die Fraktionen, die GCAP-1 enthielten, wurden vereinigt.

2.4.5 Hydroxylapatitchromatographie

Eine HR5/5 FPLC-Säule (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) wurde mit etwa 1 ml keramischem Hydroxylapatit Typ I (BIO-RAD) gefüllt. Die Säule wurde mit 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 200 μ M CaCl_2 äquilibriert. Höchstens 3 mg angereichertes GCAP-1 aus der Gel-filtration ($\rightarrow$ 2.4.4) wurden auf die Säule aufgetragen. Das gebundene Protein wurde mit einem Gradienten von 10 - 300 mM Natriumphosphat pH 7,0 in 16 ml eluiert. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Es wurden Fraktionen von jeweils 0,5 ml gesammelt. Die Extinktion des Eluats bei 280 nm wurde aufgezeichnet.

Die Fraktionen, die gereinigtes GCAP-1 enthielten, wurden vereinigt, in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5 Massenspektrometrie

Das gereinigte rekombinante GCAP-1 ($\rightarrow$ 2.3) wurde von Fr. Dipl.-Ing. A. Rodenbrock (IET der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jülich) massenspektrometrisch charakterisiert.

Die Messungen wurden mit einem linearen MALDI-TOF-Massenspektrometer ALADIM (Institut für Lasermedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 337 nm N_2 -Laser, 1 Hz) durchgeführt. Die GCAP-1-Proben (etwa 1 mg/ml in Wasser) wurden im Verhältnis 1:2 - 1:5 (v/v) mit der Matrixlösung vermischt. Diese enthielt 9 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 1 mg/ml 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure in 20 % (v/v) CH_3CN mit 0,1 % (w/v) TFA. Als Massenstandard wurde Myoglobin aus dem Pferd (SERVA; $M_r = 16950,5$) eingesetzt.

2.6 Analytische HPLC

Das gereinigte rekombinante GCAP-1 ($\rightarrow$ 2.3) und die Peptide aus der Peptidbibliothek ($\rightarrow$ 2.3.1) wurden durch analytische HPLC charakterisiert.

Je 50 μ l einer Lösung von gereinigtem GCAP-1 (30 - 40 μ g Protein; $\rightarrow$ 2.4.5) wurden auf einer reversed-phase Säule (Hibar LiChrospher WP300 RP18, 250 x 4 mm; MERCK) in einem Gradienten von 2 - 100 % (v/v) CH_3CN und 0,13 - 0,1 % (w/v) TFA in 48 ml aufgetrennt. Die Flußrate betrug dabei 0,8 ml/min. Die Extinktion bei 214 nm wurde aufgezeichnet.

Die Peptide wurden für die Analyse in 10 % (v/v) Essigsäure aufgenommen (10 mg/ml). Die ungelösten Anteile wurden 5 min mit 15.000 g abzentrifugiert. Je 30 μ l des löslichen Überstandes wurden in einem Gradienten von 0 - 100 % (v/v) CH_3CN mit 0,1 % (w/v) TFA in 30 ml auf der selben Säule wie GCAP-1 (s.o.) aufgetrennt. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Die Extinktion bei 205 nm wurde aufgezeichnet.

2.7 Heterologe Expression der ROS-GC1 in HEK293-Zellen

2.7.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die für ROS-GC1 kodierende cDNA (Wildtyp; GORACZNAK et al., 1994) im Plasmidvektor pBluescript SK(-) wurde von Dr. T. Duda und Dr. R.K. Sharma (UMDNJ, Stratford, New Jersey, USA) zur Verfügung gestellt.

Für die transiente Expression in HEK293-Zellen wurde die kodierende cDNA mit KpnI und XbaI ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. Expressionsplasmide für die mutierten Formen der ROS-GC1 ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, LCA und LCActr) wurden von Dr. T. Duda und Dr. R.K. Sharma hergestellt. Diese Expressionsplasmide enthielten die entsprechend kodierenden cDNA im Vektor pcDNA3.

2.7.2 Transiente Expression

HEK293-Zellen wurden nach der Calciumphosphat-Methode von CHEN und OKAYAMA (1987) mit den Expressionsplasmiden ($\rightarrow$ 2.7.1) transfiziert.

Es wurden 3×10^5 Zellen pro $\varnothing$ 5 cm-Schale bzw. 9×10^5 Zellen pro $\varnothing$ 9 cm-Schale ausgesät. Nach etwa 22 h wurde das Medium (M10; $\rightarrow$ 2.2.12) gewechselt und die Zellen 1 - 2 h später transfiziert. Für die Transfektion der Zellen einer $\varnothing$ 5 cm-Schale wurden 8 - 16 μ g des Expressionsplasmids und 3 μ g pRSV-Tag in 124 μ l Wasser mit 41 μ l 1 M CaCl_2 und 165 μ l 2 x BBS (50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; pH 6,95) gemischt. Für eine $\varnothing$ 9 cm-Schale wurde die dreifache Menge angesetzt. Die Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zum Kulturmedium der Zellen pipettiert. Dieser Transfektionsansatz wurde für 20 - 22 h bei 35°C unter 3 % (p/p) CO_2 und etwa 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das entstandene Präzipitat aus Calciumphosphat und DNA wurde dann mit PBS und PBS mit 0,5 % (w/v) EDTA abgewaschen. Bis zur Ernte wurden die Zellen für weitere 24 h unter Standardbedingungen ($\rightarrow$ 2.2.12) inkubiert. Nach Bedarf wurde dem Medium 6 h nachdem das Präzipitat abgewaschen worden war 7,5 mM Natriumbutyrat zugesetzt, um die Expressionsrate zu steigern.

Die Zellen, die für Kontrollexperimente eingesetzt wurden, wurden nicht transfiziert.

2.7.3 Immuncytochemische Färbung

Für die immuncytochemische Färbung wurden die Zellen, nachdem das Präzipitat abgewaschen worden war ($\rightarrow$ 2.7.2), auf Deckgläschen in 24-well-Platten umgesetzt.

Dafür wurden die Zellen bei 37°C mit 300 μ l Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO BRL) pro $\varnothing$ 5 cm-Schale von der Kulturschale abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 4,7 ml Medium re-

suspendiert und auf Deckgläschen in 24-well-Platten verteilt (250 µl Suspension pro well). Diese Deckgläschen waren zuvor sterilisiert, für 1 h mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und in den 24-well-Platten mit 200 µl Medium überschichtet worden.

Für die Antikörpermarkierung wurden die Zellen 24 h nach dem Umsetzen auf die Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 15 min mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PB (0,1 M Natriumphosphat pH 7,4) fixiert. Die fixierten Zellen wurden 2 x mit PB gewaschen. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch 20 min Inkubation mit 10 % (v/v) Ziegsenserum (NGS) und 0,5 % (w/v) TritonX-100 in PB blockiert. Die Zellen wurden für 1 h mit einer Verdünnung (1:5) des ROS-GC1-spezifischen monoklonalen Antikörpers 6G7 (zur Verfügung gestellt von Dr. R.S. Molday, University of British Columbia, Vancouver, Kanada) in NG+ (3 % NGS, 0,5 % TritonX-100 und 0,05 % (w/v) NaN₃ in PB) inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PB gewaschen. Die Zellen wurden 30 min mit einer Verdünnung (1:80) des Zweitantikörpers (anti-mouse-HRP; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) in NG+ inkubiert und danach zweimal mit PB gewaschen. Der Antigen-Antikörperkomplex wurde mit 0,05 % (w/v) Diaminobenzidin und 0,01 % (w/v) H₂O₂ in PB nachgewiesen. Die Farbreaktion wurde nach 5 min durch gründliches Waschen mit PBS abgestoppt und der Anteil angefärbter Zellen im Mikroskop ausgezählt.

2.7.4 Präparation von Zellmembranen

Für die Bestimmung der Guanylatzyklaseaktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 bzw. ihrer mutierten Formen (→ 2.6) wurden die Zellmembranen der transfizierten HEK293-Zellen präpariert.

Für die Ernte wurden die Zellen einer Ø 9 cm-Schale im Medium vom Schalenboden abgeschabt und 5 min mit 200 g pelletiert. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 100 µl 10 mM HEPES-KOH pH 7,5 mit 1 mM DTT resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Präparation der Zellmembranen wurde die Zellsuspension aufgetaut und 4 x 5 s sonifiziert (BRANSON Sonifier B12, Resonatorbecher, 80 - 100 W). Die lysierten Zellen wurden 5 min mit 400 g zentrifugiert, wodurch Zellkerne und größere Zelltrümmer abgetrennt wurden. Aus dem Überstand wurden die Zellmembranen 15 min mit 125.000 g pelletiert. Die Membranen wurden dann in 10 mM HEPES-KOH pH 7,5 mit 250 mM KCl, 10 mM NaCl und 1 mM DTT (100 µl pro Ø 9 cm-Schale) aufgenommen.

2.8 Präparation von Sehstäbchenaußensegmenten

Die Sehstäbchenaußensegmente (ROS) aus Rindernetzhäuten wurden nach der leicht veränderten Methode von SCHNETKAMP und DAEHMEN (1982) präpariert. Alle Arbeitsschritte wurden unter schwachem Rotlicht durchgeführt.

Zwischen 150 und 280 frische Rinderaugen wurden bei Raumtemperatur aufgeschnitten. Glaskörper und Linse wurden entfernt. Die Netzhäute wurden herausgelöst und in 1 ml Schwerem Medium (1,5 M Saccharose; 115 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES·KOH pH 7,5; 1 mM DTT) pro Netzhaut aufgenommen. Die Netzhäute wurden 90 sec geschüttelt, um die Außensegmente der Photorezeptorzellen abzuscheren, und anschließend für 7 min bei 3500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde über ein Nylonnetz filtriert und mit dem gleichen Volumen Waschpuffer (115 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES·KOH pH 7,5; 1 mM DTT) verdünnt. Das Filtrat wurde 10 min mit 4700 g zentrifugiert und die Pellets in 40 ml Leichtem Medium (600 mM Saccharose; 115 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES·KOH pH 7,5; 1 mM DTT) resuspendiert. Diese Suspension wurde über einen Saccharosegradienten (600 - 1500 mM) geschichtet und 90 min mit 70.000 g zentrifugiert. Die Bande, die Rhodopsin enthielt, wurde abgenommen, mit einem gleichen Volumen Waschpuffer verdünnt und 10 min mit 12.400 g zentrifugiert. Die pelletierten ROS wurden in 25 ml Lysepuffer (10 mM HEPES·KOH pH 7,5; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF) resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C dunkel gelagert.

Der Rhodopsingehalt der ROS-Suspensionen wurde photometrisch bestimmt. Dafür wurde die Extinktion einer Probe bei 500 nm gemessen. Anschließend wurde die Probe 1 min belichtet, um das enthaltene Rhodopsin vollständig auszubleichen. Die Extinktion bei 500 nm wurde erneut gemessen und von der vorher gemessenen abgezogen. Aus der Differenz wurde die Rhodopsinkonzentration berechnet. Der differentielle molare dekadische Extinktionskoeffizient $\Delta\epsilon_{500}$ von Rhodopsin (M_r 40 kDa) beträgt 40.000 M⁻¹cm⁻¹.

Die hergestellten ROS-Suspensionen enthielten 9 -13 mg/ml Rhodopsin.

2.9 Bestimmung der Guanylatzyklaseaktivität

Guanylatzyklaseaktivitäten wurden nach der Methode von KOCH (1991) über das gebildete Guanosin-3':5'-monophosphat (cGMP) bestimmt.

Die Reaktionen wurden in Mg-GC-Puffer (40 mM MOPS-KOH pH 7,1; 56 mM KCl; 8 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$; 2 mM GTP; 400 μ M Zaprinast) oder in Mn-GC-Puffer (40 mM MOPS-KOH pH 7,1; 56 mM KCl; 8 mM NaCl; 2 mM $MnCl_2$; 2 mM GTP; 400 μ M Zaprinast) durchgeführt. Der Mg-GC-Puffer wurde in Experimenten verwendet, in denen die Ca^{2+} -abhängige Regulation der ROS-GC untersucht wurde. Der Mn-GC-Puffer wurde eingesetzt, wenn die Basalaktivität der ROS-GC bestimmt werden sollte. Nach Bedarf wurde den Puffern zur Erhöhung der Aktivität 100 μ M ATP zugesetzt (FRINS et al., 1996).

Die Guanylatzyklaseaktivität wurde in drei verschiedenen Präparationen bestimmt: ROS-Suspensionen ($\rightarrow$ 2.2), gewaschene ROS-Membranen ($\rightarrow$ 2.9.1) und HEK293-Zellmembranen ($\rightarrow$ 2.7.4).

Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μ l durchgeführt. Die Ansätze enthielten

10 μ l	ROS-Suspensionen, ROS-Membranen oder HEK293-Membranen,
20 μ l	2,5-fach konzentrierten Mg-GC- oder Mn-GC-Puffer und
20 μ l	Zusätze (Peptide / GCAP-1 / Ca^{2+} -Puffer).

Die Kontrollansätze ohne Peptide oder GCAP-1 wurden mit den jeweiligen Probenpuffern dieser Zusätze auf 50 μ l aufgefüllt. Die Ansätze, in denen gewaschene ROS-Membranen mit GCAP-1 rekonstituiert wurden, wurden für 5 min bei Raumtemperatur präinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des 2,5-fach konzentrierten Mg-GC-Puffers gestartet wurde. In den anderen Ansätzen wurde die Reaktion durch Zugabe der GC-Präparation gestartet.

Ansätze mit ROS oder ROS-Membranen wurden 5 min bei 30°C unter schwachem Rotlicht inkubiert, Ansätze mit HEK293-Membranen 30 min bei Tageslicht. Die Reaktionen wurden mit 50 μ l 0,1 M Na_2EDTA abgestoppt. Anschließend wurden die Ansätze 5 min auf 95°C erhitzt. Die Membranen und die hitzedenaturierten Proteine wurden 5 min mit 15.800 g abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine reversed-phase-HPLC-Säule (Hibar LiChrospher 100 RP18, 250 x 4 mm; MERCK) aufgetragen und die enthaltenen Nukleotide mit einem Gradienten von 0 - 70 % (v/v) Methanol in 5 mM KH_2PO_4 in 10,8 ml aufgetrennt. Die Flußrate betrug 1,2 ml/min. Die Extinktion des Eluats bei 254 nm wurde aufgezeichnet. Das cGMP eluierte nach 7 - 8 min. Die Fläche des zugehörigen Peaks wurde integriert und die Menge des gebildeten cGMP durch den Vergleich mit Standardproben bestimmt.

2.9.1 Präparation gewaschener ROS-Membranen

Gewaschene ROS-Membranen wurden präpariert, um die Aktivität der nativen ROS-GC ohne natives GCAP zu bestimmen.

Dafür wurden unter schwachem Rotlicht bei 4°C 500 µl ROS-Suspension (→ 2.8) in 2 ml hypotonischem Puffer (10 mM HEPES-KOH pH 7,5; 1 mM DTT) verdünnt. Die Membranen wurden 10 min mit 345.000 g pelletiert, in 2 ml hypotonischem Puffer resuspendiert und erneut pelletiert. Die gewaschenen Membranen wurden in 250 µl 50 mM HEPES-KOH pH 7,5 mit 500 mM KCl, 20 mM NaCl und 1 mM DTT aufgenommen.

2.9.2 Durchmusterung der Peptidbibliothek aus ROS-GC1

Der Einfluß der Peptide aus der Peptidbibliothek (→ 2.3.1) auf die GC-Aktivität in ganzen ROS wurde untersucht, um Sequenzbereiche der ROS-GC1 zu identifizieren, die an ihrer Ca^{2+} -abhängigen Regulation durch GCAP beteiligt sind.

Die Peptide wurden in 10 mM HEPES pH 7,5 mit 2 % (v/v) DMSO aufgenommen (2,5 mg/ml). Die Suspensionen wurden 10 s sonifiziert (BRANSON B12, Resonatorbecher, 80 - 100 W) und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Diejenigen Peptide, die sich nicht vollständig lösten, wurden dadurch fein verteilt in Suspension gebracht. Anschließend wurden 10 µl der Peptidlösungen bzw. -suspensionen (Endkonzentration 0,5 mg/ml, etwa 0,3 mM) in einem Ansatz zur Bestimmung der GC-Aktivität von ganzen ROS eingesetzt (→ 2.9).

Die ROS-GC-Aktivität in Gegenwart der Peptide wurde jeweils bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ (2 mM EGTA) und bei 23,5 µM $[\text{Ca}^{2+}]$ (2 mM CaEGTA) bestimmt. In jedem Experiment wurde die ROS-GC-Aktivität auch in Kontrollansätzen ohne Peptide bestimmt. Die in Gegenwart der Peptide gemessenen GC-Aktivitäten wurden auf GC-Aktivität der Kontrolle bei der jeweiligen $[\text{Ca}^{2+}]$ normiert (normalisierte GC-Aktivität). Die relative Inhibierung durch ein Peptid ergibt sich dann als Differenz der normalisierten GC-Aktivität zum Wert 1. Außerdem wurde für jedes Peptid das Verhältnis der ROS-GC-Aktivität bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ zu der bei 23,5 µM $[\text{Ca}^{2+}]$ berechnet und auf das entsprechende Verhältnis der Kontrollen (8 - 10-fach) normiert (normalisierte Aktivierung).

2.10 Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie

Die Oberflächen-Plasmon-resonanzspektroskopischen (SPR-) Messungen wurden mit einem BIAcore-Gerät (BIAcore) durchgeführt (LÖFAS und JOHANSSON, 1990; SJÖLANDER und URBANICZKY, 1991; STENBERG et al., 1991; FÄGERSTAM et al., 1992). Die Steuerung des Geräts und die Datenaufzeichnung erfolgte mit dem Programm BIAcore control software 1.2 (BIAcore). Die Daten wurden mit den Programmen BIAevaluation 3.0 (BIAcore) oder SigmaPlot 3.0 (JANDEL) ausgewertet. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Die Puffer und Lösungen wurden durch Membranfilter II 0,2 µm (Typ GVWP, MILLIPORE) filtriert und entgast.

2.10.1 Einführung

Das BIAcore-Gerät detektiert den Brechungsindex unmittelbar über einer Sensoroberfläche. Dafür mißt es den Resonanzwinkel für die Anregung eines Oberflächen-Plasmon-Polaritons (zur Übersicht über das Phänomen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz s. z.B. WELFORD, 1991). Die Meßgröße heißt Resonanzsignal und wird in Resonanzeinheiten (RU; $1 \text{ RU} = 1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ$) angegeben. Die Änderung des Resonanzsignals um 1 RU wird durch eine durchschnittliche Änderung des Brechungsindex im Meßvolumen um 1×10^{-6} hervorgerufen. Das entspricht der Änderung der Oberflächenkonzentration eines Proteins mit durchschnittlicher Aminosäurezusammensetzung um etwa 1 pg/mm^2 . Eine Auftragung des Resonanzsignals gegen die Zeit wird Sensorgramm genannt.

Die Sensoroberfläche im Gerät ist austauschbar. Die Austauschteile werden als Sensorchips bezeichnet. Ein Sensorchip bildet mit dem Flüssigkeitsführungssystem des Gerätes vier unabhängige Flußzellen. Proteine oder Peptide, die kovalent an die Sensoroberfläche gekoppelt sind, werden als (immobilisierte) Liganden bezeichnet, die in Lösung angebotenen Wechselwirkungspartner als Analyten. Der Puffer, der kontinuierlich durch das System fließt, heißt Eluent.

2.10.2 Immobilisierung von Proteinen und Peptiden

Peptide oder Proteine wurden durch die Ligand-Thiol-Methode¹ kovalent an die Sensoroberfläche gekoppelt (immobilisiert). Die Sensoroberfläche war dabei mit einer carboxymethylierten Dextranmatrix beschichtet. Durch diese Immobilisierungsmethode werden Cysteinreste der Proteine oder Peptide über 2-Dithioethanamino-Brücken mit der Matrix verknüpft.

¹ BIAcore System Manual Supplement (1991); Pharmacia Biosensor AB; Uppsala, Schweden.

Die Flußrate des Eluenten wurde auf 5 µl/min eingestellt. Die Oberfläche eines CM5 Sensorchips (BIAcore) in einer Flußzelle wurde mit 10 µl 50 mM N-Hydroxysuccinimid und 200 mM N-Ethyl-N'-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid aktiviert. Die aktivierte Oberfläche wurde mit 10 µl 80 mM 2-[2-Pyridinyldithio]ethanamin (PDEA) in 100 mM Natriumboratlösung pH 8,5 derivatisiert. Die Peptide oder Proteine, die immobilisiert werden sollten, wurden in 100 mM Natriumcitrat pH 2,4 gelöst und in die Flußzelle injiziert. Die verbleibenden reaktiven Gruppen in der Dextranmatrix wurden anschließend mit 20 µl 50 mM L-Cystein in 1 M NaCl deaktiviert. Der Anteil der Peptide oder Proteine, der nicht kovalent an die Oberfläche gebunden war, wurde ausgewaschen.

Die Oberflächenkonzentration des immobilisierten Liganden wurde aus der Differenz des Resonanzsignals vor und nach der Immobilisierung errechnet.

Für Kontrollexperimente wurden Oberflächen ohne immobilisierte Peptide oder Proteine hergestellt. Die reaktiven Gruppen der Kontrolloberflächen wurden aktiviert, mit PDEA derivatisiert und mit Cystein deaktiviert.

2.10.3 Durchmusterung der Peptidbibliothek aus ROS-GC1

Die Wechselwirkung der Peptide aus der Peptidbibliothek (→2.3.1) mit immobilisiertem rekombinanten GCAP-1 wurde SPR-spektroskopisch untersucht, um Sequenzbereiche der ROS-GC1 zu identifizieren, die an der Bindung von GCAP-1 beteiligt sind.

Der Eluent für diese Experimente enthielt 40 mM MOPS-KOH pH 7,1, 60 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,005 % (w/v) Tween20, 0,01 % (w/v) BSA und 1 mM CaCl₂ (+Ca²⁺) oder 2 mM EGTA (-Ca²⁺). Die Peptide wurden in Eluent aufgenommen (0,5 mg/ml). Die Suspensionen wurden 10 s sonifiziert (BRANSON B12, Resonatorbecher, 80 - 100 W) und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Ungelöstes Material wurde 5 min mit 15.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Analytlösung eingesetzt.

Die Flußrate wurde auf 5 µl/min eingestellt. In eine Flußzelle wurden 20 µl Normalisierungspuffer (Eluent + 1 % (v/v) Glycerin) injiziert. Die dadurch verursachte Änderung des Resonanzsignals wurde registriert. Dann wurden 20 µl der Peptidlösung injiziert. Das Resonanzsignal wurde 5 s vor Ende der Kontaktzeit abgelesen. Die gebundenen Peptide wurden mit 10 µl 0,5 % (w/v) SDS von der Oberfläche abgewaschen. Bei Experimenten, die mit 2 mM EGTA in Eluent (-Ca²⁺) durchgeführt wurden, wurden anschließend 10 µl 0,1 M CaCl₂ injiziert, um das immobilisierte GCAP-1 zu stabilisieren. Diese Folge von Injektionen wurde nacheinander in einer Flußzelle, auf deren Sensoroberfläche 5000 - 15.000 RU rekombinantes GCAP-1 immobilisiert worden waren und in einer Flußzelle mit einer Kontrolloberfläche (→ 2.10.2) ausgeführt.

Für beide Flußzellen wurde die Änderung des Resonanzsignals, die durch die Bindung der Peptide an die Sensoroberfläche hervorgerufen wurde, auf die Änderung des Resonanzsig-

nals durch den Normalisierungspuffer normiert (normalisiertes Signal). Das normalisierte Signal für die Kontrollflußzelle wurde vom normalisierten Signal für die GCAP-1-Flußzelle abgezogen, um das spezifische normalisierte Signal für die Bindung des jeweiligen Peptides an GCAP-1 zu berechnen.

In Abbildung 2.2 wird als Beispiel ein Sensorgramm für die Bindung eines Peptides (#37) an immobilisiertes GCAP-1 gezeigt, das während der beschriebenen (s.o.) Folge von Injektionen aufgezeichnet wurde. Außerdem wird in Abbildung 2.2 bildhaft die Berechnung des normalisierten Signals (R_{norm}) dargestellt.

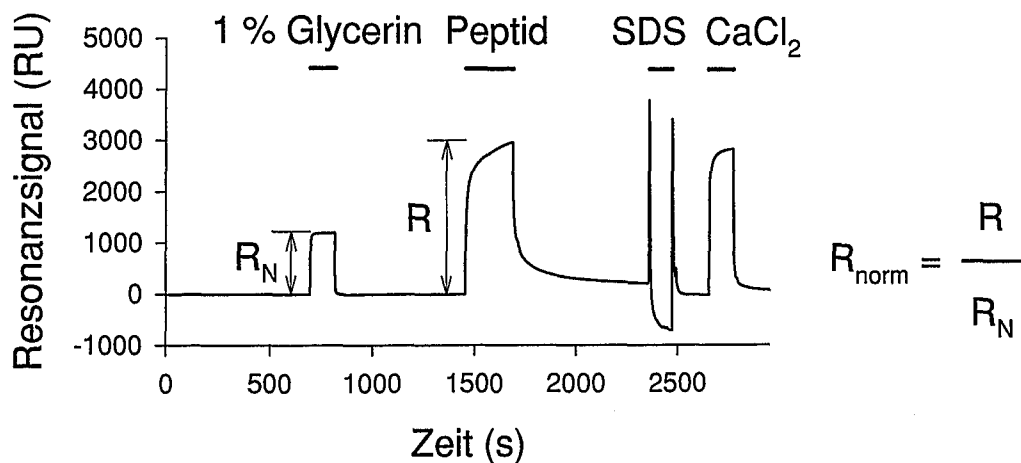


Abbildung 2.2 Durchmusterung der Peptidbibliothek - Sensorgramm für die Bindung eines Peptides (#37) an immobilisiertes GCAP-1; Das Sensorgramm zeigt die Veränderungen des Resonanzsignals, die durch sukzessive Injektionen von Normalisierungspuffer (1 % Glycerin), Peptidlösung, 0,5 % SDS und 0,1 M CaCl_2 erzeugt wurden; die Flußrate betrug 5 $\mu\text{l}/\text{min}$; der Eluent (s.o.) enthielt 2 mM EGTA. R: Veränderung des Resonanzsignals durch die Peptidlösung; R_N : Veränderung des Resonanzsignals durch den Normalisierungspuffer; R_{norm} : normalisiertes Signal.

2.10.4 Sonstige SPR-spektroskopische Messungen

Die Wechselwirkung einzelner Peptide mit GCAP-1 und die Autoassoziation des Peptides #34a wurden SPR-spektroskopisch untersucht. Dafür wurden GCAP-1 oder eine Version des Peptides #34a, die N-terminal um eine Cysteylglycinegruppe erweitert worden war (CG-#34a), als Liganden eingesetzt.

Der Eluent für diese Experimente enthielt 40 mM MOPS-KOH pH 7,1, 60 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 0,005 % (w/v) Tween20 und 1 mM CaCl_2 (+ Ca^{2+}) oder 2 mM EGTA (- Ca^{2+}). Die Peptide, die als Analyt eingesetzt wurden, wurden in Eluent gelöst. Die Lösungen der Proteine, die als Analyt eingesetzt wurden, wurden im etwa 5-fachen Volumen Eluent verdünnt, in Centricon Zentrifugalkonzentratoren (AMICON; MWCO 10 kDa) bei 5000 g und 4°C eingengt und erneut verdünnt. Dies wurde fünfmal wiederholt, um den Puffer vollständig auszutauschen.

Die Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei einer Flußrate von 10 µl/min durchgeführt. Die gebundenen Peptide oder Proteine wurden durch den Fluß des Eluenten von der Sensoroberfläche abgewaschen.

Die aufgezeichneten Sensorgramme für die Bindung der Analyten an die immobilisierten Peptide oder Proteine wurden durch Subtraktion der Sensorgramme korrigiert, die mit der selben Analytlösung nach dem gleichen Protokoll auf einer Kontrolloberfläche aufgezeichnet worden waren.

2.11 Affinitätschromatographie

2.11.1 Herstellung von Peptidaffinitäts-Sepharosen

Je 0,7 ml (etwa 0,2 g Trockengewicht) aktivierte SH-Sepharose 4B (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) wurden in 1 ml PBS mit 1 mM EDTA aufgenommen. Je 1 mg der Peptide CG-# 3a oder CG-#34a (→ Angang D.2) wurde in je 1 ml PBS mit 1 mM EDTA gelöst und mit der Sepharose gemischt. Der Ansatz wurde 18 h bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Danach wurde das Sepharosematerial 5 min mit 200 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, um die Menge des nicht gebundenen Peptides zu bestimmen (s.u.). Verbleibende reaktive Gruppen im Material wurden 1 h bei Raumtemperatur mit 50 mM Cystein in 0,1 M Natriumformiatpuffer pH 4,3 mit 1 M NaCl deaktiviert.

Die Effizienz der Kopplungsreaktion wurde überprüft, indem die Peptidkonzentration im Überstand vor und nach der Kopplung bestimmt wurde. Die Peptide wurden photometrisch als Cu²⁺-Bicinchoninsäure-Komplexe (→ 2.2.1.3) nachgewiesen. Es wurden etwa 500 µg Peptid pro ml Sepharose (200 nmol/ml) gekoppelt.

Für Kontrollexperimente wurde Sepharosematerial ohne immobilisierte Peptide hergestellt. Dafür wurden die reaktiven Gruppen der aktivierten SH-Sepharose mit Cystein deaktiviert.

Die Peptidaffinitäts-Sepharosen wurden bei 4°C in PBS mit 1 mM EDTA und 0,01 % (w/v) NaN₃ gelagert.

2.11.2 Herstellung von solubilisierten ROS

Für die affinitätschromatographischen Experimente wurden ROS (→ 2.8) eingesetzt, die in Abwesenheit von DTT präpariert worden waren. Die ROS wurden unter schwachem Rotlicht in Dodecylmaltosidpuffer (→ 2.11.5) auf das 5-fache Volumen verdünnt, um die Proteine der Plasmamembran und der Diskmembranen zu solubilisieren. Der Ansatz wurde im Dunklen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden ungelöste Anteile entfernt, indem die solubilisierten ROS 10 min mit 345.000 g zentrifugiert wurden.

2.11.3 Herstellung eines Dunkelextraktes löslicher Proteine aus ROS

Die löslichen Proteine aus ROS wurden unter hypotonischen Bedingungen extrahiert, um ihre Wechselwirkung mit den Peptidaffinitäts-Sepharosen (→ 2.11.1) zu untersuchen. Dafür wurden 500 µl ROS, die in Abwesenheit von DTT präpariert worden waren, unter schwachem Rotlicht bei 4°C in 2 ml 10 mM HEPES-KOH pH 7,5 verdünnt. Die Membranen wurden 10 min mit 345.000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und als Dunkelextrakt (DEX) bezeichnet. Für die affinitätschromatographischen Experimente wurden 90 µl des DEX mit 10 µl 10-fach konzentriertem Eluent (+ / - Ca^{2+} ; → 2.10.4) versetzt.

2.11.4 Herstellung von solubilisierten ROS-Membranen

Die Membranproteine aus ROS wurden für affinitätschromatographische Experimente solubilisiert. Die Membranen aus 500 µl ROS-Suspension, die bei der Herstellung des DEX pelletiert worden waren (→ 2.11.3), wurden in 2 ml hypotonischem Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Das Pellet wurde in 2 ml Dodecylmaltosidpuffer (→ 2.11.5) aufgenommen. Der Ansatz wurde im Dunklen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden ungelöste Anteile entfernt, indem die solubilisierten ROS-Membranen 10 min mit 345.000 g zentrifugiert wurden.

2.11.5 Durchführung der Bindungsexperimente

Die Bindung von Proteinen aus drei verschiedenen Präparationen an die Peptidaffinitäts-Sepharosen wurde untersucht. Diese Präparationen waren solubilierte ganze ROS (→ 2.11.2), der Dunkelextrakt (DEX) der löslichen Proteine aus ROS (→ 2.11.3) und solubilierte gewaschene ROS-Membranen (→ 2.11.4).

Die Bindungsexperimente mit den solubilisierten ROS und den solubilisierten ROS-Membranen wurden in Dodecylmaltosidpuffer (40 mM MOPS-KOH pH 7,1, 180 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 % (w/v) *n*-Dodecyl- β -D-maltosid und 1 mM CaCl_2 (+ Ca^{2+}) oder 2 mM EGTA (- Ca^{2+})) durchgeführt. Die Experimente mit dem DEX wurden in Eluent (+ / - Ca^{2+} ; → 2.10.4) durchgeführt. Je 50 µl der Peptidaffinitäts-Sepharosen wurden in eine Micropure.45 Zentrifugalfiltrationseinheit (AMICON) überführt. Durch kurze (<10 s) Zentrifugation mit maximal 15.000 g wurde das Sepharosematerial von Puffer befreit. Das Material wurde fünfmal mit je 200 µl Probenpuffer (Dodecylmaltosidpuffer oder Eluent) gewaschen und anschließend in je 100 µl eiskaltem Probenpuffer resuspendiert. Je 100 µl der Probe (solubilierte ROS, DEX oder solubilierte ROS-Membranen) wurden zugegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Der Überstand wurde abzentrifugiert und das Material zweimal mit je 200 µl Probenpuffer gewaschen. Die Waschfraktionen wurden mit dem Überstand vereinigt und als ungebundene Fraktion bezeichnet. Anschließend wurde

das Material mit 3 x 200 µl eiskaltem 1 M NaCl in 10 mM MOPS·KOH pH 7,1 mit 1 %(w/v) Dodecylmaltosid bzw. 0,005 %(w/v) Tween20 (DEX) gewaschen. Die vereinigten Überstände dieser Waschschrirte wurden als Hochsalzfraction bezeichnet. Die Proteine, die an die Peptidaffinitäts-Sepharosen gebundenen hatten, wurden bei Raumtemperatur mit 3 x 200 µl 0,5 %(w/v) SDS eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt.

Die Proteine in den gesammelten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Färbung mit kolloidalem Silber nachgewiesen oder auf Blotmembranen übertragen (→ 2.2.2.2). Anschließend wurden bestimmte Proteine immunchemisch nachgewiesen.

3 Ergebnisse

Die partikuläre Guanylatzyklase der Photorezeptoraußensegmente (ROS-GC) synthetisiert cGMP, den Botenstoff der Phototransduktion. Die vorherrschende Isoform der ROS-GC in Photorezeptoren ist ROS-GC1. Die Aktivität der ROS-GC wird Ca^{2+} -abhängig von Guanylatzyklase-aktivierenden Proteinen (GCAP-1, -2 und -3) reguliert (→ 1.3). Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Regionen der ROS-GC1 zu identifizieren, die eine zentrale Funktion für die Regulation durch GCAP-1 haben.

Dafür wurde eine Peptidbibliothek hergestellt, die die Juxtamembrandomäne, die putative Dimerisierungsdomäne und den C-Terminus der ROS-GC1 abbildet (→ 3.2). Diese Bibliothek wurde für zwei Durchmusterungen eingesetzt, durch die Peptide identifiziert wurden, die die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der nativen ROS-GC stören (→ 3.3) oder direkt mit GCAP-1 wechselwirken (→ 3.4). Anschließend wurden der Einfluß der identifizierten Peptide auf die Aktivität der nativen ROS-GC (→ 3.5) und die Wechselwirkung der Peptide mit Zielproteinen (→ 3.6) untersucht. Schließlich wurden mutierte Formen der ROS-GC1 hergestellt, bei denen die Regionen deletiert waren, die von den identifizierten Peptiden abgebildet werden. Diese Mutanten wurden heterolog exprimiert und charakterisiert, um die Funktion der deletierten Regionen für die Regulation der ROS-GC1 aufzuklären (→ 3.7).

3.1 Herstellung und Charakterisierung von rekombinantem GCAP-1

Für einige der Experimente, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden größere Mengen (>1 mg) GCAP-1 benötigt. Aus 100 Rinderaugen lassen sich aber nur etwa 10 µg natives GCAP-1 reinigen (GORCZYCA et al., 1994; FRINS, 1996). Daher wurde GCAP-1 heterolog in *E.coli* exprimiert (→ 2.4). Das exprimierte Protein wurde durch zwei chromatographische Schritte (Gelfiltration und Hydroxylapatitchromatographie) gereinigt (→ 0). Das gereinigte rekombinante GCAP-1 wurde durch Massenspektrometrie und durch analytische HPLC charakterisiert (→ 3.1.2.1, 3.1.2.2). Durch Rekonstitution mit nativer ROS-GC wurde untersucht, ob das gereinigte rekombinante GCAP-1 funktionell aktiv war (→ 3.1.2.3).

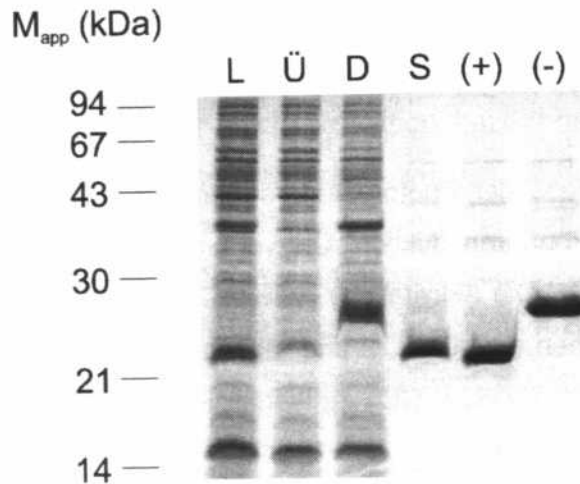


Abbildung 3.1 Expression und Reinigung von rekombinantem GCAP-1; L: *E.coli*-Lysat (15 µg Protein); Ü: Löslicher Anteil des Lysats (10 µg Protein); D: Löslicher Anteil des Solubilisats nach der Renaturierung (10 µg Protein); S: Angereichertes GCAP-1 nach der Gelfiltrationschromatographie (5 µg Protein); (+): Gereinigtes GCAP-1 nach der Hydroxylapatitchromatographie (5 µg Protein) in Gegenwart von 10 mM CaCl_2 ; (-): wie (+), in Gegenwart von 10 mM EGTA. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (15 %) getrennt und mit COOMASSIE Brilliant Blue R250 gefärbt. Man beachte die geringere Intensität der GCAP-1-Bande in der Spur S im Vergleich mit den Spuren (+) und (-) bei gleicher Menge an Gesamtprotein (5 µg).

3.1.1 Verlauf der Reinigung

3.1.1.1 Expression und Solubilisierung

GCAP-1 wurde in *E.coli* BL21(DE3) exprimiert. Da natives GCAP-1 N-terminal mit Myristinsäure oder einer verwandten Fettsäure verestert ist (PALCZEWSKI et al., 1994), wurde das rekombinante GCAP-1 in den meisten Fällen mit der N-Myristoyltransferase 1 (NMT) aus *S.cervisiae* koexprimiert, um N-myristoyliertes Protein zu erhalten (→ 2.4.2).

Die Zellen wurden mit Lysozym aufgeschlossen (lysiert). Da der größte Teil des rekombinanten GCAP-1 in unlöslicher Form exprimiert wurde, wurden die unlöslichen Bestandteile der lysierten Zellen unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert. Die enthaltenen Proteine wurden anschließend durch Dialyse renaturiert (→ 2.4.3).

Das Zelllysate enthielt 340 ± 140 mg Protein pro Liter Kultur. Nach der Renaturierung der solubilisierten Proteine durch Dialyse verblieben 48 ± 32 mg Protein pro Liter Kultur.

Diese Mengenangaben beziehen sich auf den Durchschnitt aus 6 Reinigungen.

3.1.1.2 Gelfiltrationschromatographie

Die renaturierten Proteine wurden durch Gelfiltration (Superdex75 XK16/60) aufgetrennt (→ 2.4.4). GCAP-1 eluierte in einem breiten Peak bei einem Retentionsvolumen von etwa 65 ml. Durch die Gelfiltration wurden $12,7 \pm 11,0$ mg angereichertes GCAP-1 pro Liter Kultur erhalten.

3.1.1.3 Hydroxylapatitchromatographie

Das angereicherte rekombinante GCAP-1 wurde durch Chromatographie mit einer keramischen Hydroxylapatitsäule weiter gereinigt (→ 2.4.5). GCAP-1 wurde mit einem Natriumphosphatgradienten bei etwa 70 mM Phosphat eluiert.

Durch diesen Reinigungsschritt wurden $5,1 \pm 4,4$ mg GCAP-1 pro Liter Kultur in einer Reinheit von etwa 90 % erhalten.

Die Anreicherung von GCAP-1 durch die einzelnen Reinigungsschritte wurde durch SDS-PAGE verfolgt. Das Ergebnis einer Reinigung wird in Abbildung 3.1 gezeigt. Das gereinigte rekombinante GCAP-1 zeigte die typische Ca^{2+} -abhängige Veränderung der apparenten Molmasse (M_{app}) bei der SDS-PAGE von etwa 21 kDa ($\text{GCAP-1} \cdot 3\text{Ca}^{2+}$) auf etwa 27 kDa (GCAP-1) (GORCZYCA et al., 1995; FRINS et al., 1996).

3.1.2 Charakterisierung des gereinigten rekombinanten GCAP-1

3.1.2.1 Massenspektrometrie

Das gereinigte rekombinante GCAP-1 wurde massenspektrometrisch (MALDI-TOF) charakterisiert. Die Messungen wurden von Fr. Dipl.-Ing. A. Rodenbrock (IET, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt (→ 2.5).

Für rekombinantes GCAP-1, das nicht mit NMT koexprimiert worden war (-Myr), wurde eine Masse von 23452 ± 46 Da ($n = 6$)¹ bestimmt. Dieser Wert entspricht im Rahmen der Meßgenauigkeit des Gerätes (0,5 %) der theoretisch erwarteten Masse von 23510 Da. Für rekombinantes GCAP-1, das mit NMT koexprimiert worden war (+Myr), wurde im Mittel eine Masse von 23362 ± 107 Da ($n = 2$) bestimmt. Dieser Wert entspricht nicht der theoretisch erwarteten Masse für N-myristoyliertes GCAP-1 von 23592 Da. In Abbildung 3.2 A, B werden zwei repräsentative Massenspektren von GCAP-1(-Myr) bzw. (+Myr) gezeigt.

Die Massen, die für GCAP-1(+Myr) und GCAP-1(-Myr) bestimmt wurden, waren nicht signifikant verschieden. Es konnte also nicht nachgewiesen werden, daß GCAP-1 durch die Koexpression mit NMT N-myristoyliert wurde. Das Ergebnis der Massenspektrometrie schließt aber nicht aus, daß ein Teil des exprimierten GCAP-1(+Myr) N-myristoyliert wurde, da ein entsprechender Peak im Massenspektrum vom Peak des nicht-myristoylierten Proteins überlagert worden sein könnte.

¹ n: Anzahl der Bestimmungen

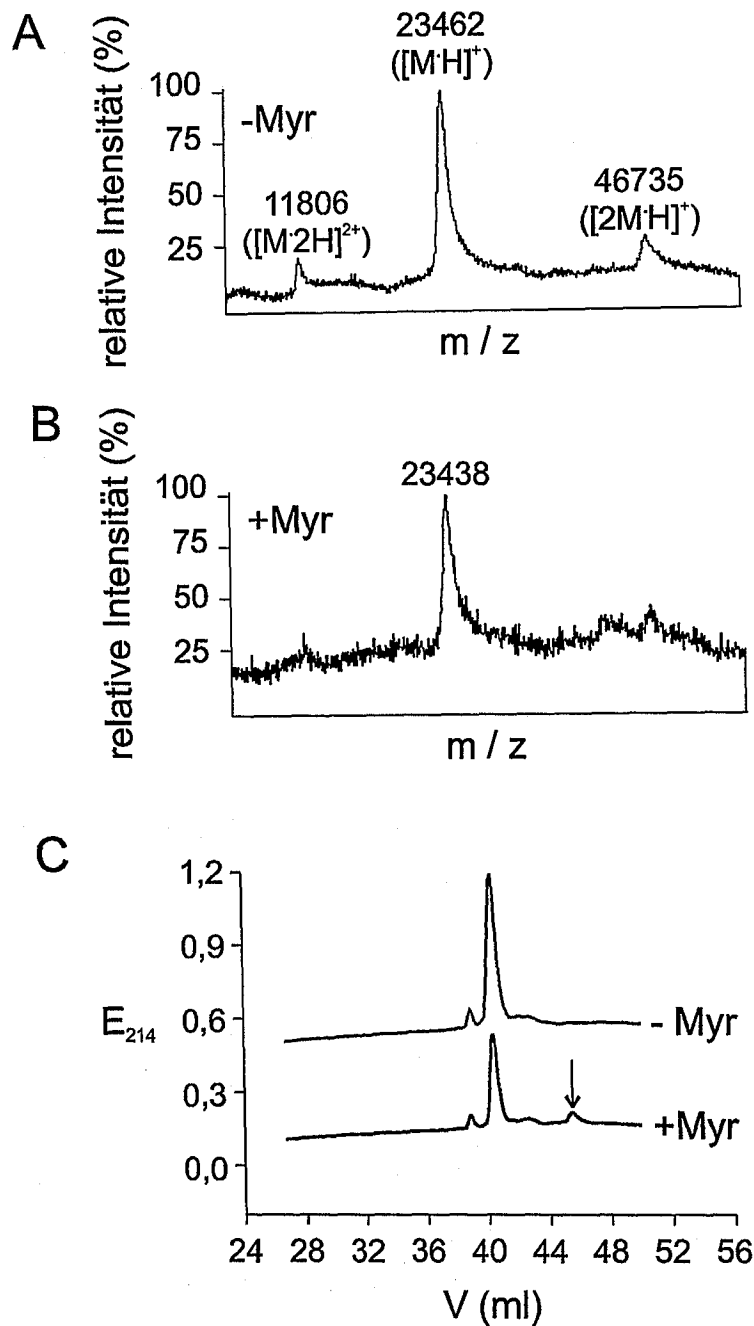


Abbildung 3.2 Charakterisierung von gereinigtem rekombinanten GCAP-1; A: MALDI-TOF-Massenspektrum von GCAP-1(-Myr); die Werte des Masse-/Ladungsverhältnisses (m/z) für die markierten Peaks entsprechen den m/z-Werten von protoniertem GCAP-1 ([M·H]⁺), doppelt protoniertem GCAP-1 ([M·2H]²⁺) und protoniertem dimeren GCAP-1 ([2M·H]⁺). B: MALDI-TOF-Massenspektrum von GCAP-1(+Myr). C: HPLC-Elutionsprofile der Proben aus A und B; zur übersichtlicheren Darstellung ist die Kurve für GCAP-1(-Myr) um 0,5 AU verschoben; der markierte Elutionspeak (↓) wurde möglicherweise durch N-myristoyliertes GCAP-1 hervorgerufen.

3.1.2.2 Analytische Hochdruckchromatographie (Analytische HPLC)

Durch die HPLC auf einer reversed-phase-Säule sollte N-myristoyliertes GCAP-1 von nicht-myristoyliertem GCAP-1 getrennt werden. Für das N-myristoylierte Protein wurde eine verlängerte Retentionszeit erwartet, da es durch seinen Myristinsäurerest stärker hydrophob ist als nicht-myristoyliertes GCAP-1.

GCAP-1, das mit NMT koexprimiert worden war (+Myr), und GCAP-1, das nicht mit NMT koexprimiert worden war (-Myr), wurden mit einer RP18-HPLC-Säule aufgetrennt (→ 2.6). Die Retentionszeiten der Hauptpeaks beider Proben unterschieden sich nicht. Im Elutionsprofil von GCAP-1(+Myr) zeigte sich ein Nebenpeak (<10 %) mit längerer Retentionszeit, der möglicherweise durch N-myristoyliertes Protein hervorgerufen wurde (Abbildung 3.2 C).

Die Charakterisierung des rekombinanten GCAP-1 durch die Massenspektrometrie und durch die analytische HPLC zeigte, daß durch die Koexpression mit NMT keine effektive N-Myristoylierung von GCAP-1 erreicht werden konnte. Nur ein geringer Teil des rekombinanten GCAP-1 war möglicherweise N-myristoyliert. Das rekombinante GCAP-1 entsprach in dieser molekularen Eigenschaft nicht dem nativen Protein.

3.1.2.3 Aktivität

Für die Untersuchungen zur Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-1, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde funktionell aktives GCAP-1 benötigt. Das rekombinante GCAP-1 wurde für die Reinigung denaturiert (→ 3.1.1.1, 2.4.3). Außerdem fehlte dem rekombinanten GCAP-1 die N-terminale Acylierung des nativen Proteins (→ 3.1.2.1, 3.1.2.2). Daher war es notwendig, nachzuweisen, daß das gereinigte rekombinante GCAP-1 funktionell aktiv war.

Dafür wurden ROS-Membranen gewaschen, um das native GCAP zu entfernen. Die GC-Aktivität dieser Membranen wurde bestimmt (→ 2.9). Die GC-Aktivität der gewaschenen Membranen wurde durch $[Ca^{2+}]$ nicht mehr beeinflußt. Wenn die gewaschenen Membranen mit rekombinantem GCAP-1 rekonstituiert wurden, wurde die Ca^{2+} -Abhängigkeit der GC-Aktivität wieder hergestellt (→ Abbildung 3.3). Bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ ($-Ca^{2+}$) wurde die GC-Aktivität der gewaschenen ROS-Membranen durch 6 μ M rekombinantes GCAP-1 um das 7-fache gegenüber der GC-Aktivität gewaschener ROS-Membranen ohne GCAP (Basalaktivität) erhöht. Der EC_{50} -Wert für diese Aktivierung betrug etwa 1 μ M GCAP-1. Bei 23,5 μ M $[Ca^{2+}]$ ($+Ca^{2+}$) wurde die GC-Aktivität der gewaschenen ROS-Membranen nicht durch GCAP-1 beeinflußt. Damit wurde die GC-Aktivität der gewaschenen ROS-Membranen, die mit 6 μ M GCAP-1 rekonstituiert wurden, durch die Verminderung der $[Ca^{2+}]$ von 23,5 μ M auf 1 nM um das 7-fache erhöht (→ Abbildung 3.3 B). Das entspricht der Ca^{2+} -Abhängigkeit des nativen Systems (ROS; KOCH und STRYER, 1988; FRINS et al., 1996).

Das gereinigte rekombinante GCAP-1 war also funktionell aktiv.

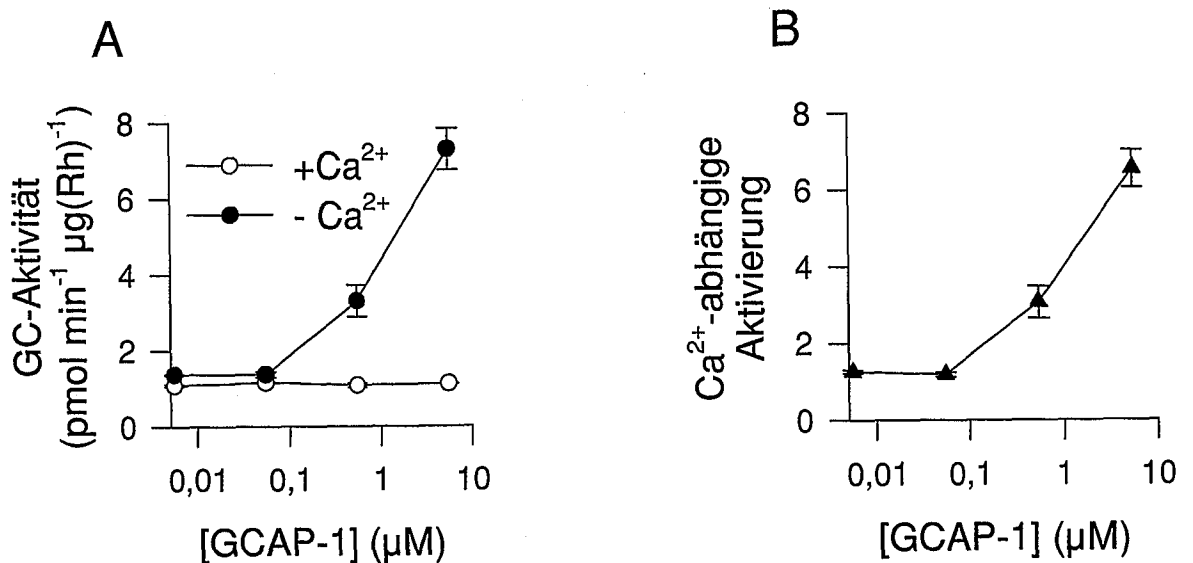


Abbildung 3.3 Rekonstitution von gewaschenen ROS-Membranen mit gereinigtem rekombinanten GCAP-1; A: GC-Aktivität gewaschener ROS-Membranen, die bei 1 nM [Ca²⁺] (-Ca²⁺) bzw. 23,5 µM [Ca²⁺] (+Ca²⁺) mit steigenden Konzentrationen von GCAP-1 rekonstituiert wurden. B: Ca²⁺-abhängige Aktivierung der GC-Aktivität gewaschener ROS-Membranen durch GCAP-1, d.h. Quotient der Aktivität (-Ca²⁺) und (+Ca²⁺) aus A. Die Daten sind Mittelwerte aus dreifachen Ansätzen ± Standardabweichung; die Rhodopsinkonzentration in den Reaktionen betrug 2,3 µg/µl (58 µM).

3.2 Synthese der Peptidbibliothek

Es war das Ziel dieser Arbeit, Regionen der ROS-GC1 zu identifizieren, die eine Funktion für die Regulation durch GCAP-1 haben. Dafür wurde eine Bibliothek aus 92 überlappenden 12-meren Peptiden hergestellt, die die Juxtamembrandomäne, die putative Dimerisierungsdomäne und den C-Terminus der ROS-GC1 abbildet. Die Kriterien, nach denen diese Domänen ausgewählt wurden, werden in der Einleitung dieser Arbeit (→ 1.4.1) erklärt. Im einzelnen bilden die Peptide # 1 - #53 die Region R⁴⁹³ - G⁶⁰⁸, die Peptide #54 - #80 die Region R⁸⁰⁰ - P⁸⁶³ und die Peptide #81 - #92 die Region D¹⁰⁷⁶ - G¹¹⁰⁹ ab (→ Abbildung 3.4). Die Sequenzen aller Peptide werden in Anhang D.1 gezeigt.

Die 92 Peptide wurden parallel auf Festphasen mit einer Kapazität von jeweils 10 µmol synthetisiert (→ 2.3). Die apparenten Ausbeuten betrugen zwischen 3,5 und 13,5 mg Rohpeptid (etwa 3 - 10 µmol). Alle Rohpeptide der Bibliothek wurden durch analytische HPLC charakterisiert. Die Qualität der Rohpeptide war sehr unterschiedlich. Die Bibliothek enthielt neben Substanzen von >80 % apparter Reinheit auch Gemische aus mehreren Hauptbestandteilen (→ Anhang E). Diese unterschiedlichen Ergebnisse entsprechen der erwarteten Leistungsfähigkeit der eingesetzten Synthesemethode.

Die Peptide, die nach den Ergebnissen der Durchmusterungen (→ 3.3, 3.4) näher untersucht wurden, wurden einzeln von Dr. M. Beyermann (FMP Berlin) synthetisiert. Diese Peptide hatten eine Reinheit von mindestens 75 %.

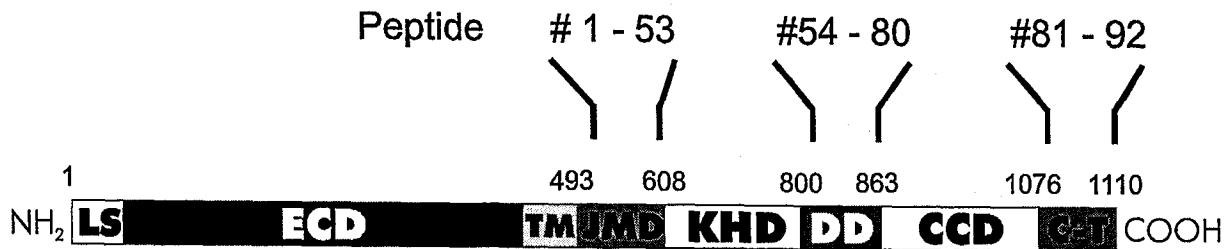


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der ROS-GC1; Lage der Domänen, die von der Peptidbibliothek abgebildet werden. Die Bezeichnungen der einzelnen Domänen werden in Abbildung 1.3 erklärt.

3.3 Durchmusterung der Peptidbibliothek

- Identifizierung inhibitorischer Peptide

Die minimale funktionelle Einheit der ROS-GC ist ein Homodimer. In ROS bildet die ROS-GC mit nativem GCAP einen Komplex unbekannter Stöchiometrie. Wahrscheinlich sind an diesem Komplex auch Tubulin und andere, nicht identifizierte Proteine beteiligt (SCHREM et al., 1999). ROS-GC1 ist die vorherrschende Isoform der ROS-GC in Photorezeptoraußensegmenten (→ 1.3). Peptide, die die Regionen der ROS-GC1 abbilden, die an intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen innerhalb des funktionellen Komplexes beteiligt sind, sollten diesen Komplex stören. Eine solche Störung kann durch die veränderte Aktivität der ROS-GC nachgewiesen werden. Besonders die Peptide, die die Wechselwirkung der ROS-GC mit GCAP stören, sollten die Ca²⁺-abhängige Aktivierung der GC in ROS deutlich beeinflussen.

Daher wurde der Einfluß von allen Peptiden aus der Peptidbibliothek (→ 3.2) auf die GC-Aktivität in ganzen ROS (in Gegenwart des endogenen GCAP) bei 23,5 µM [Ca²⁺] und 1 nM [Ca²⁺] untersucht. Dabei wurde aus dem Verhältnis der GC-Aktivität in Gegenwart eines Peptides bei 1 nM [Ca²⁺] zu der GC-Aktivität bei 23,5 µM [Ca²⁺] der Wert für die Ca²⁺-abhängige Aktivierung der ROS-GC in Gegenwart des entsprechenden Peptides berechnet (→ 2.9.2). Die eingesetzte Peptidkonzentration betrug 0,5 mg/ml (etwa 0,3 mM). Das Ergebnis dieser Durchmusterung wird in Abbildung 3.5 gezeigt.

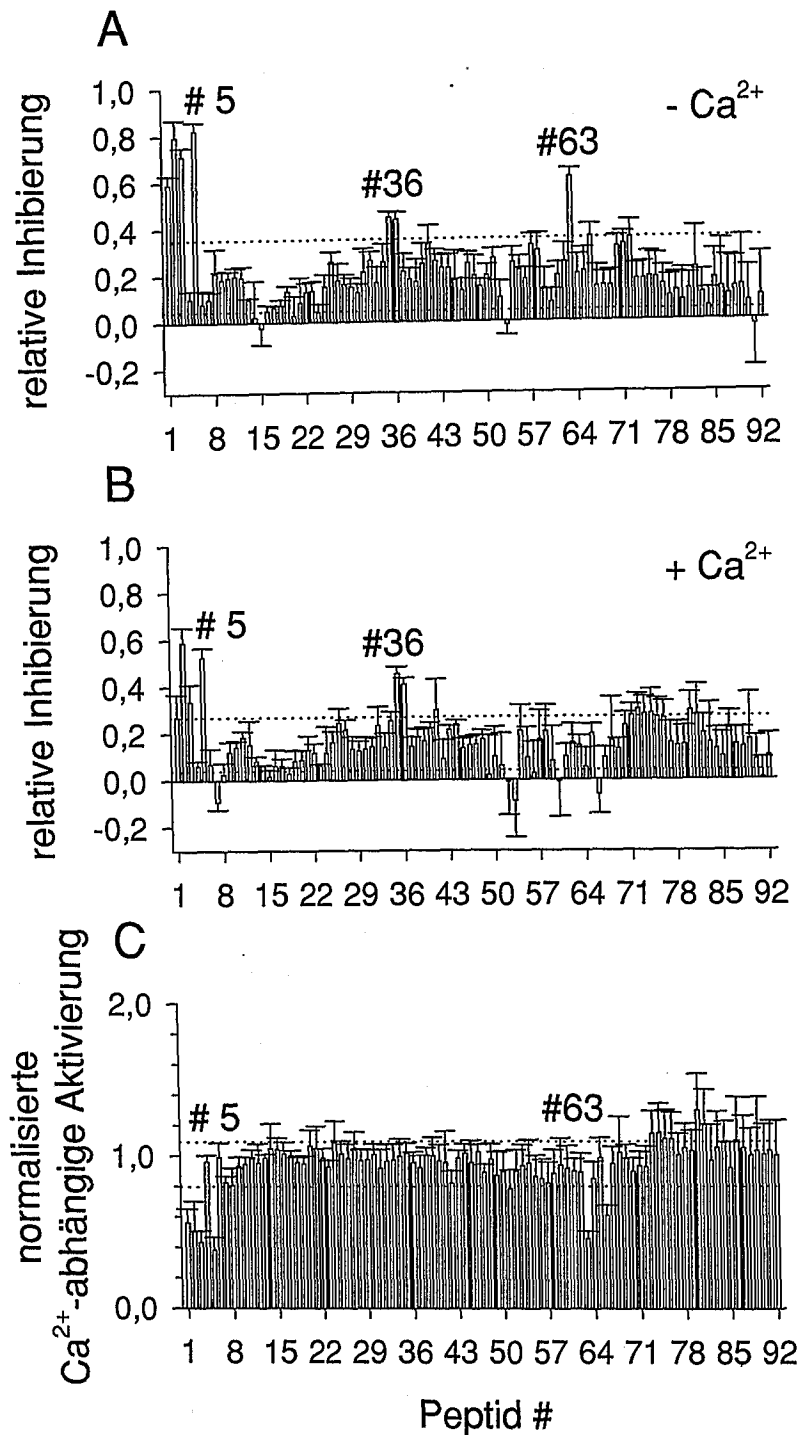


Abbildung 3.5 Durchmusterung der Peptidbibliothek aus ROS-GC1 - Einfluß der Peptide auf die GC-Aktivität in ganzen ROS; A: Relative Inhibierung der GC-Aktivität in ganzen ROS durch 0,5 mg/ml (etwa 0,3 mM) Peptid bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ ($-Ca^{2+}$); die spezifische Aktivität in den Kontrollen (relative Inhibierung 0) betrug $7,4 \pm 0,9$ pmol min^{-1} mg(Rh) $^{-1}$. B: Relative Inhibierung bei 23,5 μ M $[Ca^{2+}]$ ($+Ca^{2+}$); die spezifische Aktivität in den Kontrollen betrug $0,78 \pm 0,09$ pmol min^{-1} mg(Rh) $^{-1}$. C: Normalisierte Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS; die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung in den Kontrollen (normalisierte Aktivierung 1,0) betrug $9,3 \pm 1,6$. Die Daten für die einzelnen Peptide sind Mittelwerte aus dreifachen Ansätzen $\pm$ Standardabweichung; für die relative Inhibierung (A und B) und für die normalisierte Aktivierung (C) wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung für alle Peptide berechnet; die gepunkteten Linien zeigen diesen Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Fast alle Peptide der Peptidbibliothek inhibierten die GC-Aktivität in ganzen ROS bei 23,5 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ und bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ um 10 % oder mehr ($\rightarrow$ Abbildung 3.5 A,B). Daher war es notwendig zu entscheiden, wann der Einfluß eines Peptides erheblich war. Dafür wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung für die relative Inhibierung bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ und bei 23,5 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ bzw. für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung berechnet. Der Einfluß eines Peptides wurde dann als erheblich angesehen, wenn einer der Werte für die relative Inhibierung durch dieses Peptid bzw. der Wert für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung in Gegenwart dieses Peptids signifikant vom Mittelwert der entsprechenden Größe für alle Peptide verschieden war. Dieses Kriterium wird in Abbildung 3.5 bildlich durch die gepunkteten Linien dargestellt. Diese Linien zeigen für die jeweilige Größe den (Mittelwert + Standardabweichung) und den (Mittelwert – Standardabweichung) für alle Peptide. Die relative Inhibierung durch ein Peptid bzw. sein Einfluß auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung sind dann erheblich, wenn der Wert der entsprechenden Größe für das entsprechende Peptid $\pm$ der zugehörigen Standardabweichung außerhalb des Bereiches liegt, der durch die gepunkteten Linien eingegrenzt wird.

Die Peptide # 1 - # 3, # 5, # 7, #35, #36, #63 und #66 hatten einen erheblichen Einfluß auf die GC-Aktivität oder die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS ($\rightarrow$ Abbildung 3.5). Die Peptide # 1 - # 3, # 5 und #63 inhibierten die GC-Aktivität bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ stärker als bei 23,5 μM $[\text{Ca}^{2+}]$. Damit verminderten diese Peptide die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung erheblich. Das Peptid # 7 stimulierte die GC-Aktivität bei 23,5 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ um etwa 10 %. Die GC-Aktivität bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ und die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung wurden durch dieses Peptid nicht erheblich beeinflusst. Die Peptide #35 und #36 inhibierten die GC-Aktivität bei 23,5 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ und 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ etwa gleich stark. Damit hatten die Peptide #35 und #36 keinen erheblichen Einfluß auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung. Das Peptid #66 inhibierte die GC-Aktivität weder bei 23,5 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ noch bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ erheblich. Die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung wurde aber durch das Peptid #66 erheblich vermindert.

Die Peptide # 1 - # 3, # 5, # 7, #35 und #36 bilden zwei Regionen aus der Juxtamembrandomäne der ROS-GC1 ab, die Peptide #63 und #66 eine Region aus der Dimerisierungsdomäne. Nach dem Ergebnis der Durchmusterung sind diese drei Regionen wahrscheinlich an intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen im funktionellen Komplex der ROS-GC1 beteiligt. Die genaue Lage der drei Regionen wird in Abbildung 3.6 gezeigt.

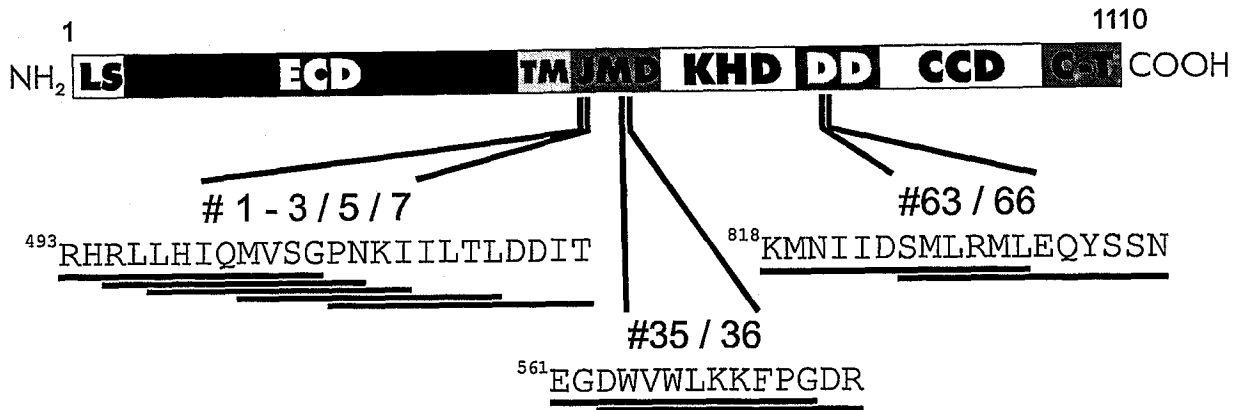


Abbildung 3.6 Schematische Darstellung der ROS-GC1; Lage der Regionen, die von den Peptiden # 1 - 3, # 5, # 7, #35, #36, #63 und #66 abgebildet werden. Die Bezeichnungen der einzelnen Domänen werden in Abbildung 1.3 erklärt.

3.4 Durchmusterung der Peptidbibliothek

- Identifizierung GCAP-1-bindender Peptide

GCAP-1 reguliert die Aktivität der ROS-GC1 wahrscheinlich durch direkte Wechselwirkungen (DUDA et al., 1996a; SCHREM et al., 1999; SOKAL et al., 1999a). Die Regionen der ROS-GC1, die an diesen Wechselwirkungen beteiligt sind, haben damit eine zentrale Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1. Peptide, die diese Regionen abbilden, sollten eine meßbare Affinität für GCAP-1 haben.

Daher wurde die Bindung aller Peptide aus der Peptidbibliothek (→ 3.2) an immobilisiertes GCAP-1 SPR-spektroskopisch gemessen (→ 2.10.3). Die Messungen wurden bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ und bei 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ (1 mM CaCl_2) durchgeführt. Die Peptidkonzentration betrug 0,5 mg/ml (etwa 0,3 mM). Das Ergebnis dieser Durchmusterung wird in Abbildung 3.7 gezeigt.

Fast alle Peptide erzeugten auf der Sensoroberfläche, auf der GCAP-1 immobilisiert worden war, ein spezifisches normalisiertes Resonanzsignal (Bindungssignal), das signifikant größer als Null war (→ Abbildung 3.7). Daher war es notwendig zu entscheiden, wann das von einem Peptid erzeugte Bindungssignal erheblich war. Dafür wurde als Kriterium festgelegt, daß ein Bindungssignal, das signifikant vom Mittelwert für alle Peptide verschieden war, als erheblich gelten sollte.

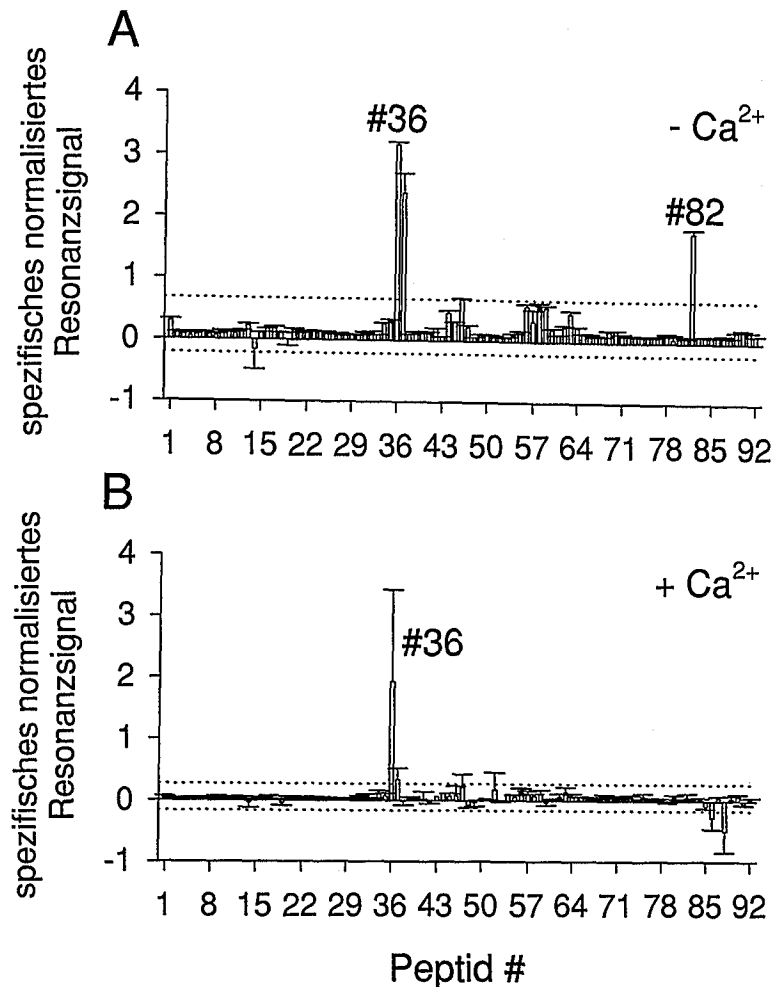


Abbildung 3.7 Durchmusterung der Peptidbibliothek aus ROS-GC1 - Bindung der Peptide an GCAP-1; A: Bindung von 0,5 mg/ml (etwa 0,3 mM) Peptid an immobilisiertes GCAP-1 bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ ($-Ca^{2+}$); es waren 13000 RU ($0,6 \text{ pmol mm}^{-2}$) GCAP-1 immobilisiert worden; der Normalisierungspuls (1 % (v/v) Glycerin in Eluent) erzeugte Resonanzsignale (normalisiertes Resonanzsignal 1,0) von 1202 ± 19 RU bzw. 1127 ± 16 RU (Kontrollflußzelle). B: Bindung bei 1 mM $[Ca^{2+}]$ ($+Ca^{2+}$); es waren 6000 RU ($0,3 \text{ pmol mm}^{-2}$) GCAP-1 immobilisiert worden; der Normalisierungspuls erzeugte Resonanzsignale von 1134 ± 55 RU bzw. 1122 ± 79 RU (Kontrollflußzelle). Die Daten sind Mittelwerte aus doppelten Ansätzen $\pm$ Standardabweichung; für das spezifische normalisierte Resonanzsignal wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für alle Peptide berechnet; die gepunkteten Linien zeigen diesen Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Die Peptide #36, #37 und #82 erzeugten ein erhebliches Bindungssignal. Peptid #36 band bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ und bei 1 mM $[Ca^{2+}]$ an das immobilisierte GCAP-1. Die Peptide #37 und #82 banden nur bei 1 nM $[Ca^{2+}]$. Die Peptide #36, #37 und #82 erzeugten überstöchiometrische Bindungssignale, d.h. die Bindungssignale waren 4- bis 5-mal größer als es für eine 1:1-Bindung der Peptide an das immobilisierte GCAP-1 zu erwarten war².

² Für die 1:1-Bindung eines Peptides mit einem Molekulargewicht von 1300 Da an 10.000 RU (10 ng/mm^2 , entsprechend $0,4 \text{ pmol/mm}^2$) eines immobilisierten Proteins mit einem Molekulargewicht von 23.500 Da (GCAP-1) erwartet man ein maximales Bindungssignal von 550 RU ($0,55 \text{ ng/mm}^2$, ebenfalls entsprechend $0,4 \text{ pmol/mm}^2$).

Neben den Peptiden #36, #37 und #82 gab es noch weitere Peptide (#44 - 46, #56 - 59 und #63), die bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ deutlich größere Bindungssignale erzeugten als die übrigen Peptide (Abbildung 3.7 A). Diese Bindungssignale waren aber nicht groß genug, um nach dem festgelegten Kriterium (s.o.) als erheblich zu gelten.

Die Durchmusterung wurde mehrfach mit Peptidkonzentrationen von 0,1 mg/ml bis 1,0 mg/ml (0,06 - 0,6 mM) wiederholt. Nur die Peptide #36 (bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ und bei 1 mM $[Ca^{2+}]$) und #82 (bei 1 nM $[Ca^{2+}]$) erzeugten reproduzierbar ein erhebliches Bindungssignal.

Das Peptid #36 bildet eine Region aus der Juxtamembrandomäne der ROS-GC1 ab, das Peptid #82 eine Region aus dem C-Terminus. Nach dem Ergebnis der Durchmusterung sind diese Regionen wahrscheinlich an der Bindung von GCAP-1 beteiligt. Die genaue Lage der zwei Regionen wird in Abbildung 3.8 gezeigt.

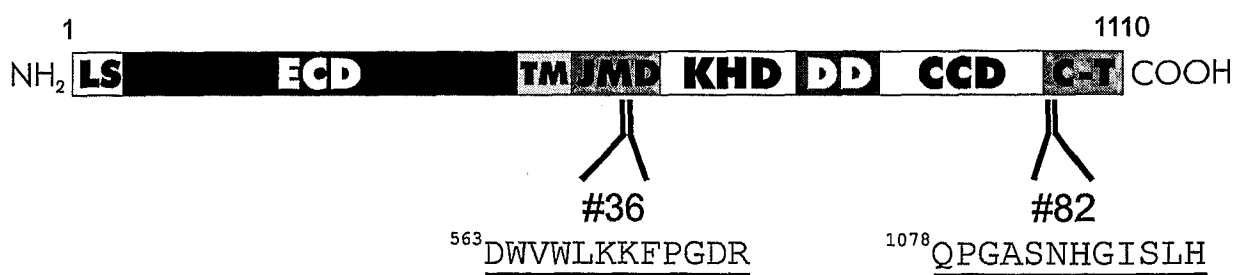


Abbildung 3.8 Schematische Darstellung der ROS-GC1; Lage der Regionen, die von den Peptiden #36 und #82 abgebildet werden. Die Bezeichnungen der einzelnen Domänen werden in Abbildung 1.3 erklärt.

Die Peptide aus der Peptidbibliothek ($\rightarrow$ 3.2) wurden also auf ihren Einfluß auf die GC Aktivität in ganzen ROS ($\rightarrow$ 3.3) und auf ihre Bindung an GCAP-1 (s.o.) untersucht. Durch diese beiden Durchmusterungen wurde eine Reihe von Peptiden identifiziert. Diese Peptide, # 1 - # 3, # 5, # 7, #35, #36, #63, #66 und #82, bilden zusammen vier verschiedene Regionen der ROS-GC1 ab. Diese vier Regionen der ROS-GC1 haben damit möglicherweise eine zentrale Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1. Zwei dieser Regionen sind Teile der Juxtamembrandomäne. Die dritte Region ist ein Teil der putativen Dimerisierungsdomäne, die vierte ist ein Teil des C-Terminus. Im Folgenden werden jeweils repräsentativ die Peptide aus einer Region untersucht, die den größten Einfluß auf die GC-Aktivität in ganzen ROS hatten, bzw. die das größte Bindungssignal erzeugten (# 5, #36, #63 und #82).

Die Ergebnisse der Durchmusterungen werden in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Tabelle 3.1 Durchmusterung der Peptidbibliothek aus ROS-GC1; Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.3 und 3.4;

Peptid	Domäne	Inhibierung der GC-Aktivität in ROS (1 nM [Ca ²⁺])	Inhibierung der GC-Aktivität in ROS (23,5 µM [Ca ²⁺])	Inhibierung der Ca ²⁺ -abhängigen Aktivierung der GC in ROS	Bindung an GCAP-1 (SPR) (1 nM [Ca ²⁺])	Bindung an GCAP-1 (SPR) (1 mM [Ca ²⁺])
# 5	JMD	+	+	+	–	–
#36	JMD	+	+	–	+	+
#63	DD	+	–	+	+/- ¹	–
#82	C-T	–	–	–	+	–

¹ Bindungssignal unterhalb des Kriteriums für erhebliche Bindung (s. Text).

3.5 Einfluß der identifizierten Peptide auf die Aktivität der ROS-GC

Durch die Durchmusterungen der Peptidbibliothek (→ 3.3, 3.4) wurden vier Regionen der ROS-GC1 identifiziert, die möglicherweise eine zentrale Funktion für die Ca²⁺-abhängige Regulation durch GCAP-1 haben. Diese Regionen werden durch die Peptide # 5, #36, #63 und #82 repräsentiert. Der Einfluß dieser Peptide auf die Aktivität der nativen ROS-GC wurde untersucht, um aufzuklären, ob und durch welchen Mechanismus die Peptide die Regulation durch GCAP stören.

3.5.1 Konzentrationsabhängige Inhibierung der GC-Aktivität in ganzen ROS

Die GC-Aktivität in ganzen ROS (in Gegenwart des endogenen GCAP) wurde bei steigenden Konzentrationen der Peptide # 5, #36, #63 und #82 gemessen. Durch die Auftragung der gemessenen GC-Aktivitäten gegen die eingesetzten Peptidkonzentrationen wurden die Dosis-Wirkungskurven für den Einfluß der Peptide auf die GC-Aktivität in ganzen ROS erhalten. Die Dosis-Wirkungskurven wurden für jedes Peptid bei 1 nM [Ca²⁺] und bei 23,5 µM [Ca²⁺] gemessen (→ Abbildung 3.9). An diese Kurven wurde die folgende Form der Hill-Gleichung (HILL, 1910) angepaßt:

$$\alpha = \alpha_{\max} - (\alpha_{\max} - \alpha_{\min}) \frac{c^h}{c^h + IC_{50}^h}.$$

Dabei ist α die spezifische GC-Aktivität bei der Peptidkonzentration c . Die Anpassung der Gleichung an eine Dosis-Wirkungskurve liefert die Peptidkonzentration IC_{50} , bei der die GC-Aktivität halbmaximal inhibiert wird, die maximale und die minimale spezifische GC-Aktivität,

$\alpha_{\max}$ bzw. $\alpha_{\min}$, und den Hill-Koeffizienten h als Maß für die Steilheit der Kurve. Der Wert für die maximale Inhibierung der GC-Aktivität durch ein Peptid beträgt $(1 - \alpha_{\min}/\alpha_{\max})$.

In Tabelle 3.2 werden die IC_{50} -Werte und die Maximalwerte für die Inhibierung der GC-Aktivität in ganzen ROS durch die Peptide # 5, #36, #63 und #82 zusammengefaßt. Außerdem zeigt die Tabelle den Einfluß der jeweiligen Peptide bei auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS (s. auch Abbildung 3.9 C,F).

Tabelle 3.2 Konzentrationsabhängige Inhibierung der GC-Aktivität in ganzen ROS durch die Peptide # 5, #36, #63 und #82

Peptid	1 nM $[Ca^{2+}]$		23,5 μ M $[Ca^{2+}]$		normalisierte Ca^{2+} -abhängige Aktivierung bei der angegebenen Peptidkonzentration	Bemerkungen
	IC_{50}	maximale Inhibierung	IC_{50}	maximale Inhibierung		
# 5	100±40 μ M	92±2 %	260±100 μ M	52±14 %	0,19 - 0,25 (0,5 - 1,5 mM)	n = 3 ¹
#36	610 μ M	88 %	480 μ M	90 %	1,5±0,2 (1,2 mM)	n = 1 ¹
#63	>1 mM	-	>1 mM	-	1,0±0,1 (1,2 mM)	n = 4 ¹
#82	590 μ M	100 %	390 μ M	100 %	1,2±0,3 (1,1 mM)	n = 1 ¹

¹ n: Anzahl unabhängiger Experimente; die einzelnen Experimente wurden als dreifache Ansätze durchgeführt.

Das Peptid # 5 war bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ der effizienteste Inhibitor der GC-Aktivität in ganzen ROS (etwa 90 % maximale Inhibierung mit einem IC_{50} -Wert von etwa 100 μ M). Bei 23,5 μ M $[Ca^{2+}]$ wurde die GC-Aktivität durch dieses Peptid weniger stark inhibiert (etwa 50 % maximale Inhibierung mit einem IC_{50} -Wert von etwa 300 μ M). Damit hatte das Peptid # 5 einen sehr stark hemmenden Einfluß auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS. Durch sättigende Konzentrationen des Peptides # 5 wurde die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung um etwa 80 % reduziert (→ Abbildung 3.9 A-C, Tabelle 3.2). Das Peptid #36 inhibierte die GC-Aktivität bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ und bei 23,5 μ M $[Ca^{2+}]$ etwa gleich stark. Die maximale Inhibierung der GC-Aktivität durch dieses Peptid betrug etwa 90 %. Der Wert für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung wurde durch die höchsten eingesetzten Konzentrationen des Peptides #36 (1,2 mM) signifikant um etwa 50 % erhöht (→ Abbildung 3.9 A-C, Tabelle 3.2). Auch durch das Peptid #82 wurde die GC-Aktivität bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ und bei 23,5 μ M $[Ca^{2+}]$ etwa gleich stark inhibiert. Dieses Peptid hatte aber keinen signifikanten Einfluß auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung (→ Abbildung 3.9 D-F, Tabelle 3.2). Das Peptid #63 (synthetisiert und gereinigt von Dr. M. Beyermann; → 2.3) war kein effektiver Inhibitor der GC-Aktivität. Der bei der Durchmusterung beobachtete Einfluß des Peptides #63 aus der Peptidbibliothek (→ 3.3) war also mit dem gereinigten Peptid nicht reproduzierbar.

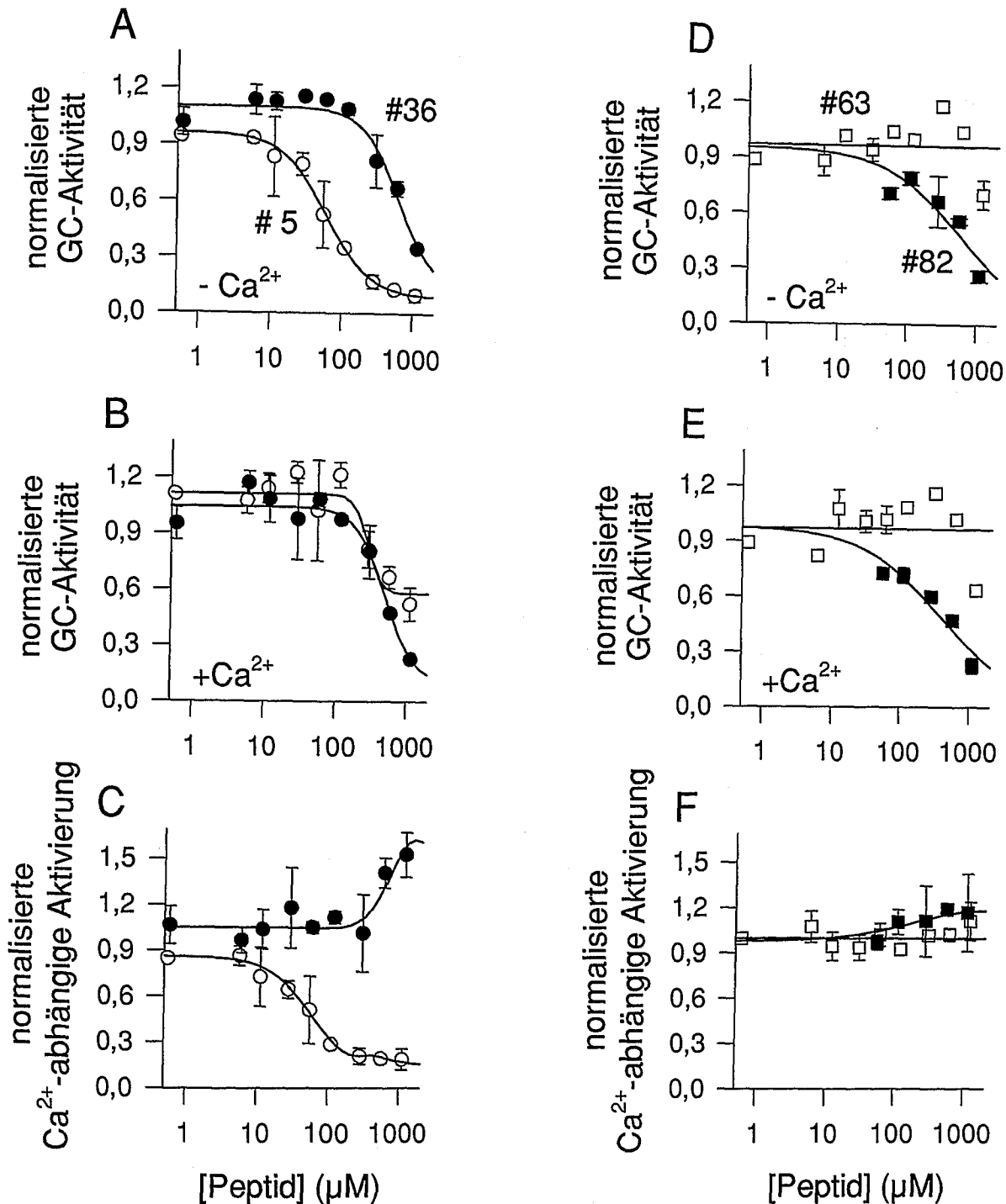


Abbildung 3.9 Konzentrationsabhängige Inhibition der GC-Aktivität in ganzen ROS durch die Peptide # 5 (O), #36 (●), #63 (□) und #82 (■); A,D: Normalisierte GC-Aktivität in ganzen ROS bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ ($-Ca^{2+}$); die spezifische Aktivität in den Kontrollen (normalisierte Aktivität 1,0) betrug $17,6 \pm 1,4$ (#5), $12,8 \pm 1,8$ (#36), $16,2 \pm 0,8$ (#63) und $14,7 \pm 1,5$ pmol min^{-1} mg(Rh) $^{-1}$ (#82). B,E: Normalisierte GC-Aktivität bei 23,5 μ M $[Ca^{2+}]$ ($+Ca^{2+}$); die spezifische Aktivität in den Kontrollen betrug $1,5 \pm 0,2$ (#5), $1,7 \pm 0,2$ (#36), $2,13 \pm 0,04$ (#63) und $1,91 \pm 0,04$ pmol min^{-1} mg(Rh) $^{-1}$ (#82). C,F: Normalisierte Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS, d.h. Quotient der normalisierten Aktivitäten aus A und B bzw. D und E; die Aktivierung in den Kontrollen (normalisierte Aktivierung 1,0) betrug $11,5 \pm 1,9$ (#5), $7,5 \pm 1,0$ (#36), $7,6 \pm 0,4$ (#63) und $7,7 \pm 0,8$ (#82). Die Daten sind Mittelwerte aus zwei- bis dreifachen Ansätzen $\pm$ Standardabweichung; die Reaktionen enthielten 100 μ M ATP. Die durchgezogenen Kurven in A, B, D und E wurden nach der Hill-Gleichung (s.o.) berechnet; die durchgezogenen Kurven in C und F zeigen den Quotienten der Kurven aus A und B bzw. D und E.

Die Peptide # 5, #36 und #82 waren effektive Inhibitoren der GC-Aktivität in ganzen ROS. Obwohl das Peptid #82 in der Durchmusterung der Peptidbibliothek nach Peptiden, die GCAP-1 binden, ein Bindungssignal erzeugte (→ 3.4), hatte es im Gegensatz zu den Peptiden # 5 und #36 keinen Einfluß auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS (s.o.). Daher wurden die weiteren Untersuchungen auf die zwei Regionen aus der Juxtamembrandomäne der ROS-GC1 konzentriert, die durch diese beiden Peptide repräsentiert werden.

Zwei Peptide, # 3a und #34a, die jeweils einen größeren Bereich der untersuchten Regionen abbilden, wurden synthetisiert. Die Sequenz des Peptides # 3a entspricht den Sequenzen der Peptide # 3 - # 7 und die Sequenz des Peptides #34a entspricht den Sequenzen der Peptide #34 - #38 (→ Anhang D.2).

Der Einfluß der Peptide # 3a und #34a auf die GC-Aktivität in ganzen ROS wurde bei 1 nM [Ca^{2+}] und 23,5 μM [Ca^{2+}] untersucht (→ Abbildung 3.10). Die IC_{50} -Werte und die Maximalwerte für die Inhibierung der GC-Aktivität in ganzen ROS durch die Peptide # 3a und #34a werden in Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

Tabelle 3.3 Konzentrationsabhängige Inhibierung der GC-Aktivität in ganzen ROS durch die Peptide # 3a und #34a.

Peptid	1 nM [Ca^{2+}]		23,5 μM [Ca^{2+}]		normalisierte Ca^{2+} -abhängige Aktivierung bei der angegebenen Peptidkonzentration	Bemerkungen
	IC_{50}	maximale Inhibierung	IC_{50}	maximale Inhibierung		
# 3a	250 μM	61 %	690 μM	72 %	$0,8 \pm 0,1$ (0,9 mM)	n = 1 ¹
#34a	250 μM	100 %	150 μM	100 %	$1,5 \pm 0,2$ (0,6 mM) $0,7 \pm 0,1$ (1,2 mM)	n = 1 ¹

¹ n: Anzahl unabhängiger Experimente; die einzelnen Experimente wurden als dreifache Ansätze durchgeführt.

Das Peptid # 3a war weniger effektiv als # 5. Bei 1 nM [Ca^{2+}] wurde die GC-Aktivität in ganzen ROS durch # 3a weniger stark inhibiert als durch # 5 (s.o.; → Abbildung 3.10). Die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS wurde durch 0,9 mM des Peptides # 3a nur um etwa 20 % reduziert. Durch das Peptid #34a wurde die GC-Aktivität bei 1 nM [Ca^{2+}] und bei 23,5 μM [Ca^{2+}] vollständig unterdrückt. Die IC_{50} -Werte für diese Inhibierung waren 150 μM (23,5 μM [Ca^{2+}]) bzw. 250 μM (1 nM [Ca^{2+}]). Der Einfluß des Peptides #34a auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung war biphasisch (→ Abbildung 3.10). Durch 0,6 mM Peptid wurde der Wert der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung um etwa 50 % erhöht. Bei höheren Peptidkonzentrationen unterdrückte #34a die GC-Aktivität bei 1 nM [Ca^{2+}] und bei 23,5 μM [Ca^{2+}] fast vollständig (>95 %). Dadurch wurde die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung deutlich reduziert.

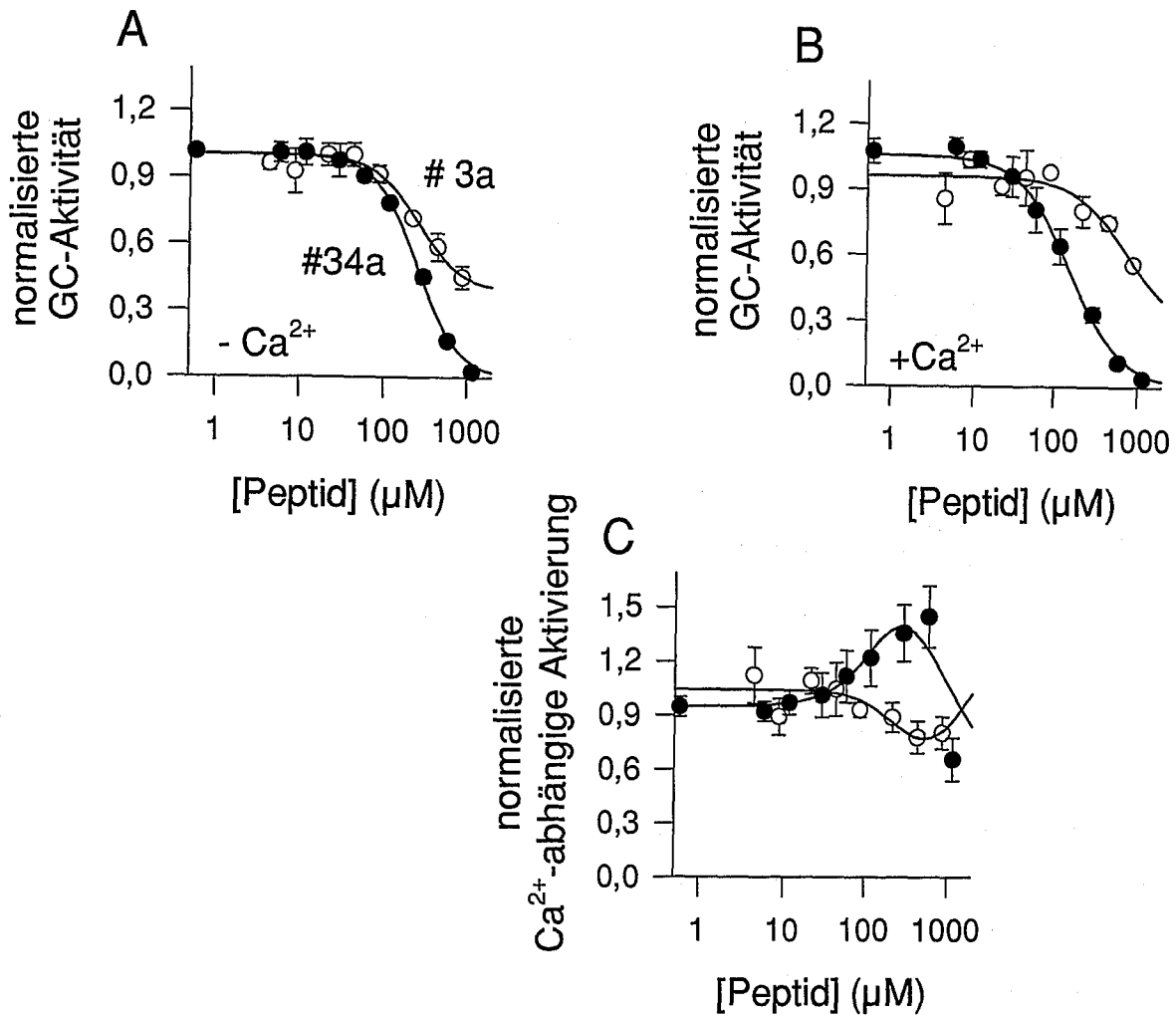


Abbildung 3.10 Konzentrationsabhängige Inhibition der GC-Aktivität in ganzen ROS durch die Peptide # 3a (O) und #34a (●); A: Normalisierte GC-Aktivität in ganzen ROS bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ ($-Ca^{2+}$); die spezifische Aktivität in den Kontrollen (normalisierte Aktivität 1,0) betrug $5,7 \pm 0,8$ (# 3a) und $14,4 \pm 0,7$ pmol min $^{-1}$ mg(Rh) $^{-1}$ (#34a). B: Normalisierte GC-Aktivität bei 23,5 μM $[Ca^{2+}]$ ($+Ca^{2+}$); die spezifische Aktivität in den Kontrollen betrug $0,56 \pm 0,05$ (# 3a) und $1,70 \pm 0,03$ pmol min $^{-1}$ mg(Rh) $^{-1}$ (#34a). C: Normalisierte Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC-Aktivität in ganzen ROS, d.h. Quotient der normalisierten Aktivitäten aus A und B; die Aktivierung in den Kontrollen (normalisierte Aktivierung 1,0) betrug $10,2 \pm 1,7$ (# 3a) und $8,5 \pm 0,4$ (#34a). Die Daten sind Mittelwerte aus dreifachen Ansätzen $\pm$ Standardabweichung; die Reaktionen mit Peptid #34a enthielten 100 μM ATP. Die durchgezogenen Kurven in A und B wurden nach der Hill-Gleichung (s.o.) berechnet; die durchgezogene Kurve in C zeigt den Quotienten der Kurven aus A und B.

Durch die Durchmusterungen der Peptidbibliothek ($\rightarrow$ 3.3, 3.4) wurden vier Regionen der ROS-GC1 identifiziert, die möglicherweise eine Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1 haben. Diese Regionen werden durch die Peptide # 5, #36, #63 und #82 repräsentiert. Die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses dieser Peptide auf die GC-Aktivität in ganzen ROS zeigte, daß nur zwei davon (# 5 und #36) einen Einfluß auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS haben. Das Peptid # 5 greift dabei bevorzugt den Ca^{2+} -freien (aktivierten) Zustand der ROS-GC an, während das Peptid #36 sowohl auf den aktivierten als auch auf den Ca^{2+} -gebundenen (basalen) Zustand wirkt.

Der Einfluß des Peptides #36 auf den basalen Zustand ist dabei stärker als auf den aktivierten Zustand.

Eine verlängerte Version des Peptides # 5, # 3a, hat einen deutlich schwächeren Einfluß auf die GC-Aktivität in ganzen ROS. Wahrscheinlich behindern die zusätzlichen Aminosäuren einen Angriff des Peptides auf den funktionellen Komplex der ROS-GC. Eine verlängerte Version des Peptides #36, #34a, hatte einen stärkeren Einfluß auf die GC-Aktivität. Die zusätzlichen Aminosäuren verstärken also den Einfluß des Peptides auf den funktionellen Komplex der ROS-GC.

3.5.2 Konzentrationsabhängige Inhibierung der GC-Aktivität in gewaschenen ROS-Membranen

Nach den Ergebnissen der Experimente, die in 3.5.1 beschrieben wurden, greifen die Peptide #36 und #34a die ROS-GC wahrscheinlich unabhängig von der Aktivierung durch GCAP an. Diese Vorstellung kann dadurch überprüft werden, daß man den Einfluß der Peptide auf die Aktivität der ROS-GC in Abwesenheit von GCAP (Basalaktivität) untersucht.

Daher wurde die GC-Aktivität gewaschener ROS-Membranen, deren endogenes GCAP entfernt worden war (→ 2.9.1), bei steigenden Konzentrationen der Peptide # 5, # 3a, #36 und #34a gemessen (→ Abbildung 3.11). Die Peptide # 5 und # 3a waren ineffektive Inhibitoren der Basalaktivität der ROS-GC. Die Inhibierung bei den höchsten eingesetzten Peptidkonzentrationen betrug 23 % (1,5 mM # 5) bzw. 43 % (1,7 mM # 3a). Durch die Peptide #36 und #34a wurde die Basalaktivität der ROS-GC fast vollständig unterdrückt. Die IC_{50} -Werte für diese Inhibierung waren 460 μ M (#36) bzw. 270 μ M (#34a).

Die Untersuchung des Einflusses der Peptide auf die Aktivität gewaschener ROS-Membranen zeigte, daß das Peptid # 5 nur mit dem funktionellen Komplex der ROS-GC im aktivierten Zustand wechselwirkt, während die Peptide #36 und #34a den basalen Zustand der ROS-GC angreifen. Die Regionen der ROS-GC1, die durch die Peptide # 5 bzw. #36 repräsentiert werden haben also vermutlich sehr verschiedene Funktionen für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1.

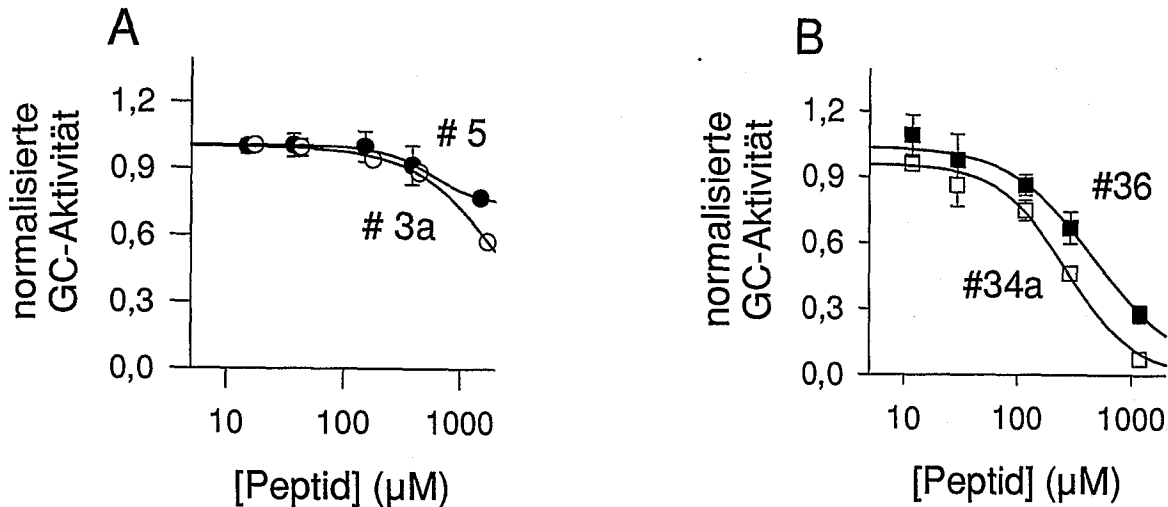


Abbildung 3.11 Konzentrationsabhängige Inhibierung der GC-Aktivität in gewaschenen ROS-Membranen durch die Peptide # 5 (●), # 3a (○), #36 (■) und #34a (□); A,B: Normalisierte GC-Aktivität gewaschener ROS-Membranen; die spezifische Aktivität in den Kontrollen (normalisierte Aktivität 1,0) betrug $4,45 \pm 0,8$ (# 5 und #36) und $4,56 \pm 0,18$ $\text{pmol min}^{-1} \text{mg(Rh)}^{-1}$ (# 3a und #34a). Die Daten sind Mittelwerte aus dreifachen Ansätzen $\pm$ Standardabweichung; als Substrat wurde MnGTP eingesetzt; die Reaktionen enthielten 100 μM ATP. Die durchgezogenen Kurven wurden nach der Hill-Gleichung ($\rightarrow$ 3.5.1) berechnet.

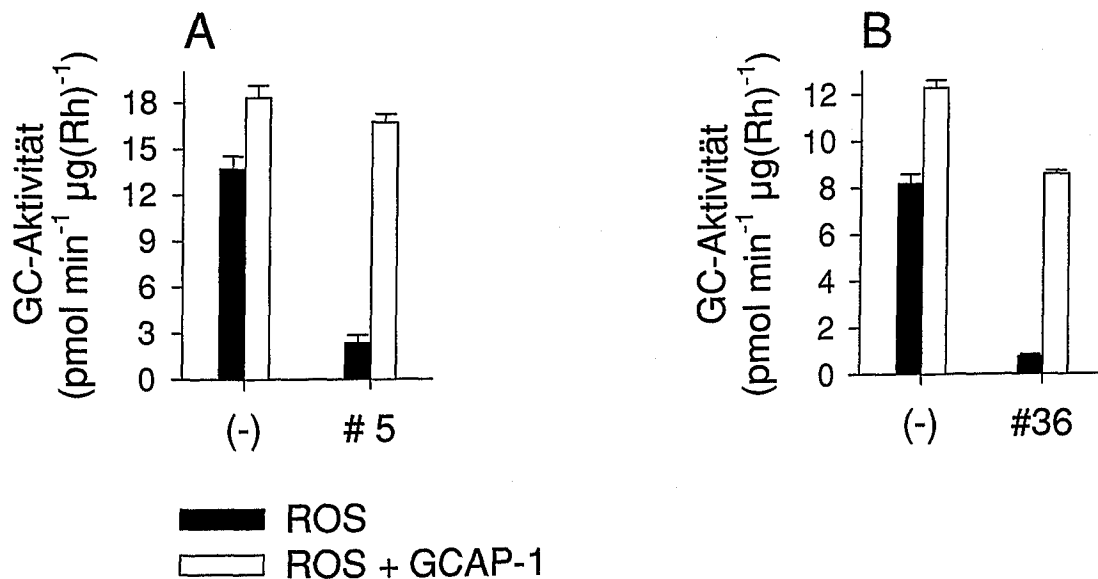


Abbildung 3.12 Aufhebung des Einflusses der Peptide # 5 und #36 durch GCAP-1; GC-Aktivität in ganzen ROS bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ ohne bzw. mit 20 μM exogenem GCAP-1 und ohne (-) bzw. mit 320 μM # 5 (A) oder 1 mM #36 (B). Die Daten sind Mittelwerte aus dreifachen Ansätzen $\pm$ Standardabweichung; die Reaktionen enthielten 100 μM ATP.

3.5.3 Aufhebung des Einflusses der Peptide # 5 und #36 durch GCAP-1

Wenn die Peptide # 5 oder #36 direkt oder indirekt die Wechselwirkung von GCAP-1 mit der ROS-GC1 stören, sollte ihr Einfluß dadurch aufzuheben sein, daß die Konzentration von GCAP-1 erhöht wird.

Dafür wurde die GC-Aktivität in ganzen ROS bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ durch sättigende Konzentrationen der Peptide # 5 (320 μ M) und #36 (1 mM) unterdrückt. Parallel wurde dasselbe Experiment in Gegenwart von 20 μ M GCAP-1 durchgeführt. In dem Experiment, dessen Ergebnis in Abbildung 3.12 gezeigt wird, wurde die GC-Aktivität in ganzen ROS durch 320 μ M des Peptides # 5 auf 17 % reduziert. Durch 20 μ M exogenes GCAP-1 wurde der Einfluß des Peptides fast vollständig aufgehoben. Der Wert der GC-Aktivität betrug dabei 91 % des Wertes der Kontrolle (ohne Peptid) mit 20 μ M GCAP-1 bzw. 123 % des Wertes der Kontrolle ohne exogenes GCAP. Durch 1 mM des Peptides #36 wurde die GC-Aktivität auf 9 % reduziert. Durch 20 μ M exogenes GCAP-1 wurde der Einfluß von #36 zum größten Teil aufgehoben. Der Wert der GC-Aktivität betrug dabei 70 % des Wertes der Kontrolle mit 20 μ M GCAP-1 bzw. 105 % des Wertes der Kontrolle ohne exogenes GCAP.

Durch exogenes GCAP-1 wurde der Einfluß der Peptide # 5 und #36 auf die GC Aktivität in ganzen ROS aufgehoben. Der inhibierende Einfluß der Peptide auf die GC-Aktivität beruht wahrscheinlich nicht auf einer direkten Wechselwirkung mit GCAP-1, da bereits ein molares Verhältnis von GCAP-1 zu Peptid von 1:16 (# 5) bzw. 1:50 (#36) ausreichend war, um diesen Einfluß aufzuheben. Eine erhöhte Konzentration von GCAP-1 schützt also den funktionellen Komplex der ROS-GC gegen den Angriff der Peptide.

3.6 Bindung der identifizierten Peptide an Zielproteine

Die Untersuchung des Einflusses der Peptide # 5 und #36 auf die GC-Aktivität in ROS (→ 3.3, 3.5) zeigte, daß die Peptide die Ca^{2+} -abhängige Regulation der GC in ROS durch GCAP stören. Die Regionen der ROS-GC1, die durch die Peptide # 5 und #36 repräsentiert werden, haben wahrscheinlich eine zentrale Funktion für die Regulation durch GCAP-1. Die Bindung von möglichen Zielproteinen (einschließlich GCAP-1) an Peptide, die diese Regionen abbilden, wurde untersucht, um Informationen über den Mechanismus zu erhalten, durch den diese Regionen ihre Funktion erfüllen.

3.6.1 Affinitätschromatographie

Die Peptide # 5 und #36 beeinflussen die Aktivität der GC in ROS durch unterschiedliche Mechanismen. Obwohl beide Peptide die Ca^{2+} -abhängige Regulation der GC in ROS durch GCAP stören, ist es für beide Peptide unwahrscheinlich, daß sie GCAP-1 in einem Verhältnis von 1:1 binden (→ 3.4, 3.5.3). Daher wurde untersucht, ob andere Proteine aus ROS an die Regionen der ROS-GC1 binden, die durch diese Peptide repräsentiert werden.

Dafür wurden die Peptide # 3a bzw. #34a über eine zusätzlich angefügte N-terminale Cysteyl-Glycin-Gruppe an Sepharose 4B gekoppelt (immobilisiert) (→ 2.11.1). Die Peptide # 3a bzw. #34a bilden jeweils einen größeren Bereich der Regionen ab, die von den Peptiden # 5 bzw. #36 repräsentiert werden (→ 3.5.1). Die Bindung von Proteinen aus drei verschiedenen Präparationen, nämlich solubilisierten ganzen ROS, einem Extrakt der löslichen ROS-Proteine (DEX, → 2.11.3) und solubilisierten gewaschenen ROS-Membranen, an die Peptidaffinitäts-Sepharosen wurde bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ bzw. 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ (1 mM CaCl_2) untersucht (→ 2.11). Die Proteinzusammensetzung der ungebundenen Fraktionen, der Hochsalz-Waschfraktionen (1 M NaCl) und der Eluate (0,5 % SDS) der Bindungsexperimente wurde durch SDS-PAGE untersucht (→ Abbildung 3.13).

Die Bindungsexperimente mit dem DEX wurden mit wenig Detergens (0,005 % Tween20) bei Pufferbedingungen durchgeführt, die den Pufferbedingungen für die Bestimmung der GC-Aktivität entsprachen (→ 2.9, 2.11.5). Dies führte dazu, daß die häufigsten löslichen Proteine aus ROS (Recoverin, M_{app} 26 kDa; Transducin α / β , M_{app} 38 kDa / 35 kDa; Arrestin, M_{app} 48 kDa; PDE, M_{app} 94 kDa) unspezifisch an # 3a-, #34a- und die Cysteinsepcharose (Kontrolle) banden (→ Abbildung 3.13 B). Damit sind die Ergebnisse der Bindungsexperimente mit dem DEX schwer zu interpretieren.

Die Bindungsexperimente mit solubilisierten ganzen ROS bzw. ROS-Membranen, wurden in Gegenwart des Detergens *n*-Dodecyl- β -D-maltosid (1 % (w/v)) und bei einer höheren Salzkonzentration (180 mM KCl) durchgeführt. Diese Pufferbedingungen wurden gewählt, um die Membranproteine, die in den Präparationen enthalten waren, effektiv zu solubilisieren. Durch

diese Pufferbedingungen wurde die unspezifische Bindung von Proteinen an die Peptidaffinitäts-Sepharosen reduziert. Ein geringer Anteil des Rhodopsins (M_{app} ~35 kDa) und der PDE band unspezifisch an die # 3a-, an die #34a- und an die Cysteinsepharose. Abgesehen davon war die Proteinzusammensetzung des Eluates der # 3a-Sepharose aber deutlich von der Proteinzusammensetzung der Eluate der #34a- und der Cysteinsepharose (→ Abbildung 3.13 A, C) verschieden. Bei dem Experiment mit ganzen solubilisierten ROS (→ Abbildung 3.13 A) enthielt das Eluat der # 3a-Sepharose Proteine folgender M_{app} (SDS-PAGE): ~36 kDa, ~37 kDa, 43 kDa, ~45 kDa, ~55 kDa (Doppelbande), ~60 kDa, ~75 kDa (Doppelbande), ~100 kDa und ~112 kDa. Diese Proteine banden unabhängig davon, ob die Experimente bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ oder bei 1 mM $[Ca^{2+}]$ durchgeführt wurden, an die # 3a-Sepharose, aber nicht an die #34a- bzw. an die Cysteinsepharose (Kontrolle). Bei dem Experiment mit solubilisierten ROS-Membranen (→ Abbildung 3.13 C) banden nur die Proteine mit den M_{app} ~37 kDa, ~55 kDa, ~60 kDa, ~75 kDa und ~112 kDa spezifisch an # 3a-Sepharose.

Eine Reihe verschiedener Proteine band also spezifisch an # 3a-Sepharose. Die Region der ROS-GC1, die durch das Peptid # 3a abgebildet wird, ist wahrscheinlich an einer inter- oder intramolekularen Wechselwirkung beteiligt, die eine Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1 hat (→ 3.5). Daher sollten die Proteine, die spezifisch an # 3a-Sepharose banden, identifiziert werden, um zu klären, ob möglicherweise ein funktioneller Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und der ROS-GC existiert.

Dafür wurden in den Fraktionen, die bei Bindungsexperimenten erhalten wurden (s.o.), bekannte Proteine aus ROS immunchemisch nachgewiesen. Das Ergebnis wird für einige Proteine in Abbildung 3.14 gezeigt. In Tabelle 3.4 wird das Bindungsverhalten aller immunchemisch nachgewiesenen Proteine gegenüber der # 3a-, der #34a- und der Cysteinsepharose (Kontrolle) zusammengefaßt. Keines der untersuchten Proteine wurde durch irgendeine der Peptidaffinitäts-Sepharosen in der Hochsalzfraktion angereichert. Daher galt ein Protein dann als gebunden, wenn es im Eluat (0,5 % SDS) der entsprechenden Peptidaffinitäts-Sepharose nachgewiesen werden konnte, oder wenn es in der ungebundenen Fraktion nicht mehr nachgewiesen werden konnte (quantitative Bindung).

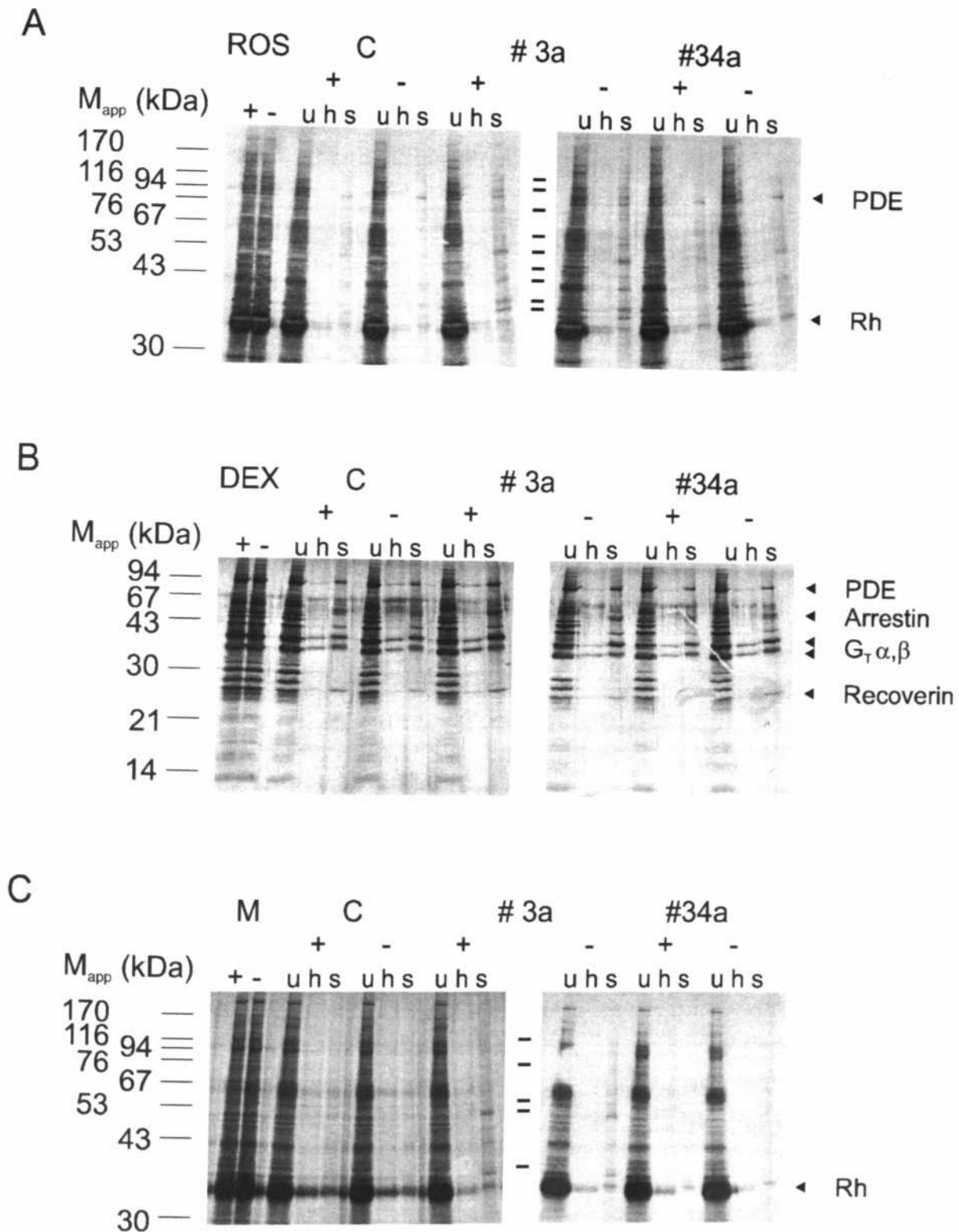


Abbildung 3.13 Affinitätschromatographie an # 3a- und #34a-Sepharose; A: Bindung von Proteinen aus ganzen solubilisierten ROS (ROS) an # 3a-, an #34a- und an Cysteinsepharose (C) bei 1 mM $[Ca^{2+}]$ (1 mM $CaCl_2$) (+) bzw. 1 nM $[Ca^{2+}]$ (-). B: Bindung von löslichen ROS-Proteinen (DEX). C: Bindung von Proteinen aus solubilisierten ROS-Membranen (M). u: ungebundene Fraktion; h: Hochsalzwashfraktion; s: SDS-Eluat. Die Proteine aus je 10 μ l der Fraktionen bzw. 1,7 μ l der Ausgangspräparationen (ROS / DEX / M) wurden durch 10 % (ROS und M) bzw. 15 % (DEX) SDS-PAGE getrennt und mit kolloidalem Silber gefärbt. Die Markierungen zwischen den Gelen in A und C zeigen die Proteine, die spezifisch an #3a-Sepharose banden (s.Text).

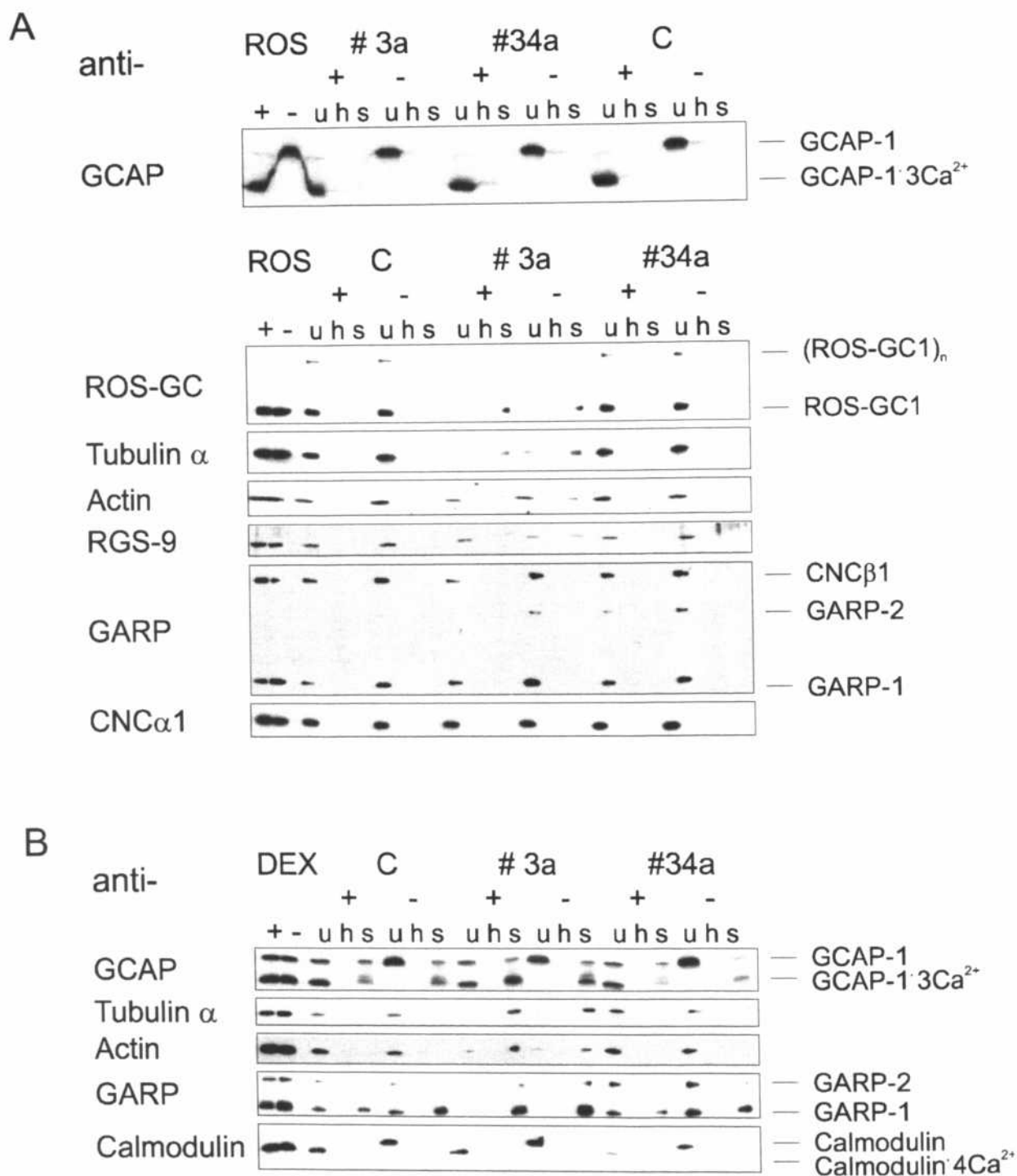


Abbildung 3.14 Affinitätschromatographie an # 3a- und #34a-Sepharose - immunchemischer Nachweis einzelner Proteine; A: Bindung von Proteinen aus ganzen solubilisierten ROS (ROS) an # 3a-, an #34a- und an Cystein-Sepharose (C) bei 1 mM [Ca²⁺] (1 mM CaCl₂) (+) bzw. 1 nM [Ca²⁺] (-). B: Bindung von löslichen ROS-Proteinen (DEX). C (→ folgende Seite): Bindung von Proteinen aus solubilisierten ROS-Membranen (M). u: ungebundene Fraktion; h: Hochsalzwashfraktion; s: SDS-Eluat. Die Proteine aus je 10 µl der Fraktionen bzw. 1,7 µl der Ausgangspräparationen (ROS / DEX / M) wurden durch SDS-PAGE getrennt; einzelne Proteine wurden immunchemisch nachgewiesen (→ 2.2.2.3).

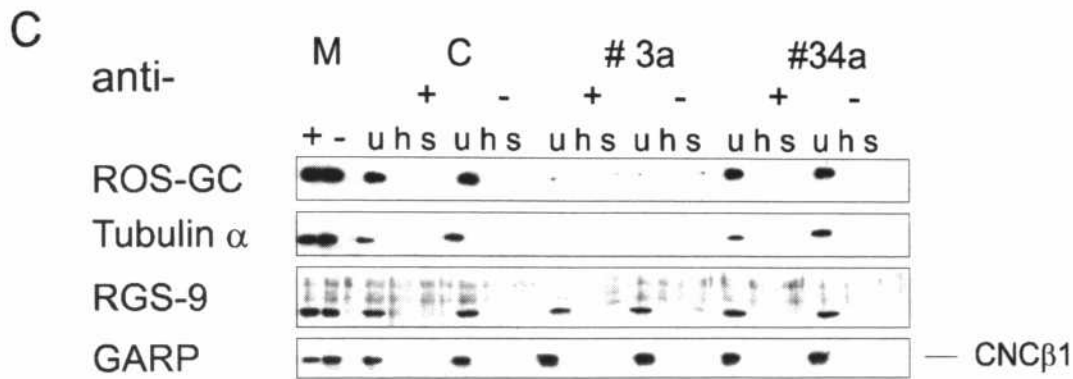


Abbildung 3.14 (Fortsetzung von S.72)

Tabelle 3.4 Affinitätschromatographie an # 3a- und #34a-Sephrose; Zusammenfassung der Ergebnisse für die immunchemisch nachgewiesenen Proteine. –: keine Bindung; +: Bindung; ++: quantitative Bindung; n.b.: nicht bestimmt.

Protein	ROS			DEX			ROS-Membranen		
	Kontrolle	# 3a	#34a	Kontrolle	# 3a	#34a	Kontrolle	# 3a	#34a
GCAP	–	–	–	+	+	+	n.b.	n.b.	n.b.
ROS-GC	–	+ / ++ ¹	–	n.b.	n.b.	n.b.	–	+ / ++ ¹	–
Tubulin α	–	+ / ++ ¹	–	–	++	–	–	+ / ++ ¹	–
Actin	–	+	–	+ / – ¹	+	+ / – ¹	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²
RGS9	–	+	–	n.b.	n.b.	n.b.	–	+	–
GARP-1/-2	–	–	–	+	++	+	n.b.	n.b.	n.b.
CNC α 1	–	–	–	n.b.	n.b.	n.b.	–	–	–
CNC β 1	–	–	–	n.b.	n.b.	n.b.	–	–	–
PDE	+	+	+	+	+	+	n.b.	n.b.	n.b.
ABCR	–	–	–	n.b.	n.b.	n.b.	–	–	–
G _{Tα}	–	–	–	+ ³	+ ³	+ ³	n.b.	n.b.	n.b.
GRK1	–	–	–	–	–	–	n.b.	n.b.	n.b.
Recoverin	n.b.	n.b.	n.b.	+	+	+	n.b.	n.b.	n.b.
Calmodulin	n.b.	n.b.	n.b.	–	–	–	n.b.	n.b.	n.b.

¹ divergente Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten;

² in keiner Fraktion immunchemisch nachweisbar.

³ identifiziert über die M_{app} bei der SDS-PAGE; kein immunchemischer Nachweis.

Die Ergebnisse, die für die Bindung von bekannten Proteinen aus ROS an die # 3a- und #34a-Sephrose erhalten wurden, lassen sich durch die folgenden Aussagen zusammenfassen:

- GCAP band weder spezifisch an # 3a- noch an #34a-Sephrose.
- ROS-GC und Tubulin (α) banden spezifisch an # 3a-Sephrose; das gilt sowohl für membranassoziiertes Tubulin aus ROS-Membranen als auch für lösliches Tubulin aus dem DEX.
- Actin band spezifisch an # 3a-Sephrose; die Bindung erschien weniger stark als die von ROS-GC und Tubulin; in den Experimenten mit dem DEX wurde in einem Fall auch unspezifische Bindung an die Kontrolle beobachtet.
- Das Transducin-GTPase-aktivierende Protein RGS9, das SENO et al. (1998) als Inhibitor der ROS-GC identifiziert haben, band spezifisch an # 3a-Sephrose; die Bindung erschien weniger stark als die von ROS-GC und Tubulin, ähnlich der von Actin.
- Keines der Proteine (GARP-1 /-2, CNGC α /- β , PDE, ABCR), die in ROS einen Komplex bilden, der durch die GARP-Proteine vermittelt wird und an dem möglicherweise auch die ROS-GC beteiligt ist (KÖRSCHEN et al., 1999), band spezifisch an # 3a-Sephrose.
- Die löslichen Proteine Transducin α ($G_{T\alpha}$), Rhodopsinkinase (GRK1), Recoverin und Calmodulin banden nicht spezifisch an # 3a- oder #34a-Sephrose.
- Keines der untersuchten Proteine band spezifisch an #34a-Sephrose.

GCAP-1 bindet also weder an das immobilisierte Peptid # 3a noch an das immobilisierte Peptid #34a. Einige ROS-Proteine, die möglicherweise einen funktionellen Komplex bilden, binden an das Peptid # 3a. Davon wurden Actin (43 kDa), Tubulin (55 kDa), RGS9 (57 kDa) und ROS-GC (112 kDa) identifiziert. Die restlichen gebundenen Proteine (M_{app} etwa 36 kDa, 37 kDa, 45 kDa, 75 kDa und 100 kDa) sind möglicherweise Tubulin-assoziierte Proteine. Sie konnten bis jetzt nicht identifiziert werden. Die Region der ROS-GC1, die durch die Peptide # 5 und # 3a repräsentiert wird, ist nach diesem Ergebnis wahrscheinlich an einer intra- oder intermolekularen Wechselwirkung im funktionellen Komplex der ROS-GC1 beteiligt.

3.6.2 Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie

3.6.2.1 Bindung des Peptides #36 und der flankierenden Peptide an immobilisiertes GCAP-1

Das Peptid #36, das eine Region aus der Juxtamembrandomäne der ROS-GC1 abbildet, band bei der Durchmusterung der Peptidbibliothek an immobilisiertes GCAP-1 (→ 3.4). Dieses Peptid war außerdem ein effektiver Inhibitor der GC-Aktivität in ROS (→ 3.3, 3.5). GCAP-1 band aber in einem Affinitätschromatographischen Experiment (→ 3.6.1) nicht an das immobilisierte Peptid #34a, eine verlängerte Version des Peptides #36.

Durch SPR-Spektroskopie wurde die Wechselwirkung der Peptide #34, #36, #38 und #34a (→ Abbildung 3.15, Anhang D.2) mit GCAP-1 untersucht, um die Funktion der Region, die durch das Peptid #36 repräsentiert wird, genauer zu charakterisieren.

Ac- ⁵⁵⁹ LYEGDWVWLKKF-NH ₂	#34
Ac- ⁵⁶³ DWVWLKKFPGDR-NH ₂	#36
Ac- ⁵⁶⁷ LKKFPGDRHIAI-NH ₂	#38
⁵⁵⁹ LYEGDWVWLKKFPGDRHIAI-NH ₂	#34a

Abbildung 3.15 Sequenzen der Peptide #34, #36, #38 und #34a; Ac-: N-terminale Acetylgruppe; -NH₂: C-terminale Amidierung. Die Indices beziehen sich auf die Aminosäurepositionen in der ROS-GC1.

Die Bindung der Peptide #34, #36, #38 und #34a an immobilisiertes GCAP-1 wurde bei 1 nM [Ca²⁺] oder 1 mM [Ca²⁺] (1 mM CaCl₂) SPR-spektroskopisch gemessen (→ 2.10.4). Dafür wurde jeweils etwa die gleiche Menge GCAP-1 wie in der Durchmusterung (→ 3.4) immobilisiert (etwa 4000 - 10.000 RU). Die Ergebnisse von repräsentativen Experimenten mit den Peptiden #34, #36 und #34a bei 1 nM [Ca²⁺] werden in Abbildung 3.16 A-C gezeigt. Der Kontakt der Peptide mit dem immobilisierten GCAP-1 erzeugte ein transientes Bindungssignal mit konzentrationsabhängiger Amplitude. Auch mit den höchsten eingesetzten Peptidkonzentrationen wurde keine Sättigung erreicht. Die beobachteten Bindungssignale bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen des Peptides #34a waren überstöchiometrisch (→ Abbildung 3.16 C). Für das Peptid #36 war auch bei der Durchmusterung der Peptidbibliothek ein überstöchiometrisches Signal beobachtet worden (→ 3.4). Wenn die Experimente bei 1 mM [Ca²⁺] durchgeführt wurden, wurden qualitativ ähnliche Bindungssignale erzeugt. Die Amplituden der Bindungssignale waren dabei um das etwa 1,5- bis 3-fache kleiner als bei 1 nM [Ca²⁺]. Mit dem Peptid #38 wurden in keinem Fall Bindungssignale beobachtet (vgl. Abbildung 3.7). Es banden also nur diejenigen untersuchten Peptide an das immobilisierte GCAP-1, deren Sequenz das DWVW-Motiv der Peptide #34 und #36 enthielt (→ Abbildung 3.15).

Für die Auswertung der Experimente wurde an die Assoziationsphase der korrigierten Sensorgramme (→ 2.10.4) die folgende Exponentialgleichung mit zwei Komponenten angepaßt.

$$R = R_{eq} \left(1 - \left(r_1 \cdot e^{-k_{s1}(t-t_0)} + (1-r_1) \cdot e^{-k_{s2}(t-t_0)} \right) \right).$$

Dabei steht R für die Amplitude des Resonanzsignals, t für die Zeit und t_0 für den Startzeitpunkt der Probeninjektion. Die Anpassung der Gleichung an ein Sensorgramm liefert die Amplitude des Bindungssignals im Fließgleichgewicht, R_{eq} , den Wichtungsfaktor r_1 und die Zeitkonstanten der Assoziation, k_{s1} bzw. k_{s2} . Durch die Auftragung der ermittelten R_{eq} -Werte gegen die Peptidkonzentration im Analyten erhält man die Bindungsisotherme für die Bindung eines Peptides an das immobilisierte GCAP-1 (→ Abbildung 3.16 D-F).

Die gemessenen Bindungsisothermen für die Bindung der Peptide #34, #36 und #34a an das immobilisierte GCAP-1 können nicht durch eine 1:1-Bindung der Peptide an GCAP-1 erklärt werden. Für die Bindung der Peptide an die Sensoroberfläche gab es keine erkennbare Maximalamplitude des Bindungssignals (Sättigung). Bei geringeren Immobilisierungsdichten von GCAP-1 (≤ 1000 RU) wurde keine Bindung der Peptide beobachtet. GCAP-1 als Analyt band nicht an das immobilisierte Peptid #34a. Dieses Ergebnis entspricht dem Ergebnis der Affinitätschromatographie, nach dem GCAP-1 nicht an Peptid #34a band, das an Sepharose 4B gekoppelt war (→ 3.6.1).

Nach diesen Ergebnissen kann die beobachtete spezifische Bindung der Peptide #34, #36 und #34a an immobilisiertes GCAP-1 wahrscheinlich dadurch erklärt werden, daß diese Peptide eine Tendenz zur Selbstassoziation haben. Hohe Immobilisierungsdichten von GCAP-1 begünstigen dann die reversible Bildung von Peptidaggregaten auf der Sensoroberfläche, indem sie durch die Wechselwirkung von GCAP-1 mit den Peptiden deren lokale Konzentration erhöhen.

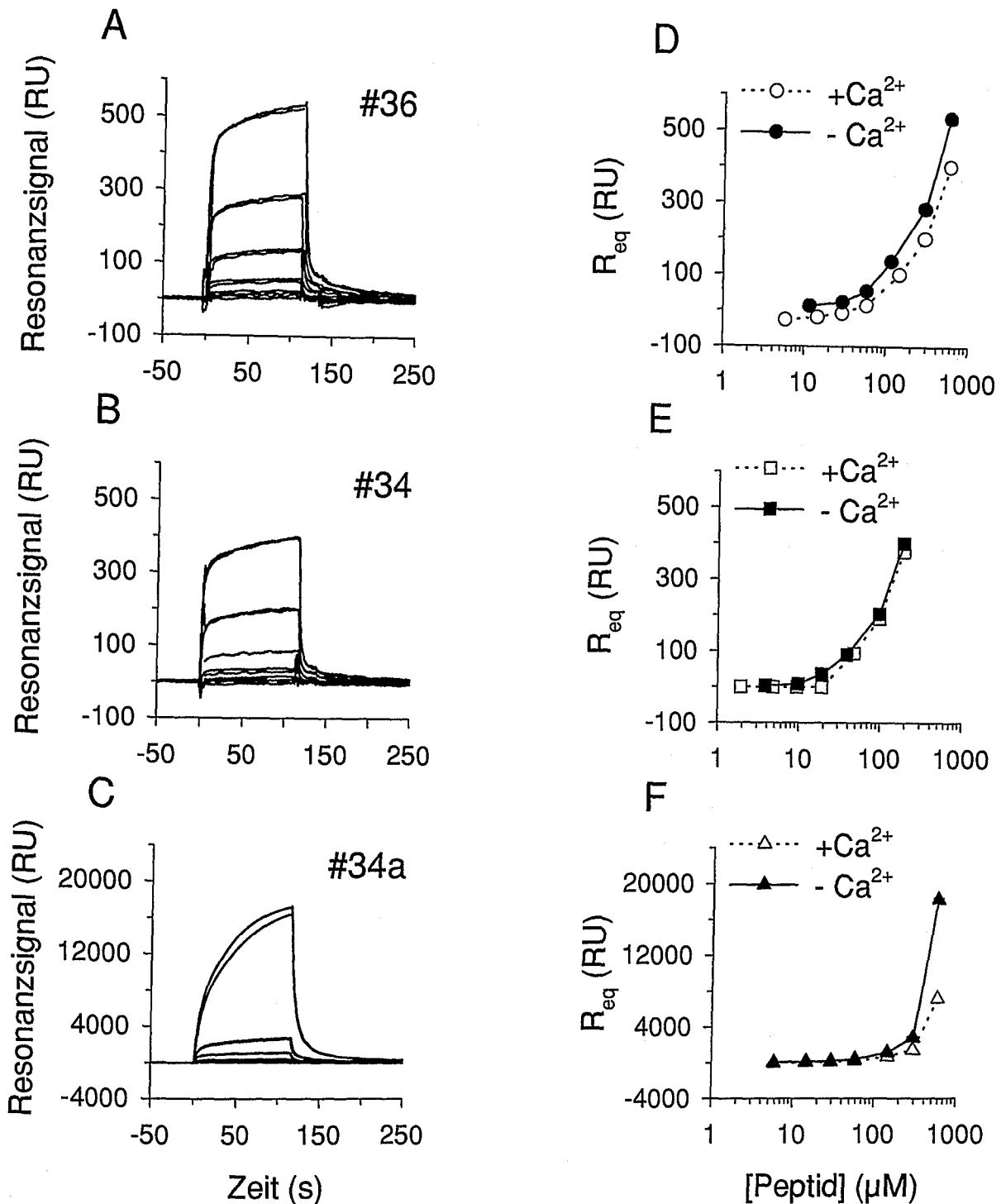


Abbildung 3.16 Bindung der Peptide #34 ($\square, \blacksquare$), #36 ($\circ, \bullet$) und #34a ($\triangle, \blacktriangle$) an immobilisiertes GCAP-1; A,B,C: Bindung der Peptide an 10.000 RU immobilisiertes GCAP-1 bei 1 nM $[Ca^{2+}]$; die Peptidkonzentrationen betrugen 12, 29, 59, 117, 293 und 587 μM #36 (A), 4, 10, 19, 39, 99 und 191 μM #34 (B) und 6, 15, 29, 58, 146, 291 und 583 μM #34a (C). Die Experimente wurden als zweifache Ansätze durchgeführt; die Sensorgramme wurden korrigiert ($\rightarrow 2.10.4$). D,E,F: Bindungsisothermen für die Bindung der Peptide an 10.000 RU immobilisiertes GCAP-1; die Daten stammen aus der Auswertung der Experimente in A,B,C (- Ca^{2+}) und von Experimenten, die bei 1 mM $[Ca^{2+}]$ in der selben Flußzelle durchgeführt wurden (+ Ca^{2+}). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (hier: kleiner als die Größe der Symbole für die einzelnen Datenpunkte).

3.6.2.2 Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a

Die Peptide #34, #36 und #34a haben wahrscheinlich eine Tendenz zur Selbstassoziation. Die Wechselwirkung des Peptides #34a im Analyten mit immobilisiertem Peptid #34a wurde SPR-spektroskopisch gemessen, um zu überprüfen, ob dieses Peptid tatsächlich an sich selbst bindet.

Die Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a wurde bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ und bei 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ (1 mM CaCl_2) gemessen. Der Kontakt des Peptides #34a mit dem immobilisierten Peptid #34a erzeugte ein transientes Bindungssignal mit konzentrationsabhängiger Amplitude. Auch mit den höchsten eingesetzten Peptidkonzentrationen wurde keine Sättigung erreicht. Die Amplituden des Bindungssignals waren bei 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ (1 mM CaCl_2) etwa zweimal kleiner als bei 1 nM Ca^{2+} . Wenn die Immobilisierungsdichte des Peptides #34a unterhalb eines Schwellenwertes (zwischen 200 und 400 RU) lag, konnte kein Bindungssignal beobachtet werden. Das Bindungsverhalten des Peptides #34a gegenüber dem immobilisierten Peptid #34a war damit qualitativ identisch mit dem Bindungsverhalten gegenüber GCAP-1 ($\rightarrow$ 3.6.2.1). Ein Vergleich der Bindungsisothermen für die Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a und an immobilisiertes GCAP-1, die in repräsentativen Experimenten gemessen wurden, wird in Abbildung 3.17 gezeigt.

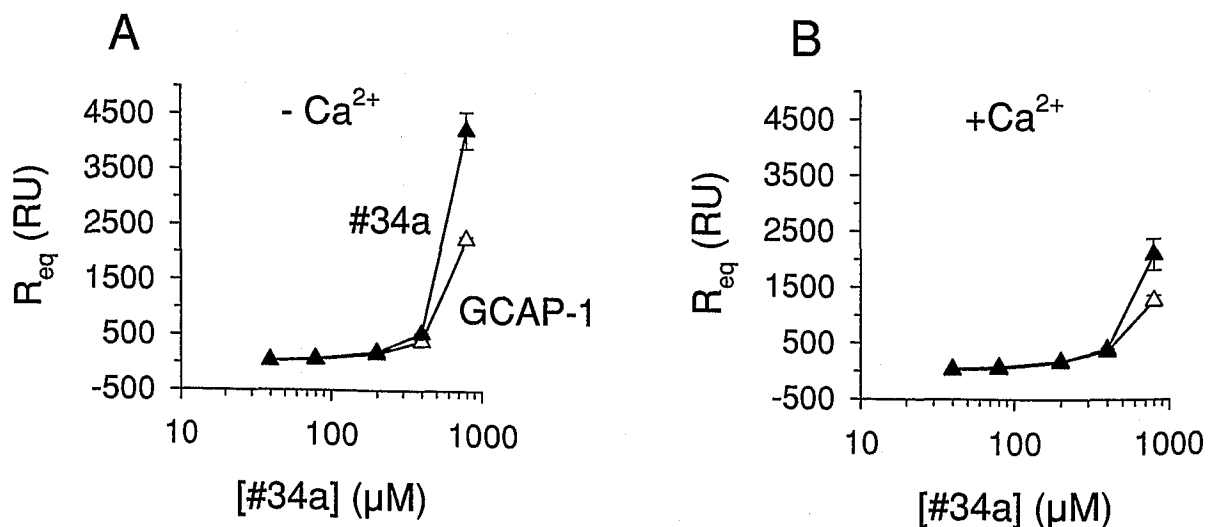


Abbildung 3.17 Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a und an immobilisiertes GCAP-1; A,B: Bindungsisothermen für die Bindung von #34a an 1200 RU immobilisiertes #34a ($\blacktriangle$) bzw. 4300 RU immobilisiertes GCAP-1 ($\triangle$) bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ (A, $-\text{Ca}^{2+}$) bzw. 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ (B, $+\text{Ca}^{2+}$). Die Experimente wurden als zweifache Ansätze durchgeführt; die R_{eq} -Werte wurden aus korrigierten Sensorgrammen ermittelt ($\rightarrow$ 2.10.4); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die gemessenen Bindungsisothermen für die Bindung des Peptides #34a an das immobilisierte Peptid #34a sind qualitativ identisch mit denen für die Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes GCAP-1. Es wurde kein Modell für eine Kurvenanpassung gefunden, um die Bindungsisothermen quantitativ zu beschreiben, so daß das Bindungsverhalten des Peptides

#34a gegenüber dem immobilisierten Peptid #34a bzw. gegenüber GCAP-1 nicht systematisch verglichen werden konnte.

Das Peptid #34a zeigt also unter den Bedingungen der durchgeführten SPR-spektroskopischen Messungen Selbstassoziation. Dieser Vorgang wird durch GCAP-1 begünstigt.

3.6.2.3 Einfluß von GCAP-1 auf die Selbstbindung des Peptides #34a

GCAP-1 band als Analyt nicht an das immobilisierte Peptid #34a. Das Peptid band aber als Analyt an immobilisiertes GCAP-1 (→ 3.6.2.1). Außerdem hatte das Peptid #34a eine Tendenz zur Selbstassoziation (→ 3.6.2.2). Möglicherweise bindet GCAP-1 also nur an Oligomere des Peptides #34a. Als alternative Erklärung dafür, daß GCAP-1 nicht an das immobilisierte Peptid #34a band, kann man annehmen, daß durch die Immobilisierung die Zugänglichkeit oder die Konformation des Peptides so beeinflußt wurde, daß keine Bindung mehr möglich war. Durch die SPR-spektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung des Peptides #34a mit immobilisiertem Peptid #34a in Gegenwart von GCAP-1 sollte man zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden können. Während in dem einen Fall (Bindung von GCAP-1 an Oligomere des Peptides #34a auf der Sensoroberfläche) das Selbstbindungssignal (→ 3.6.2.2) des Peptides #34a durch die zusätzliche Bindung von GCAP-1 verstärkt werden sollte, sollte in dem anderen Fall (keine Bindung von GCAP-1 an immobilisiertes Peptid #34a) das Selbstbindungssignal des Peptides #34a durch die Komplexbildung des Peptides mit GCAP-1 in Lösung unterdrückt werden.

GCAP-1 wurde also zusammen mit dem Peptid #34a als Analyt eingesetzt. Die Bindung an immobilisiertes Peptid #34a wurde SPR-spektroskopisch gemessen. Es wurden Reihenmessungen durchgeführt, bei denen entweder eine feste Konzentration von GCAP-1 mit steigenden Konzentrationen des Peptides #34a oder eine feste Konzentration des Peptides #34a mit steigenden Konzentrationen von GCAP-1 als Analyt eingesetzt wurden. Diese Experimente führten zu dem Ergebnis, daß die Gegenwart von GCAP-1 im Analyten die Bindung des Peptides #34a an das immobilisierte Peptid #34a reduziert. In den Meßreihen, deren Ergebnis in Abbildung 3.18 gezeigt wird, wurde die Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a durch steigende Konzentrationen von GCAP-1 um bis zu 50 % reduziert. Ein ähnliches Ergebnis wurde erhalten, wenn die Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes GCAP-1 bei steigenden Konzentrationen von GCAP-1 im Analyten gemessen wurde (→ Abbildung 3.18 C,D). Diese Experimente wurden mehrmals in ähnlicher Form wiederholt. Die unabhängigen Experimente hatten immer qualitativ gleiche Ergebnisse. Quantitativ schwankten die Ergebnisse aber stark. In einem Experiment wurde z.B die Bindung von 0,6 mM des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a durch 10 µM GCAP um etwa 80 % reduziert (vgl. Abbildung 3.18).

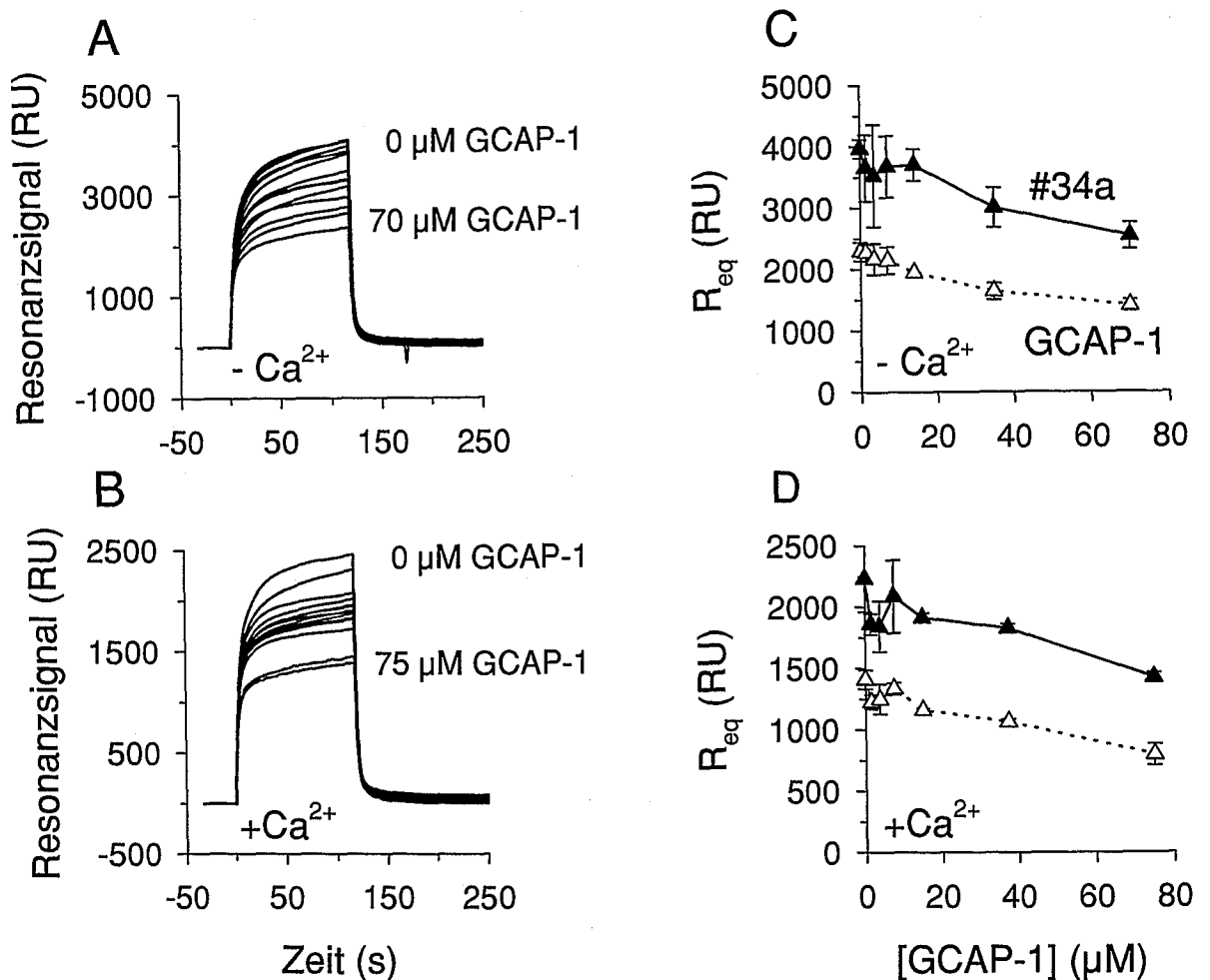


Abbildung 3.18 Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a und an GCAP-1 in Gegenwart von GCAP-1 im Analyten; A,B: Bindung von 0,8 mM #34a an 1200 RU #34a bei 1 nM [Ca²⁺] (-Ca²⁺) in Gegenwart von 0, 1,4, 3,5, 7, 14, 35 und 70 µM GCAP-1 (A), bzw. bei 1 mM [Ca²⁺] (+Ca²⁺) in Gegenwart von 0, 1,5, 3,8, 7,5, 15, 37,5 und 75 µM GCAP-1 (B). Die Experimente wurden als zweifache Ansätze durchgeführt; die Sensorgramme wurden korrigiert (→ 2.10.4). C,D: R_{eq}-Werte für die Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a (▲; R_{eq}-Werte aus A,B) bzw. an 4300 RU immobilisiertes GCAP-1 (△) in Gegenwart steigender Konzentrationen von GCAP-1 im Analyten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Der beobachtete Effekt war spezifisch für GCAP-1. Durch BSA (SIGMA) und Recoverin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T.Fischer, IBI-1, FZ Jülich) wurde die Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a nicht reduziert.

Die Gegenwart von GCAP-1 im Analyten reduzierte spezifisch die beobachtete Bindung des Peptides #34a an immobilisiertes Peptid #34a. GCAP-1 band also wahrscheinlich im Analyten an das gelöste Peptid #34a und verringerte dadurch dessen effektive Konzentration. GCAP-1 induzierte dabei wahrscheinlich die Bildung löslicher Oligomere oder Aggregate des Peptides #34a. Bereits bei einem molaren Verhältnis von GCAP-1 zu Peptid von 1:12 wurde die beobachtete Selbstassoziation des Peptides #34a an der Sensoroberfläche deutlich (etwa

50 %) reduziert (→ Abbildung 3.18). GCAP-1 im Analyten band nicht an das Peptid auf der Sensoroberfläche.

Durch die SPR-spektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung der Peptide #34, #36 und #34a mit GCAP-1 wurde gezeigt, daß diese Peptide eine Tendenz zur Selbstassoziation haben. Möglicherweise hat also die Region der ROS-GC1, die durch diese Peptide abgebildet wird, eine Funktion für die Dimerisierung der ROS-GC1. GCAP-1 induziert die Selbstassoziation der Peptide #34, #36 und #34a. Eine Bindung von GCAP-1 an die monomeren Peptide konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist die Region der ROS-GC1, die durch die Peptide abgebildet wird, im funktionellen Komplex der ROS-GC1 als Dimer Teil der Bindungsstelle für GCAP-1.

3.7 Heterologe Expression und Charakterisierung der ROS-GC1 und ihrer mutierten Formen

Durch die Durchmusterung der Peptidbibliothek (→ 3.3, 3.4) wurden Regionen der ROS-GC1 identifiziert, die wahrscheinlich eine zentrale Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1 haben. Peptide, die zwei dieser Regionen repräsentieren, wurden genauer charakterisiert (→ 3.5, 3.6). Die bisher gezeigten Ergebnisse beziehen sich also auf die Eigenschaften von Peptiden. Aus diesen Eigenschaften der Peptide wurden dann Vorstellungen von der Funktion der Regionen der ROS-GC1 entwickelt, die durch diese Peptide abgebildet werden.

Die Funktion dieser Regionen sollte nun mit einem unabhängigen Ansatz untersucht werden. Dafür wurden in Zusammenarbeit mit Dr. T. Duda und Dr. R.K. Sharma (UMDNJ, Stratford, New Jersey, USA) eine Reihe von mutierten Formen der ROS-GC1 hergestellt. Die Eigenschaften dieser Mutanten wurden dann im Vergleich mit den Eigenschaften der ROS-GC1 (Wildtyp) untersucht.

Für diese Untersuchungen wurden zwei verschiedene Expressionssysteme eingesetzt. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse von Experimenten mit ROS-GC1 (Wildtyp und Mutanten), die in HEK293-Zellen heterolog exprimiert wurde, genauer beschrieben. Ähnliche Experimente zu den gleichen Fragestellungen wurden jeweils parallel von Dr. T. Duda mit ROS-GC1 (Wildtyp und Mutanten), die in COS-Zellen heterolog exprimiert wurde, durchgeführt.

3.7.1 Optimierung der Expressionsbedingungen

Es wurde ein heterologes Expressionssystem etabliert, um die Eigenschaften des ROS-GC1-Wildtyps mit den ROS-GC1-Mutanten vergleichen zu können. Die ROS-GC1 wurde dafür in HEK293-Zellen transient exprimiert (→ 2.7).

Die Transfektion der HEK293-Zellen mit dem Expressionsplasmid allein führte zu einer sehr geringen Expression der ROS-GC1. Wenn die Zellen mit dem Expressionsplasmid für ROS-GC1 und dem Plasmid pRSV-Tag (DHALLAN et al., 1990) kotransfiziert wurden, konnte die Expression der ROS-GC1 in etwa 20 % der Zellen in den Transfektionsansätzen immunocytochemisch nachgewiesen werden. Wenn die Zellen nach der Transfektion mit Natriumbutyrat behandelt wurden, konnte die Expression der ROS-GC1 in 60 – 70 % der Zellen nachgewiesen werden. Durch die Behandlung der Zellen mit Natriumbutyrat wurde die basale GC-Aktivität in den Zellmembranen der transfizierten HEK293-Zellen (→ 3.7.2) etwa 4-fach gegenüber der GC-Aktivität in den Zellmembranen von unbehandelten transfizierten Zellen erhöht.

In HEK293-Zellen, die nicht mit dem Expressionsplasmid transfiziert worden waren (Kontrollzellen), war immunocytochemisch keine Expression der ROS-GC1 nachweisbar. In den Zellmembranen der Kontrollzellen konnte keine GC-Aktivität gemessen werden.

3.7.2 Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1

Nachdem die Bedingungen für die transiente Expression optimiert worden waren, um möglichst große Mengen der ROS-GC1 in HEK293-Zellen zu exprimieren (→ 3.7.1), wurde untersucht, ob die exprimierte ROS-GC1 funktionell aktiv war.

Dafür wurde zuerst die basale Aktivität der ROS-GC1 in den Zellmembranen von transfizierten Zellen bestimmt (→ 2.7.4, 2.9). Die spezifische GC-Aktivität der Zellmembranen in Gegenwart von 100 μM ATP betrug mit MgGTP als Substrat 80 - 90 $\text{pmol min}^{-1} \text{mg(Protein)}^{-1}$ (→ Abbildung 3.19 A). Mit MnGTP als Substrat war die GC-Aktivität der Zellmembranen etwa 4-mal höher (380 $\text{pmol min}^{-1} \text{mg(Protein)}^{-1}$; Abbildung 3.21 A, wt). In den Zellmembranen von untransfizierten Zellen konnte keine GC-Aktivität nachgewiesen werden.

Wenn die heterolog exprimierte ROS-GC1 in den Zellmembranen von HEK293-Zellen mit steigenden Konzentrationen von rekombinantem GCAP-1 rekonstituiert wurde, wurde die GC-Aktivität bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ mit einem EC_{50} -Wert von etwa 6 μM GCAP-1 um das 100-fache gegenüber der Basalaktivität erhöht. Bei 23,5 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ wurde die GC-Aktivität durch GCAP-1 nur um etwa das 3-fache erhöht (→ Abbildung 3.19 A). Damit wurde die Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1, die mit 15 μM GCAP-1 rekonstituiert worden war, durch eine Verminderung der $[\text{Ca}^{2+}]$ von 23,5 μM auf 1 nM um das 30-fache erhöht.

Die ROS-GC1 wurde also in HEK293-Zellen funktionell aktiv exprimiert. Die heterolog exprimierte ROS-GC1 wurde durch GCAP-1 Ca^{2+} -abhängig aktiviert. In dieser Eigenschaft entsprach die heterolog exprimierte ROS-GC1 qualitativ dem nativen Enzym. Die Werte für die maximale Aktivierung durch GCAP-1 und für die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung in Gegenwart von GCAP-1 waren aber verschieden von den Werten für die native ROS-GC1 (vgl. Abbildung 3.3; 7-fache Aktivierung durch GCAP-1 und 7-fache Ca^{2+} -abhängige Aktivierung in Gegenwart von GCAP-1).

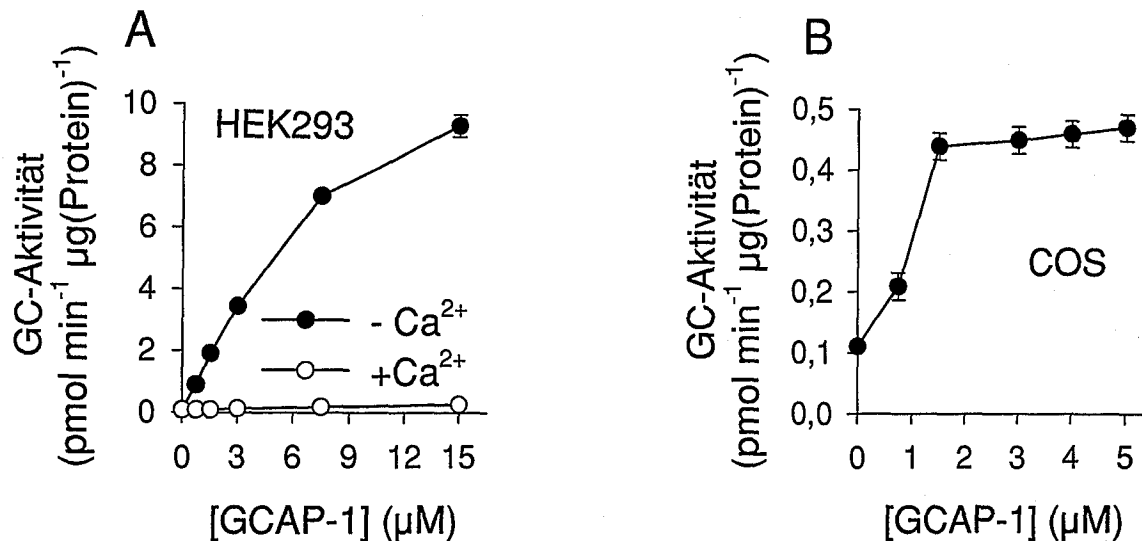


Abbildung 3.19 Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1; A: GC-Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 in HEK293-Zellmembranen, die bei 1 nM [Ca^{2+}] ($-\text{Ca}^{2+}$) bzw. 23,5 μM [Ca^{2+}] ($+\text{Ca}^{2+}$) mit steigenden Konzentrationen von GCAP-1 rekonstituiert wurden; die Daten sind Mittelwerte aus zweifachen Ansätzen $\pm$ Standardabweichung; als Substrat wurde MgGTP eingesetzt; die Reaktionen enthielten 100 μM ATP. B: GC-Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 in COS-Zellmembranen bei 1 nM [Ca^{2+}]; die heterologe Expression und die Messung der GC-Aktivität wurden durchgeführt, wie von DUDA et al. (1999) beschrieben.

In COS-Zellen konnte die ROS-GC1 ebenfalls funktionell exprimiert werden. Die spezifische basale GC-Aktivität in den Zellmembranen der transfizierten COS-Zellen war vergleichbar mit der basalen GC-Aktivität in den Zellmembranen von transfizierten HEK293-Zellen. Durch die Rekonstitution mit GCAP-1 bei 1 nM [Ca^{2+}] wurde die Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 in COS-Zellen aber nur um etwa das 5-fache erhöht. Der EC_{50} Wert für diese Aktivierung war dabei mit etwa 1 μM GCAP-1 deutlich niedriger als der EC_{50} -Wert für die Aktivierung der ROS-GC1 durch GCAP-1 in HEK293-Zellen ($\rightarrow$ Abbildung 3.19 B). Diese quantitativen Unterschiede zwischen den Eigenschaften der ROS-GC1, die in HEK293-Zellen transient exprimiert wurde, und den Eigenschaften der ROS-GC1, die in COS-Zellen transient exprimiert wurde, sind einerseits wahrscheinlich auf unterschiedliche Eigenschaften der beiden Zelltypen, andererseits auf unterschiedliche Reaktionsbedingungen bei der Bestimmung der GC-Aktivität zurückzuführen ($\rightarrow$ 2.9; DUDA et al., 1999).

3.7.3 Charakterisierung der Deletionsmutanten

Nach den Ergebnissen, die durch die Untersuchung der Eigenschaften von Peptiden erhalten wurden (→ 3.3, 3.4, 3.5, 3.6), haben die Regionen der ROS-GC1, die durch die Peptide # 5 und #36 repräsentiert werden, wahrscheinlich eine zentrale Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1. Nun wurden die Eigenschaften von mutierten Formen der ROS-GC1 untersucht, bei denen diese Regionen deletiert worden waren, um zu überprüfen, ob diese Regionen tatsächlich eine Funktion für die Regulation der ROS-GC1 haben. Im einzelnen wurden die Regionen $\text{M}^{501}\text{-L}^{512}$ ($\Delta 1$), $\text{R}^{545}\text{-I}^{578}$ ($\Delta 2$) und $\text{D}^{563}\text{-R}^{574}$ ($\Delta 3$) deletiert. Dabei wird die Region, die in der Mutante $\Delta 1$ deletiert wurde, von dem Peptid # 5 abgebildet. Die Region die in der Mutante $\Delta 3$ deletiert wurde, wird von dem Peptid #36 abgebildet. In der Mutante $\Delta 2$ wurden zusätzlich zu der Region, die von dem Peptid #34a abgebildet wird, N-terminal noch weitere 14 Aminosäuren deletiert (→ Abbildung 3.20).

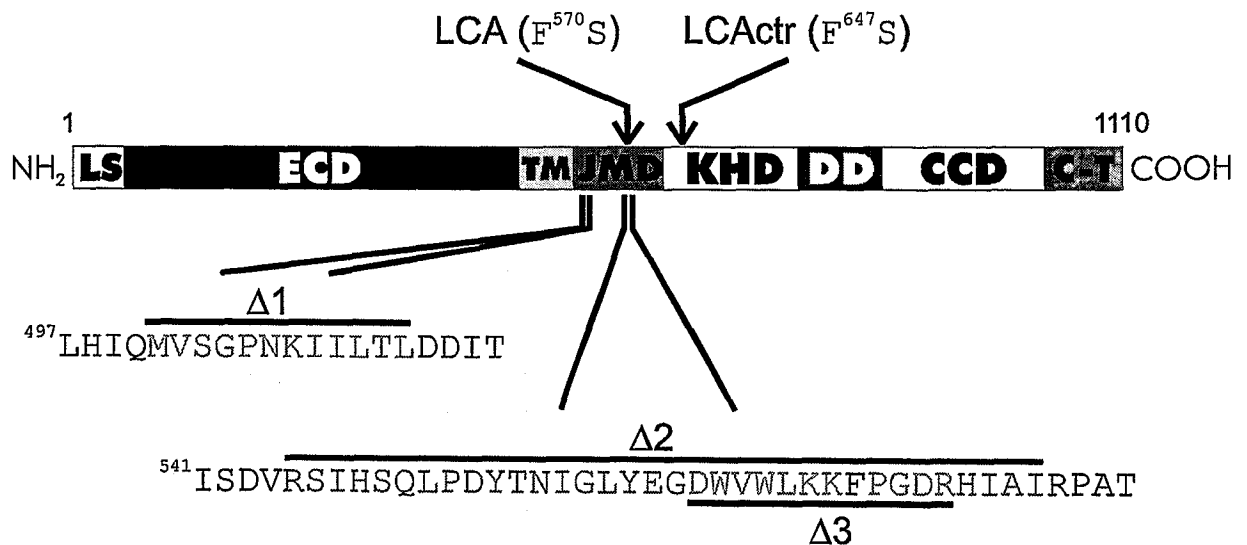


Abbildung 3.20 Schematische Darstellung der ROS-GC1; Lage der Deletionen in den Mutanten $\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 3$, bzw. der Aminosäureaustausche in den Punktmutanten LCA und LCActr. Die Bezeichnungen der einzelnen Domänen werden in Abbildung 1.3 erklärt.

Die ROS-GC1 (Wildtyp) und die drei Deletionsmutanten wurden heterolog exprimiert. Die exprimierte ROS-GC1 (Wildtyp) und die Deletionsmutanten konnten in jeweils vergleichbaren Mengen in den Zellmembranen der transfizierten Zellen immunchemisch nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die basale Aktivität der heterolog exprimierten Enzyme wurde bestimmt. Anschließend wurde untersucht, ob die Deletionsmutanten bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]$ durch GCAP-1 aktiviert werden konnten.

Die basale GC-Aktivität der heterolog exprimierten Deletionsmutanten $\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 3$ war gegenüber der basalen Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 (Wildtyp) erheblich reduziert ($\rightarrow$ Abbildung 3.21 A,C). Die basale GC-Aktivität der Deletionsmutante $\Delta 1$ betrug 26 % (HEK293-Zellmembranen) bzw. 9 % (COS-Zellmembranen) der Aktivität des Wildtyps. Die basale Aktivität der Deletionsmutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$ betrug 3 % und 4 % (HEK-Zellmembranen) bzw. 7 % und 7 % (COS-Zellmembranen) der Aktivität des Wildtyps. Die Deletionsmutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$ konnten durch GCAP-1 nicht aktiviert werden ($\rightarrow$ Abbildung 3.21 B,D). Die heterolog exprimierte Deletionsmutante $\Delta 1$ in HEK293-Zellmembranen wurde bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ durch GCAP-1 aktiviert ($\rightarrow$ Abbildung 3.21 B). Durch die höchste eingesetzte Konzentration von GCAP-1 (15 μ M) wurde die GC-Aktivität der heterolog exprimierten Deletionsmutante $\Delta 1$ gegenüber der basalen GC-Aktivität ohne GCAP-1 um das 18-fache erhöht. Der entsprechende Wert für die ROS-GC1 (Wildtyp) beträgt 100 ($\rightarrow$ 3.7.2). Damit beträgt die spezifische GC-Aktivität der Deletionsmutante $\Delta 1$ in HEK293 Zellmembranen bei der Rekonstitution mit 15 μ M GCAP-1 nur 5 % der spezifischen GC-Aktivität der ROS-GC1 (Wildtyp) in HEK293-Zellmembranen. In COS-Zellmembranen wurde die heterolog exprimierte Deletionsmutante $\Delta 1$ nicht durch GCAP-1 aktiviert ($\rightarrow$ Abbildung 3.21 D).

Die reduzierte Basalaktivität der Deletionsmutanten $\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 3$ und die fehlende Aktivierung durch GCAP-1 hätte möglicherweise dadurch hervorgerufen worden sein können, daß die Deletionen in diesen Mutanten zu einer gestörten Gesamtstruktur der mutierten ROS-GC1 oder zu einem fehlerhaften Einbau in die Membranen der HEK293- bzw. COS-Zellen geführt haben. Der Einfluß des Ca^{2+} -bindenden Proteins S100 β auf die GC-Aktivität der ROS-GC1 (Wildtyp) und der Deletionsmutanten wurde untersucht, um auszuschließen, daß der Effekt der Deletionen auf die GCAP-1-abhängige Aktivierung der ROS-GC1 durch einen solchen unspezifischen Mechanismus hervorgerufen wurde. S100 β aktiviert die ROS-GC1 bei 10 μ M $[Ca^{2+}]$ durch einen Mechanismus, der unabhängig von der Ca^{2+} -abhängigen Regulation durch GCAP-1 ist (MARGULIS et al., 1996; POZDNYAKOV et al., 1997).

Durch steigende Konzentrationen von S100 β wurde sowohl die Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 als auch die Aktivität der Deletionsmutanten in COS-Zellmembranen mit einem EC_{50} -Wert von etwa 1 μ M S100 β um das 6- bis 8-fache erhöht ($\rightarrow$ Abbildung 3.22). Die Struktur der Regionen der ROS-GC1, die eine Funktion für die Regulation durch S100 β haben, war also in den Deletionsmutanten $\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 3$ intakt.

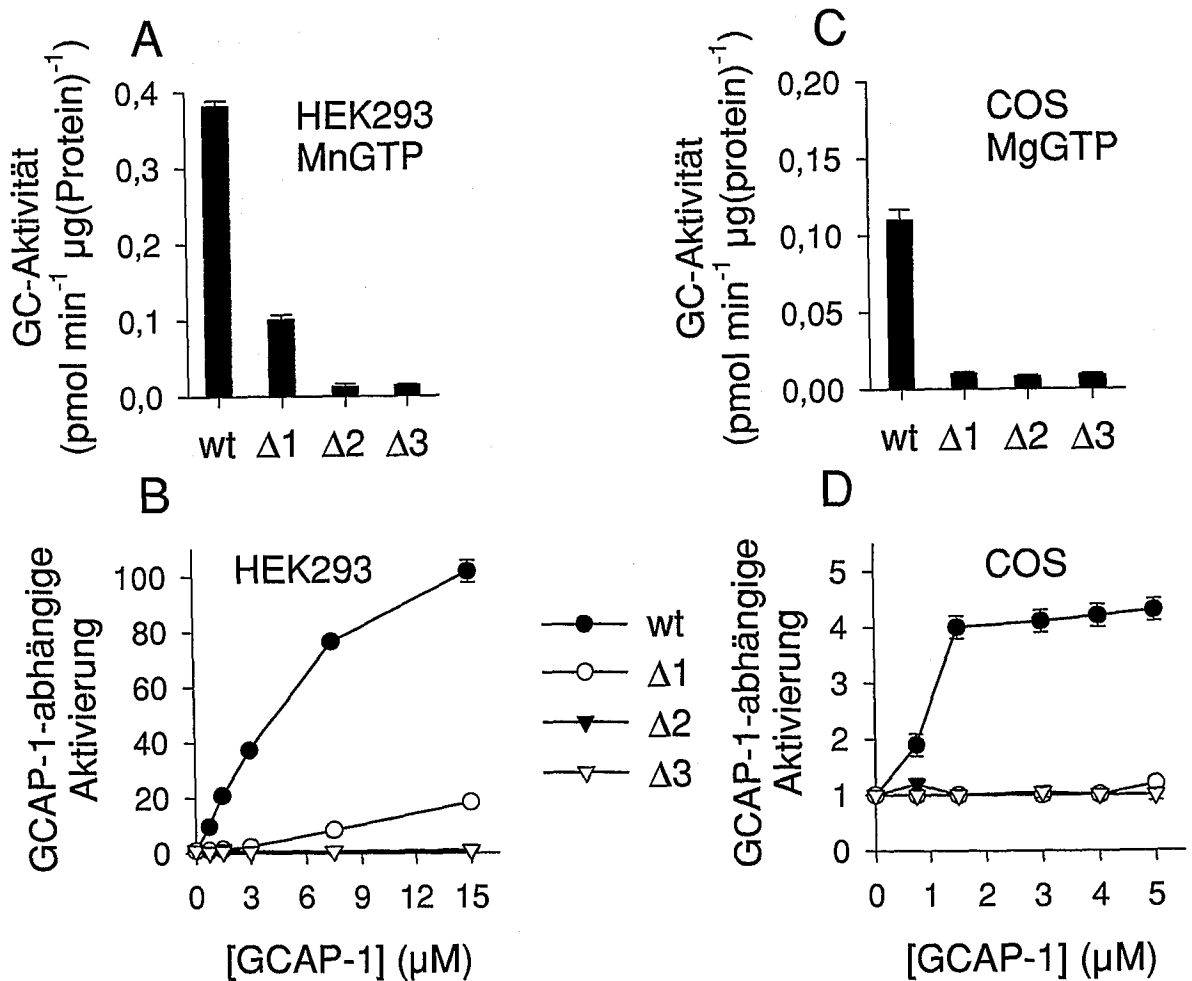


Abbildung 3.21 Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 und der Deletionsmutanten Δ1, Δ2 und Δ3; A: GC-Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 (wt) und der Deletionsmutanten Δ1, Δ2 und Δ3 in HEK293-Zellmembranen; als Substrat wurde MnGTP eingesetzt; die Daten sind Mittelwerte aus dreifachen Ansätzen $\pm$ Standardabweichung. B: Aktivierung der ROS-GC1 und der Deletionsmutanten in HEK293-Zellmembranen bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ durch steigende Konzentrationen von GCAP-1; als Substrat wurde MgGTP eingesetzt; die spezifische GC-Aktivität in den Ansätzen ohne GCAP-1 (Aktivierung 1,0) betrug $(91,8 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$ (wt), $(25 \pm 6) \cdot 10^{-3}$ (Δ1), $(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$ (Δ2) und $(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ pmol min⁻¹ μg(Protein)⁻¹ (Δ3); die Daten sind Mittelwerte aus zweifachen Ansätzen $\pm$ Standardabweichung; Die Reaktionen in A und B enthielten 100 μM ATP. C: GC-Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 (wt) und der Deletionsmutanten Δ1, Δ2 und Δ3 in COS-Zellmembranen. D: Aktivierung der ROS-GC1 und der Deletionsmutanten in COS-Zellmembranen bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ durch steigende Konzentrationen von GCAP-1; die spezifische GC-Aktivität in den Ansätzen ohne GCAP-1 (Aktivierung 1,0) betrug $(110 \pm 7) \cdot 10^{-3}$ (wt), $(10 \pm 1) \cdot 10^{-3}$ (Δ1), $(8 \pm 1) \cdot 10^{-3}$ (Δ2) und $(9 \pm 1) \cdot 10^{-3}$ pmol min⁻¹ μg(Protein)⁻¹ (Δ3). Die heterologe Expression in COS-Zellen und die Messung der GC-Aktivität in C und D wurden durchgeführt, wie von DUDA et al. (1999) beschrieben. Die Daten für die ROS-GC1 (wt) in B und D werden in Abbildung 3.19 als spezifische Aktivitäten gezeigt.

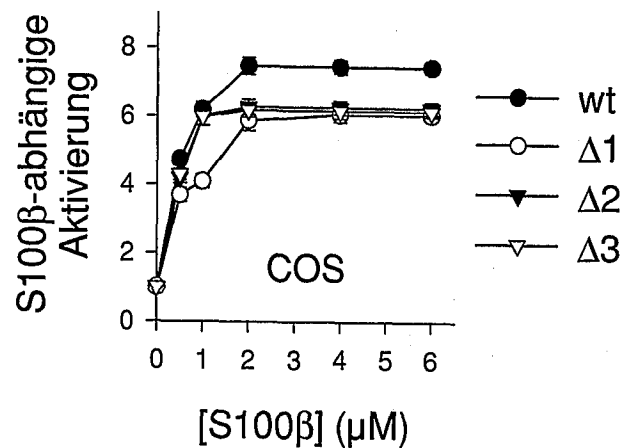


Abbildung 3.22 Aktivität der heterolog exprimierten ROS-GC1 und der Deletionsmutanten $\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 3$ - Aktivierung durch S100 β ; Aktivierung der ROS-GC1 und der Deletionsmutanten in COS-Zellmembranen durch steigende Konzentrationen von S100 β ; die heterologe Expression und die Messung der GC-Aktivität wurden durchgeführt, wie von DUDA et al. (1999) beschrieben.

Die Deletion der Regionen der ROS-GC1, die durch die Peptide # 5 und #36 repräsentiert werden, führte zu einer deutlich reduzierten Basalaktivität der Deletionsmutanten gegenüber der ROS-GC1 (Wildtyp). Die Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-1 wurde durch die Deletionen stark beeinträchtigt bzw. aufgehoben. Diese Ergebnisse bestätigten, daß die Regionen der ROS-GC1, die durch die Peptide # 5 und #36 repräsentiert werden, eine zentrale Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1 haben.

3.7.4 Charakterisierung der Punktmutanten LCA (F^{570}S) und LCActr (F^{647}S)

Ein weiterer, physiologischer Befund zeigt, daß die Region der ROS-GC1, die durch das Peptid #36 repräsentiert wird, eine zentrale Funktion für die Regulation durch GCAP-1 hat. Eine Form der schweren, autosomal rezessiv erblichen Retinopathie, die als Leber'sche kongenitale Amaurose (LCA) bezeichnet wird, ist mit dem Genort der menschlichen ROS-GC1 (GUC2D) verknüpft. Eine der identifizierten verantwortlichen Veränderungen ist eine Punktmutation, die zum Aminosäureaustausch F^{565}S führt (PERRAULT et al., 1996). Die homologe Aminosäure in der ROS-GC1 des Rindes ist F^{570} und liegt in der Region, die durch das Peptid #36 abgebildet wird. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. R.K. Sharma wurden die Konsequenzen dieses Aminosäureaustausches für die Aktivität der ROS-GC1 untersucht.

Dafür wurden die Mutanten LCA ($F^{570}S$) und, als Kontrolle, LCActr ($F^{647}S$) hergestellt (→ Abbildung 3.20) und in COS-Zellen heterolog exprimiert. Der Austausch der einzelnen Aminosäure F^{570} führt zu den gleichen funktionellen Konsequenzen, wie die Deletion der gesamten Region, die durch das Peptid #36 abgebildet wird (→ Abbildung 3.21, $\Delta 2$ und $\Delta 3$). Die Basalaktivität der mutierten Form war drastisch reduziert, die Fähigkeit zur Aktivierung durch GCAP-1 war verloren gegangen und die Aktivierung durch S100 β war nicht beeinträchtigt. Die Kontrollmutante LCActr verhielt sich in allen untersuchten Aspekten wie der Wildtyp der ROS-GC1 (DUDA et al., 1999).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Regionen der ROS-GC1 identifiziert, die eine zentrale Funktion für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1 haben. Dafür wurde eine Peptidbibliothek synthetisiert und durchmustert, die verschiedene Domänen der ROS-GC1 auf überlappende 12-mer Peptide abbildet. Die Eigenschaften der Peptide, die bei den Durchmusterungen identifiziert worden waren, wurden untersucht, und es wurden Deletionsmutanten der ROS-GC1 charakterisiert, bei denen die Regionen deletiert worden waren, die durch die identifizierten Peptide abgebildet werden.

Im folgenden werden zuerst die Probleme des gewählten experimentellen Ansatzes diskutiert (→ 4.1). Anschließend werden die Eigenschaften der identifizierten Peptide und der entsprechenden Deletionsmutanten betrachtet. Daraus werden Hypothesen über die Funktion der entsprechenden Regionen der ROS-GC1 abgeleitet (→ 4.2). Schließlich werden diese Hypothesen zusammen mit Daten aus der Literatur in einem Modell für die Regulation der ROS-GC1 integriert (→ 4.3).

4.1 Probleme des experimentellen Ansatzes

Das Ziel dieser Arbeit war es, in einem großen Protein (ROS-GC1) Regionen mit spezifischen Funktionen (für die Regulation durch GCAP-1) zu identifizieren, d.h. in einer langen Aminosäuresequenz kurze funktionelle Motive zu finden. Da ein neuartiger regulatorischer Mechanismus untersucht wurde, war die vorher verfügbare Information über die Lage dieser Regionen sehr begrenzt. Dabei war die Untersuchung nicht auf einen einzelnen funktionellen Aspekt, d.h. die Identifizierung GCAP-1-bindender Regionen, beschränkt, sondern es sollten, wenn möglich, Informationen über verschiedene Aspekte des regulatorischen Mechanismus gewonnen werden.

Es gibt verschiedene experimentelle Möglichkeiten für die Lösung dieser Aufgabe:

- Bei einem „klassischen“ molekularbiologischen Ansatz werden identifizierbare Domänen oder willkürlich festgelegte Regionen des untersuchten Proteins deletiert oder durch die entsprechenden Domänen oder Regionen eines verwandten Proteins ersetzt, dem die untersuchte Funktion fehlt. Die erhaltenen Deletions- bzw. Hybridmutanten werden dann heterolog exprimiert und funktionell charakterisiert. Mit diesem Ansatz war z.B. die kritische Funktion der JMD/KHD der ROS-GC1 für die Ca^{2+} -abhängige Regulation durch GCAP-1 belegt worden (DUDA et al., 1996a; LAURA und HURLEY, 1998). Wenn in einem großen Protein kleine unbekannte Regionen gesucht werden, ist es mit diesem Ansatz notwendig, entweder in mehreren Schritten die gesuchten Regionen immer weiter einzugrenzen, oder

in einem Schritt eine große Anzahl von Mutanten herzustellen und zu untersuchen. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, daß dadurch das intakte Protein mit spezifischen Funktionsstörungen erhalten werden kann. Andererseits muß bei der heterologen Expression von Mutanten sichergestellt werden, daß durch die eingefügten Mutationen keine unspezifischen Effekte wie z.B. eine unspezifisch gestörte Tertiärstruktur der Mutanten oder eine fehlerhafte subzelluläre Lokalisation hervorgerufen werden. Dafür sind zusätzliche funktionelle Kontrollen notwendig. Der notwendige Arbeitsaufwand für den „klassischen“ molekularbiologischen Ansatz steigt proportional mit der gewünschten Genauigkeit für die Lokalisierung einer gesuchten Region.

- Die Durchmusterung biosynthetischer Peptidbibliotheken hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung für die Identifizierung von Bindungspartnern in biologischen Systemen gewonnen (zur Übersicht s. z.B. SHUSTA et al., 1999). Die bekanntesten Systeme für die effiziente Durchmusterung großer Mengen biosynthetischer Peptide sind die „phage-display“-Methode (zur Übersicht s. z.B. CORTESE et al., 1996; KOIVUNEN et al., 1999; RODI und MAKOWSKI, 1999) und das „yeast-two-hybrid“-System (zur Übersicht s. z.B. DREES, 1999; VIDAL und LEGRAIN, 1999). Mit der „phage-display“-Methode können sehr große Bibliotheken (10^9 - 10^{15}) zufällig generierter Peptide durchmustert werden, die jeweils den n-dimensionalen Sequenzraum n-merer Peptide (das heißt z.B. alle 20^9 möglichen 9-meren Peptide) teilweise oder vollständig abbilden. Diese Peptide werden als Teile der Hülle von Bakteriophagen exprimiert und auf die Bindung an vorgegebene Zielmoleküle durchmustert. Der Vorteil dieser Methode ist, daß der gesamte Sequenzraum durchmustert wird und damit in einem Ansatz im Prinzip die vollständige Information über die Bindungssignaturen für das untersuchte Zielmolekül gewonnen werden kann (es könnte also z.B. die Menge aller 9-meren Peptide gefunden werden, die an GCAP-1 binden). Zu den Nachteilen dieser Methode gehört im allgemeinen ein schlechtes Signal-Rauschverhältnis. Der einzige funktionelle Aspekt, der bis jetzt mit dieser Methode untersucht werden kann, ist die Bindung an das vorgegebene Zielmolekül. Mit dem „yeast-two-hybrid“-System können unter anderem alle Proteine, die in organspezifischen cDNA-Bibliotheken kodiert werden, oder große Serien von mutierten Proteindomänen auf die Bindung an ein Zielmolekül durchmustert werden. Gegenüber der „klassischen“ funktionellen Untersuchung von Mutanten (s.o.) zeichnet sich die Durchmusterung mit dem „yeast-two-hybrid“-System durch eine sehr viel höhere Durchmusterungseffizienz und eine sehr viel höhere Anfälligkeit für experimentelle Artefakte aus.
- In den letzten Jahren sind verbesserte Methoden der chemischen Peptidsynthese verfügbar geworden, die die parallele Synthese einer großen Anzahl von Peptiden erlauben (zur Übersicht s. z.B. FOX, 1995; LEBL und KRCHNÁK, 1997). Damit ist es z.B. möglich, große kombinatorische Peptidbibliotheken herzustellen, oder die Sequenz eines Proteins vollständig auf eine Peptidbibliothek abzubilden. Im allgemeinen besteht dabei ein inverser

Zusammenhang zwischen der Anzahl synthetisierter Peptide und der synthetisierten Menge der einzelnen Peptide. Je nach der verwendeten Methode bleiben die Peptide entweder an die Festphase gekoppelt, die zur Synthese verwendet wurde, oder sie werden am Ende der Synthese von der Festphase abgespalten und in Substanz isoliert. Die synthetisierten Peptide können dann auf die Bindung bestimmter Zielmoleküle oder auf ihre biologische Aktivität (z.B. den Einfluß auf die Aktivität eines bestimmten Enzyms) durchmustert werden.

Für die Identifizierung regulatorischer Sequenzen der ROS-GC1 in dieser Arbeit wurde eine Kombination aus dem „klassischen“ molekularbiologischen Ansatz und der Durchmusterung einer chemisch synthetisierten Peptidbibliothek eingesetzt. Mit Hilfe verfügbarer Informationen über die Regulation durch GCAP-1 wurden Domänen der ROS-GC1 ausgewählt, die wahrscheinlich die gesuchten regulatorischen Regionen enthielten (→ 1.4.1). Diese Domänen wurden dann in einem engen Raster auf eine Bibliothek chemisch synthetisierter Peptide abgebildet, die in zwei verschiedenen Ansätzen durchmustert wurden (→ 3.3, 3.4). Dafür wurde eine begrenzte Anzahl (92) von Peptiden in einer Menge von jeweils mehreren μmol (mehreren mg) hergestellt, um ausreichend Material für die durchgeführten biochemischen Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Mit der Information, die durch die Untersuchung der Peptide gewonnen wurde, wurden schließlich Mutanten der ROS-GC1 hergestellt und charakterisiert (→ 3.7). Die Synthese und die Durchmusterung der Peptidbibliothek waren dabei die zentralen Elemente der experimentellen Strategie. Bei diesem Ansatz treten eine Reihe systematischer und experimenteller Probleme auf.

- Die Beschränkung auf bestimmte Domänen der ROS-GC1, die auf die Peptidbibliothek abgebildet wurden, birgt das Risiko, daß wichtige regulatorische Regionen nicht gefunden werden können, die, entgegen den Erwartungen, Teile anderer Domänen der ROS-GC1 sind.
- Die meisten der hergestellten 12-meren Peptide bilden wahrscheinlich keine ausgeprägte Sekundärstruktur aus. Ihre apparente Affinität für ihre Zielregionen ist damit möglicherweise erheblich niedriger, als die Affinität der abgebildeten Regionen in der ROS-GC1, bei denen die Sekundärstruktur durch die Proteinumgebung fixiert ist.
- Möglicherweise vorhandene diskontinuierliche Wechselwirkungsstellen können durch die Untersuchung von Peptiden, die die Primärstruktur eines Proteins (der ROS-GC1) linear abbilden, nur sehr schlecht oder gar nicht gefunden werden.
- Bei der parallelen Synthese vieler Peptide ist es nicht möglich, die Reaktionsbedingungen für jedes einzelne Peptid zu optimieren, so daß die Ausbeute und Reinheit zwischen den einzelnen Peptiden erheblich schwanken kann (→ Anhang E). Dadurch können bei der Durchmusterung der Peptidbibliothek funktionell wichtige abgebildete Regionen überse-

hen werden. Die Abbildung der ausgewählten Domänen der ROS-GC1 auf die Peptidbibliothek erfolgte mit einem engen Raster und mit einem großen Überlappungsbereich zwischen aufeinanderfolgenden Peptiden (12-mere Peptide, die jeweils um 2 AS versetzt waren; → Anhang D.1), um dieses Risiko zu minimieren. Andererseits können durch Nebenbestandteile der synthetisierten Rohpeptide falsch-positive Signale erzeugt werden. Tatsächlich wurde in dieser Arbeit für das Rohpeptid #63 ein Einfluß auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ganzen ROS festgestellt, der für das gereinigte Peptid #63 nicht reproduziert werden konnte (→ 3.3, 3.5). Das Rohpeptid #63 war bei der Synthese der Peptidbibliothek als heterogenes Gemisch mehrerer Komponenten angefallen (→ Anhang E).

Bei jedem Ansatz, mit dem lange Aminosäuresequenzen nach unbekannten funktionellen Motiven durchsucht werden, treten ähnliche systematische Probleme und jeweils methodenspezifische experimentelle Probleme auf. Der Ansatz, der für diese Arbeit gewählt wurde, stellt einen Kompromiß dar, der es erlauben sollte, mit vernünftigem experimentellen Aufwand regulatorische Regionen in gezielt ausgewählten Domänen der ROS-GC1 zu identifizieren. Durch den Einsatz von verschiedenen, sich ergänzenden Methoden wurden gleichzeitig verschiedene Eigenschaften interessanter Regionen der ROS-GC1 untersucht. Dadurch wurden sich ergänzende Ergebnisse gewonnen, die zusammen betrachtet eine konsistente Vorstellung von der Funktion der identifizierten regulatorischen Regionen liefern sollten.

4.2 Die identifizierten Regionen der ROS-GC1

4.2.1 Die Eigenschaften der identifizierten Peptide

Durch die Durchmusterungen der Peptidbibliothek (→ 3.3, → 3.4) wurden die Peptide # 1 - # 3, # 5, # 7, #35, #36, #63, #66 und #82 identifiziert. Diese Peptide bilden zusammen vier Regionen der ROS-GC1 ab. Die Peptide # 5, #36, #63 und #82 waren diejenigen Peptide aus den vier Regionen, die in den Durchmusterungsansätzen jeweils die deutlichsten Effekte hervorriefen. Der Effekt, der durch das Peptid #63 aus der Peptidbibliothek hervorgerufen wurde, konnte mit dem gereinigten Peptid #63 nicht reproduziert werden (→ 3.5, 4.1). Daher werden im folgenden nur die Ergebnisse diskutiert, die mit den Peptiden # 5, #36 und #82 und mit den verlängerten Versionen von # 5 (#3a) und #36 (#34a) erhalten wurden.

4.2.1.1 Die Peptide # 5 und # 3a

Das Peptid # 5 bildet eine Region aus der JMD der ROS-GC1 ab ($M^{501} - L^{512}$; → Abbildung 4.2 A). Dieses Peptid band bei der Durchmusterung nicht an GCAP-1 (→ 3.4), hatte aber einen erheblichen Einfluß auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ROS (→ 3.3, 3.5.1). Die basale GC-Aktivität in ROS wurde durch das Peptid kaum beeinflusst (→ 3.5.2). Daraus läßt sich schließen, daß das Peptid eine intra- oder intermolekulare Wechselwirkung im funktionellen Komplex der ROS-GC stört, die für den Übergang dieses Komplexes in den aktivierten Zustand notwendig ist. Alternativ lassen sich die erwähnten Ergebnisse dadurch erklären, daß eine Störung des funktionellen Komplexes der ROS-GC durch das Peptid # 5 bevorzugt im aktivierten Zustand erfolgt, weil seine Bindungsstelle dann sterisch besser zugänglich ist. Die Vorstellung, daß die Bindungsstelle des Peptides # 5 tatsächlich nur begrenzt zugänglich ist, wird auch dadurch unterstützt, daß die verlängerte Version des Peptides # 5, # 3a ($L^{497} - T^{516}$), ein ineffektiver Inhibitor der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der GC in ROS ist (→ 3.5.1). Die zusätzlichen Aminosäuren behindern wahrscheinlich den Angriff des Peptides auf den funktionellen Komplex der ROS-GC. Durch die Erhöhung der Konzentration von GCAP-1 kann der Einfluß des Peptides # 5 auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ROS aufgehoben werden (→ 3.5.3). Dieser Effekt von zusätzlichem GCAP-1 beruht wahrscheinlich nicht auf einer direkten Bindung des Peptides, da ein erheblicher molarer Unterschub von GCAP-1 ausreichend war, um den Einfluß des Peptides # 5 aufzuheben. Bei der Durchmusterung auf Bindung an GCAP-1 (→ 3.4) erzeugte das Peptid # 5 kein Bindungssignal.

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens von ROS-Proteinen gegenüber dem Peptid # 3a (Peptidaffinitäts-Chromatographie, → 3.6.1) ergab ebenfalls keinen Anhaltspunkt für eine direkte Bindung von GCAP-1. Ein Komplex aus ROS-GC1 und Tubulin, an dem wahrscheinlich noch andere Proteine beteiligt waren, band aber spezifisch an das Peptid # 3a. Das Tubulin aus einem Extrakt löslicher ROS-Proteine (ohne ROS-GC) band ebenfalls an das Peptid # 3a. Es war bereits früher gezeigt worden, daß wahrscheinlich ein Komplex der ROS-GC mit zytoskeletalen Proteinen existiert (→ 1.3; HALLETT et al., 1996; SCHREM et al., 1999). Die sterische Hinderung, die möglicherweise das Peptid # 3a zu einem ineffektiven Inhibitor der aktivierten ROS-GC macht (s.o.), ist unter den Bedingungen der Affinitätschromatographie wahrscheinlich aufgehoben, so daß das Peptid # 3a an seine Zielregion binden kann. Die Peptidaffinitäts-Chromatographie wurde mit solubilisierten ROS durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wird die Struktur des nativen funktionellen Komplexes der ROS-GC, an dem neben GCAP wahrscheinlich auch zytoskeletale Proteine beteiligt sind (→ 1.3), erheblich gestört. Das läßt sich unter anderem daraus schließen, daß eine Rekonstitution der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung durch GCAP für solubilierte ROS-GC bis jetzt noch nicht gelungen

ist (s. z.B. KOCH, 1991). Damit ergibt sich die folgende Vorstellung von der Funktion der Region der ROS-GC1, die durch die Peptide # 5 und # 3a repräsentiert wird:

Die Region ist im funktionellen Komplex der ROS-GC an einer Wechselwirkung innerhalb des ROS-GC1-Dimers oder mit einem anderen Protein des Komplexes (wahrscheinlich Tubulin) beteiligt. Diese Wechselwirkung hat eine zentrale Funktion für den Übergang zwischen dem basalen und dem GCAP-1-aktivierten Zustand der ROS-GC.

4.2.1.2 Die Peptide #36 und #34a

Das Peptid #36 bildet eine zweite Region aus der JMD der ROS-GC1 ab ($D^{563} - R^{574}$; → Abbildung 4.2 B). Dieses Peptid band bei der Durchmusterung an GCAP-1 (→ 3.4). Das Bindungssignal wurde unabhängig von der $[Ca^{2+}]$ erzeugt und war deutlich größer, als es für eine 1:1-Bindung an GCAP-1 zu erwarten war. Das Peptid #36 inhibierte außerdem die GC-Aktivität in ROS sowohl bei voller Aktivierung durch GCAP (1 nM $[Ca^{2+}]$) als auch im basalen Zustand mit Ca^{2+} -gesättigtem GCAP (23,5 μM $[Ca^{2+}]$). Der Einfluß des Peptides auf die GC-Aktivität in ROS war dabei bei 23,5 μM $[Ca^{2+}]$ stärker als bei 1 nM $[Ca^{2+}]$ (→ 3.3, 3.5.1). Die Basalaktivität der ROS-GC in Abwesenheit von GCAP wurde durch das Peptid ebenfalls effektiv inhibiert (→ 3.5.2). Die verlängerte Version des Peptides #36, #34a ($L^{559} - I^{578}$), ist ebenfalls ein Inhibitor der GC-Aktivität in ROS und ist dabei effizienter als das Peptid #36 (→ 3.5.1, 3.5.2).

Die Peptide #36 und #34a disruptieren wahrscheinlich den funktionellen Komplex der ROS-GC unabhängig von dessen Aktivierungszustand. Der aktivierte Komplex ist dabei etwas unempfindlicher gegen den Angriff der Peptide.

Durch die Erhöhung der Konzentration von GCAP-1 kann der Einfluß des Peptides #36 auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der GC in ROS aufgehoben werden (→ 3.5.3). Damit ergibt sich ein scheinbarer Widerspruch zwischen den erhaltenen Ergebnissen. Einerseits greift das Peptid #36 die ROS-GC unabhängig von der Wechselwirkung mit GCAP-1 an (→ 3.5.2), andererseits schützt zusätzliches GCAP-1 die ROS-GC gegen den Angriff des Peptides. Ein erheblicher Unterschub von GCAP-1 war ausreichend, um den Einfluß des Peptides #36 aufzuheben (→ 3.5.3).

Eine mögliche Erklärung wäre, daß eine gleichzeitige Bindung von GCAP-1 und des Peptides #36 im funktionellen Komplex der ROS-GC nicht möglich ist, so daß eine erhöhte Konzentration von GCAP-1 das Peptid verdrängt. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit ist, daß GCAP-1 die Bildung von löslichen Aggregaten des Peptides #36 induziert. Dadurch würde die effektive Konzentration des Peptides verringert, so daß sein Einfluß auf die GC-Aktivität in ROS reduziert wird. Diese Interpretation wird dadurch unterstützt, daß bei SPR-spektroskopischen Experimenten eine überstöchiometrische Bindung des Peptides #36 an immobilisiertes GCAP-1 beobachtet wurde (→ 3.4, 3.6.2.1). Das Peptid #34a zeigte ebenfalls eine

überstöchiometrische Bindung an GCAP-1 ($\rightarrow$ 3.6.2.1). Das Ergebnis eines SPR-spektroskopischen Experimentes zum Einfluß von GCAP-1 auf die Selbstassoziation des Peptides #34a ($\rightarrow$ 3.6.2.2) legte ebenfalls die Interpretation nahe, daß GCAP-1 die Bildung von löslichen Aggregaten dieses Peptides induziert ($\rightarrow$ 3.6.2.3). Weder in SPR-spektroskopischen Experimenten noch bei der Peptidaffinitäts-Chromatographie ($\rightarrow$ 3.6.1) band GCAP-1 an immobilisierte Monomere der Peptide #36 und #34a.

Die Tendenz der Peptide #36 und #34a zur Selbstassoziation macht es schwierig, aus den Eigenschaften dieser Peptide Schlußfolgerungen über die repräsentierte Region der ROS-GC1 abzuleiten. Das folgende spekulative Modell kann aber zur vorläufigen Einordnung der experimentellen Ergebnisse dienen:

Die Region, die durch die Peptide #36 und #34a repräsentiert wird, hat durch ihre Selbstbindung eine Funktion für die Dimerisierung der ROS-GC1. Die dimerisierte Region bildet möglicherweise einen Teil einer diskontinuierlichen Bindungsstelle für GCAP-1. Eine Disruption dieser Dimerisierungsregion durch die Peptide #36 und #34a dissoziiert das GC-Dimer zumindest partiell und macht es dadurch inaktiv.

4.2.1.3 Das Peptid #82

Das Peptid #82 bildet eine Region aus dem C-T der ROS-GC1 ab ($Q^{1078} - H^{1089}$; $\rightarrow$ Abbildung 4.2 C). Dieses Peptid band bei der Durchmusterung Ca^{2+} -abhängig an GCAP-1. Nur in Abwesenheit von Ca^{2+} (1 nM $[Ca^{2+}]$) wurde ein Bindungssignal beobachtet ($\rightarrow$ 3.4). Die GC-Aktivität in ROS wurde durch das Peptid #82 aber unabhängig von der $[Ca^{2+}]$ inhibiert ($\rightarrow$ 3.5.1). Diese Ergebnisse sind inkonsistent und erlauben keine Aussage über die Funktion der abgebildeten Region der ROS-GC1 für die Regulation durch GCAP-1. Die Region ist zwischen der ROS-GC1 und der ROS-GC2 nicht sehr gut konserviert ($\rightarrow$ 4.2.3) und hat deswegen möglicherweise eine Funktion für Subtyp-spezifische Unterschiede bei der Regulation der ROS-GC1 bzw. -GC2.

4.2.2 Die Eigenschaften der untersuchten mutierten Formen der ROS-GC1

Bei der Mutante $\Delta 1$ war die Region der ROS-GC1 deletiert worden, die durch das Peptid # 5 abgebildet wird ($M^{501} - L^{512}$). Bei den Mutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$ war die Region, die durch das Peptid #36 abgebildet wird ($\Delta 3$, $D^{563} - R^{574}$) bzw. eine erweiterte Region ($\Delta 2$, $R^{545} - I^{578}$) der ROS-GC1 deletiert worden. Die funktionellen Konsequenzen dieser Deletionen waren überraschend dramatisch. Die basale GC-Aktivität der Mutante $\Delta 1$ war je nach dem verwendeten Expressionssystem gegenüber dem Wildtyp der ROS-GC1 um 75 % bis 90 % reduziert, die basale Aktivität der Mutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$ um 90 % oder mehr ($\rightarrow$ 3.7.3). Im Gegensatz dazu

hat eine Mutante, bei der die gesamte JMD und KHD der ROS-GC1 deletiert wurden, etwa die gleiche basale GC-Aktivität wie der Wildtyp (K; DUDA et al., 1996a; KRISHNAN et al., 1997). Durch die Deletion der kurzen Regionen, die durch die Peptide # 5 bzw. #36 abgebildet werden, wird die Struktur des funktionellen Komplexes der ROS-GC1 also so gestört, daß seine Aktivität drastisch reduziert wird. Dieser Effekt wird wahrscheinlich nicht durch einen unspezifischen „Zusammenbruch“ der Tertiärstruktur der JMD hervorgerufen, da der einzelne Aminosäureaustausch F⁵⁷⁰S in der Region, die durch das Peptid #36 abgebildet wird (Mutante LCA; → 3.7.4) den gleichen Einfluß hat, wie die Deletion der ganzen Region.

Möglicherweise hat die JMD in der ROS-GC1 die Funktion einer regulatorischen Domäne, die flexibel auf allosterische Einflüsse wie die Bindung von ATP oder die Wechselwirkung mit GCAP-1 reagiert. Durch die untersuchten Mutationen wird die JMD dann möglicherweise in eine Konformation gezwungen, durch die die katalytische Aktivität der CCD fast vollständig inhibiert wird. Die sterische Fixierung dieser Konformation wäre dann bei der Mutante $\Delta 1$ weniger starr als bei den Mutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$. Dadurch könnte erklärt werden, daß die Mutante $\Delta 1$ eine etwas höhere basale GC-Aktivität hat und daß sie, im Gegensatz zu den Mutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$, noch eingeschränkt durch GCAP-1 aktiviert werden kann (→ 3.7.3).

Dieses Ergebnis für die Mutante $\Delta 1$ zeigt auch, daß die Region, die durch das Peptid # 5 abgebildet wird, wahrscheinlich nicht direkt an der Bindung von GCAP-1 beteiligt ist, was mit den Ergebnissen der Untersuchung dieses Peptides übereinstimmt (→ 4.2.1.1). Für die Region des Peptides #36 kann aus den Eigenschaften der Deletionsmutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$ aber keine Aussage über eine Beteiligung an der Bindung von GCAP-1 abgeleitet werden.

4.2.3 Die Primärstrukturen der identifizierten Regionen

Die Aminosäuresequenzen der Regionen der ROS-GC1, die von den Peptiden # 5, #36 und #82 abgebildet werden, sind zwischen den verschiedenen Säugetieren hochkonserviert (→ Abbildung 4.2). Das gilt allerdings auch für das gesamte Protein (z.B. sind die Aminosäurereste der ROS-GC1 aus dem Rind und aus dem Menschen zu 88 % identisch und zu 93 % konserviert). Interessanter ist der Vergleich der Primärstrukturen dieser Regionen mit den homologen Regionen der ROS-GC2. Die Aminosäurereste in der Sequenz der JMD aus der ROS-GC2 des Rindes sind im Vergleich zur ROS-GC1 nur zu 45 % identisch und zu 59 % konserviert. Die Regionen, die von den Peptiden # 5 und #36 abgebildet werden, sind dagegen sehr viel besser konserviert (→ Abbildung 4.2 A,B). Diese Tatsache wird besonders deutlich, wenn man die Primärstrukturen der JMD der ROS-GC1 und der ROS-GC2 bildhaft in einem Dotplot vergleicht (→ Abbildung 4.1 A). Auffällig ist, daß diese beiden Regionen auch in der GC-D des Riechepithels konserviert sind (→ Abbildung 4.1 B und 4.2 A,B). Aus der Netzhaut des Knochenfisches *oryzias latipes* sind kürzlich drei photorezeptorspezifische

neuronale partikuläre GC kloniert worden (GCR1, GCR2 und GCC; HISATOMI et al., 1999), die homolog zu den ROS-GC-Isoformen der Säugetiere sind. Wenn man die Sequenzen dieser drei GC mit der der ROS-GC1 vergleicht (für die GCR1 s. Abbildung 4.2), stellt man ebenfalls fest, daß in der JMD die Regionen am besten konserviert sind, die von den Peptiden # 5 und #36 abgebildet werden. Die Erhaltung dieser beiden Regionen während der getrennten Evolution der neuronalen partikulären GC spricht dafür, daß diese Regionen wichtige Funktionen haben, die den Mitgliedern dieser Subfamilie der partikulären GC gemeinsam sind. In den anderen beiden Unterfamilien der partikulären GC (Peptidrezeptoren) ist die Sequenz dieser Regionen nicht konserviert (→ Abbildung 4.2 A,B; vgl. Abbildung 1.5). Die Region, die durch das Peptid #82 abgebildet wird, ist zwischen den verschiedenen neuronalen partikulären GC schlechter konserviert als die N- und C-terminal flankierenden Regionen (→ Abbildung 4.2 C). Das bedeutet, daß diese Region wahrscheinlich eher für einen funktionellen Unterschied zwischen der ROS-GC1 und der ROS-GC2, wie z.B. ihre unterschiedliche Lokalisation (→ 1.2.3.2), verantwortlich ist als für eine gemeinsame Eigenschaft wie die Regulation durch die Isoformen von GCAP (→ 1.3).

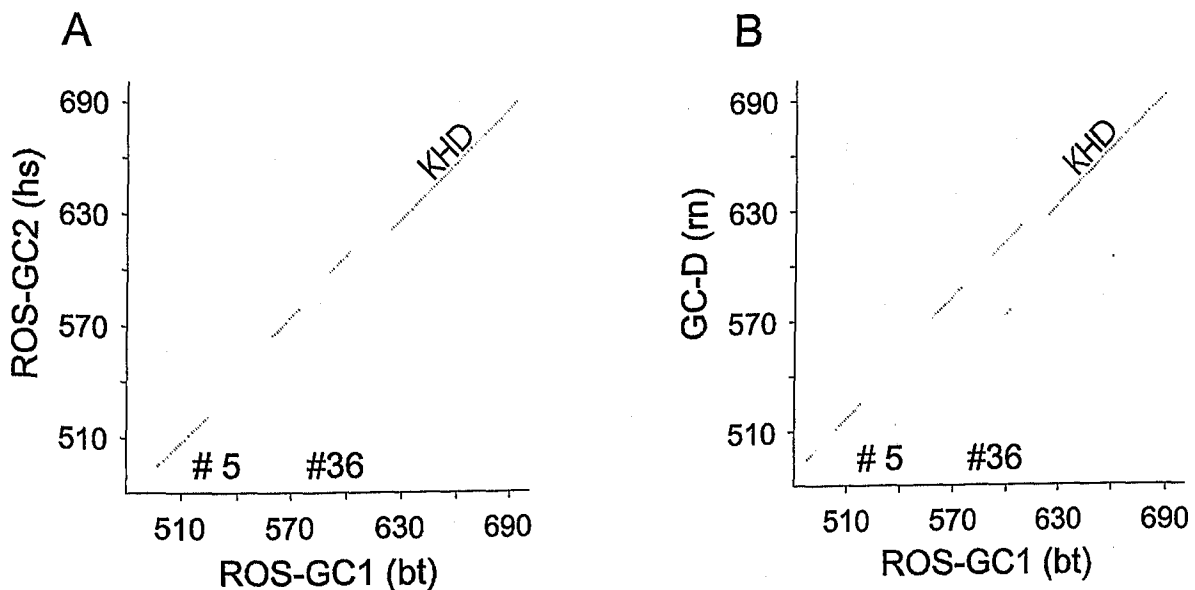


Abbildung 4.1 Primärstrukturvergleich der ROS-GC1 (AS 480 - 700) mit den neuronalen partikulären Guanylatzyklasen ROS-GC2 (A) und GC-D (B) - Dotplot; Ergebnisse des paarweisen Primärstrukturvergleichs mit dem Programm PDOTPLOT, Version 3.13 (Dr. W. Bönigk, IBI-1, FZ Jülich); folgende Parameter wurden eingesetzt: Vergleichsmatrix MDM-78 (SCHWARTZ und DAYHOFF, 1978), Fenster 12 AS, cutoff score 300. Schwarze Linien, die parallel zur Diagonalen eines Schaubildes verlaufen, zeigen eine signifikante Homologie zwischen Regionen der verglichenen Proteine; die gepunkteten Linien zeigen die Projektionen der Regionen der ROS-GC1, die von den Peptiden # 5 bzw. #36 abgebildet werden. bt: *bos taurus*, hs: *homo sapiens*, rn: *rattus norvegicus*, KHD: Tyrosinkinase-Homologiedomäne.

A

		# 5	
ROS-GC1(bt)	⁴⁹³ RHRLHMQMVSGPNKIILTLDDITFLHP		
ROS-GC1(hs)	⁴⁸⁸ RHRLHMQMVSGPNKIILTVDDITFLHP	92 % (100 %)	
ROS-GC1(rn)	⁴⁹¹ RHRLHMQMVSGPNKIILTLEDVTFLLHP	100 % (100 %)	
ROS-GC2(bt)	⁴⁹¹ RHRINKIQLIKGPNRIILTLEDVTFINP	58 % (92 %)	
ROS-GC2(hs)	⁴⁹¹ RRRINKIQLIKGPNRIILTLEDVTFINP	58 % (92 %)	
ROS-GC2(rn)	⁴⁹¹ RRRINKIQLIKGPNRIILTLEDVTFINP	58 % (92 %)	
GCR1(ol)	⁴⁹¹ RRRLQQIQLVKGPNRIILTLEDLTFINP	67 % (92 %)	
GC-D(rn)	⁵⁰¹ RLGLQQRLRLRGPHRIILTPOELTFLQR	42 % (75 %)	
GC-A(hs)	⁴⁹³ IYRKMLEKELASELWRVRWEDVEPSSL	0 (25 %)	
GC-C(hs)	⁴⁵⁵ RKYRKDYELRQKKWSHIPPENIFPLETN	8 % (25 %)	

B

		#36	
ROS-GC1(bt)	⁵⁵⁵ TNIGLYEGDWVWLKKFP-GDRHIAIRPAT		
ROS-GC1(hs)	⁵⁵⁰ PNIGVYEGDRVWLKKFP-GDQHIAIRPAT	83 % (83 %)	
ROS-GC1(rn)	⁵⁵³ TNIGLYEGDWVWLKKFP-GEHHMAIRPAT	83 % (100 %)	
ROS-GC2(bt)	⁵⁶¹ SNIAIYEGDWVWLKKFPGNFGD-IKSVE	77 % (85 %)	
ROS-GC2(hs)	⁵⁶¹ SNIAIYEGDWVWLKKFSLGDFGD-LKSIK	77 % (85 %)	
ROS-GC2(rn)	⁵⁶¹ SNIAIYQGDWVWLKKFPGNFGD-IKSIK	77 % (85 %)	
GCR1(ol)	⁵⁵⁹ SSVAVYEGDWVWLKKFEEGQFKE-VKQST	70 % (77 %)	
GC-D(rn)	⁵⁷⁰ TNVALYQGEWVWLKKFEAGTAPD-LRPSS	62 % (70 %)	
GC-A(hs)	⁵⁵⁴ AKTAYYKGNLVAVKRVNRKRIELTRKVL	15 % (38 %)	
GC-C(hs)	⁵⁰³ LRQCKYDKKRVIKDLKHNDGNFTEKQKI	23 % (23 %)	

Abbildung 4.2 Primärstrukturvergleich der Regionen der ROS-GC1, die durch die Peptide # 5 (A), #36 (B) und #82 (C) repräsentiert werden, mit den homologen Regionen anderer partikulärer GC; Aminosäurereste, die identisch mit den entsprechenden Resten in der ROS-GC1 des Rindes sind, sind schwarz unterlegt, konservativ ausgetauschte Aminosäurereste grau. Die Balken über den Sequenzen zeigen jeweils die Regionen, die durch die Peptide # 5, #36 und #82 abgebildet werden; der Prozentsatz identischer (konservierter) Aminosäurereste innerhalb dieser Regionen wird jeweils neben den Sequenzen angegeben. bt: *bos taurus*, hs: *homo sapiens*, rn: *rattus norvegicus*, GCR1(ol): sechstäbchenspezifische partikuläre Guanylatzyklase 1 aus *oryzias latipes* (Medaka-Kärpfling; HISATOMI et al., 1999).

C

			#82
ROS-GC1(bt)	¹⁰⁷⁰ PIPKPPDLQP-GASNHGISLHEIPPDRRQ		
ROS-GC1(hs)	¹⁰⁶⁵ PIPKPPDLQP-GASNHGISLQEIPPERRR	92 % (92 %)	
ROS-GC1(rn)	¹⁰⁶⁸ PIPKPPDLQP-GASNHGISLQEIPPERRK	92 % (92 %)	
ROS-GC2(bt)	¹⁰⁶⁹ PLPVPPPVGKDGQVGHGLQSVETAAAFQRK	23 % (30 %)	
ROS-GC2(hs)	¹⁰⁶⁹ PLPVPPPVGKDGQVGHGLQVETAAAFQRK	23 % (38 %)	
ROS-GC2(rn)	¹⁰⁶⁹ PLPVPPPVGKDGQVGHGLQPAETAAAFQRK	23 % (30 %)	
GCR1(ol)	¹⁰⁶⁴ PLPKPPEIKP-GDNWQEMVTEETIKTLFRQ	15 % (23 %)	
GC-D(rn)	¹⁰⁷⁸ SLPTPLSLIQP-GDPWQDHINQEIIRTGFAK	23 % (23 %)	
GC-A(hs)	-----	0 (0)	
GC-C(hs)	¹⁰⁰⁹ NLPTPTPTVENQQRLLQAEFSDMIANSLOKR	8 % (23 %)	

Abbildung 4.2 (Fortsetzung von S.98)

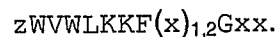
Wenn man die Sequenz der Region, die durch das Peptid # 5 abgebildet wird, im Vergleich zwischen den verschiedenen neuronalen partikulären GC betrachtet (→ Abbildung 4.2 A), erkennt man die folgende Konsensussequenz:

aaxGPNbIaLTa.

a steht dabei für eine aliphatische Aminosäure (I,L,M,V), b für eine basische Aminosäure (K,R) und x für eine beliebige Aminosäure. Die anderen Aminosäuren sind im internationalen Ein-Buchstabenkode angegeben. (→ Anhang A). Die Sekundärstruktur der JMD der ROS-GC1 wurde auf der Grundlage ihrer Primärstruktur vorhergesagt¹. Eine solche Vorhersage der Struktur eines Proteins kann natürlich nur als vorläufiger Anhaltspunkt bis zur Verfügbarkeit „harter“ struktureller Information gesehen werden. Die JMD ist nach dem Ergebnis der Vorhersage eine kompakte globuläre Domäne. Für die Region des Peptides # 5 wird die Struktur eines β -Faltblattes vorhergesagt, das durch einen kurzen exponierten Loop der Reste GPNb unterbrochen wird. Danach definiert diese Region also einen Knick (β -turn) im Rückgrat der JMD. Nach dem Konservierungsgrad der beteiligten Aminosäuren zu schließen, ist die Erhaltung dieser Struktur kritisch für die Funktion der neuronalen partikulären GC. Die Region, die durch das Peptid # 5 abgebildet wird, liegt fast unmittelbar hinter dem Ende der Transmembrandomäne (→ Abbildung 4.2 A; ⁴⁹³RHR)

¹ Vorhersage der Sekundärstruktur mit dem Programm PHDsec, Vorhersage der Lösungsmittelzugänglichkeit mit dem Programm PHDacc; PredictProtein server; <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein> (ROST, 1996).

Die Konsensussequenz für die Region, die durch das Peptid #36 abgebildet wird (→ Abbildung 4.2 B), ist



z steht dabei für eine saure Aminosäure (D,E). Nach der Sekundärstrukturvorhersage bildet die Region eine β -Faltblattstruktur aus, die nach dem konservierten Phenylalaninrest (F⁵⁷⁰ der ROS-GC1 aus dem Rind) in eine ungeordnete (Loop-)Struktur übergeht. Dieser Phenylalaninrest ist bei allen neuronalen partikulären GC konserviert, und sein Austausch gegen die Aminosäure Serin führt zu einer schweren Funktionsstörung der ROS-GC1 (→ 3.7.4; DUDA et al., 1999). Im Menschen führt dieser Aminosäureaustausch zum Krankheitsbild der Leber'schen kongenitalen Amaurose, einer schweren, autosomal rezessiv erblichen Netzhauterkrankung (PERRAULT et al., 1996). Die Erhaltung der genauen Struktur an dieser Position, die wahrscheinlich den Übergang zwischen zwei Sekundärstrukturelementen in der JMD markiert, ist also extrem kritisch für die Funktion der neuronalen partikulären GC. Das ungewöhnliche zWVW-Motiv in der ersten Hälfte dieser Region ist notwendig für die GCAP-1-induzierte Selbstassoziation von Peptiden, die diese Region abbilden (→ 3.6.2.1). Damit bildet es möglicherweise den Kern einer Dimerisierungsstelle. Die Loop-Struktur in der zweiten Hälfte der Region ist zwischen den verschiedenen neuronalen partikulären GC nicht gut konserviert.

Für die Region, die durch das Peptid #82 abgebildet wird, liefert die Vorhersage das Bild einer ungeordneten Region ohne erkennbare Sekundärstrukturelemente.

4.2.4 Die α 3- β 4-Loop-Region aus der CCD (SOKAL et al., 1999a)

Im Labor von Dr. K. Palczewski wurde unabhängig von der vorliegenden Arbeit eine Studie mit einem sehr ähnlichen experimentellen Ansatz durchgeführt (SOKAL et al., 1999a). Dabei wurde der gesamte intrazelluläre Teil der ROS-GC1 auf überlappende 15-mere Peptide abgebildet. Die Peptide blieben an die Festphase, die zu Synthese verwendet wurde, gekoppelt und wurden auf die Bindung von GCAP-1 durchmustert. Dabei wurde unter anderem ein Peptid identifiziert, dessen Sequenz das DWVWLKKF-Motiv des Peptides #36 enthielt (SOKAL#11, zur Unterscheidung werden die Peptide aus der Arbeit von SOKAL et al., 1999a, im folgenden als SOKAL#xx bezeichnet).

Der Schwerpunkt der Arbeit von SOKAL et al. wurde aber auf die Untersuchung eines Peptides gelegt, das eine Region aus der katalytischen Domäne (CCD) der ROS-GC1 abbildet. Das Peptid SOKAL#71 und seine verlängerte Version SOKAL#71' (18-mer; → Abbildung 4.3) unterdrückten die Aktivierung der nativen ROS-GC und der heterolog exprimierten ROS-GC1 durch GCAP-1 und GCAP-2. Die apparente Affinität der Peptide für GCAP-2 war dabei größer als die für GCAP-1. Bei Affinitätschromatographischen Experimenten banden GCAP-1 und GCAP-2 an das immobilisierte Peptid SOKAL#71'. Damit ist es sehr wahr-

scheinlich, daß die Region, die durch dieses Peptid abgebildet wird, direkt an der Bindung von GCAP-1 beteiligt ist. Eine Mutante, bei der in dieser Region eine Sequenz von 6 AS (⁹⁷⁵EVPVRI) gegen die homologe Sequenz des Peptidrezeptors GC-A (QEQLRL; → Abbildung 4.3) ausgetauscht wurden, konnte nicht mehr durch GCAP-1 aktiviert werden.

Die Sequenz der Region, die durch das Peptid SOKAL#71 abgebildet wird, wird in Abbildung 4.3 im Vergleich mit den homologen Regionen anderer partikulärer GC gezeigt. Diese Region ist zwischen allen partikulären GC jeweils etwa genau so gut konserviert wie die gesamte CCD. Die Verteilung geladener Aminosäurereste ist aber in der homologen Region des Peptidrezeptors GC-C völlig anders als bei den neuronalen partikulären GC. Bei der GC-A ist die homologe Region basischer als bei den neuronalen partikulären GC und etwa in der Mitte des Loops sind die Aminosäuren VP durch EQ ersetzt, was eine veränderte Sekundärstruktur erwarten läßt.

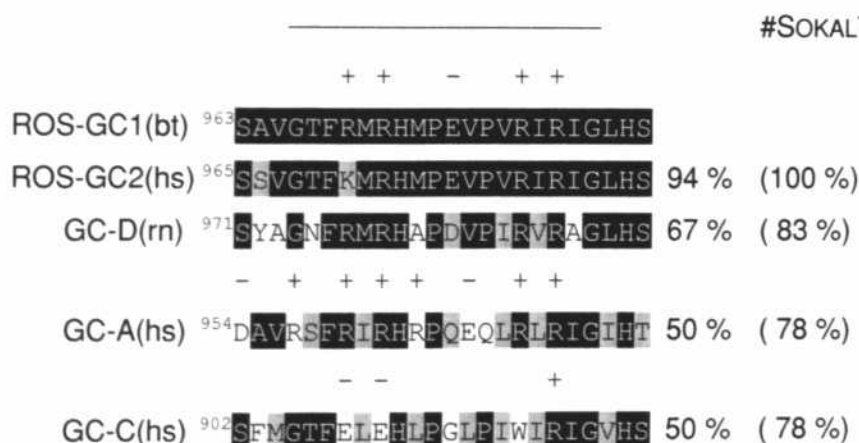


Abbildung 4.3 Primärstrukturvergleich der Region der ROS-GC1, die durch das Peptid SOKAL#71 repräsentiert wird, mit den homologen Regionen anderer partikulärer GC; Aminosäurereste, die identisch mit den entsprechenden Resten in der ROS-GC1 des Rindes sind, sind schwarz unterlegt, konservativ ausgetauschte Aminosäurereste grau. Der Balken über den Sequenzen zeigt die Region, die durch das Peptid SOKAL#71 abgebildet wird; der Prozentsatz identischer (konservierter) Aminosäurereste innerhalb dieser Region wird jeweils neben den Sequenzen angegeben; die Positionen der basischen Aminosäuren K und R bzw. der sauren Aminosäuren D und E werden durch + bzw. - über den jeweiligen Sequenzen hervorgehoben. bt: *bos taurus*, hs: *homo sapiens*, rn: *rattus norvegicus*.

Für die CCD der ROS-GC1 ist ein Homologiemodell der Tertiärstruktur verfügbar (LIU et al., 1997). Danach bildet die Region, die durch das Peptid SOKAL#71 repräsentiert wird, einen Loop zwischen der α 3-Helix und dem β 4-Faltblatt der CCD. Die homologe Region bildet in der CCD der Adenylatzyklen, auf deren Struktur das Homologiemodell beruht, einen Teil der Bindungsstelle für die α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine des G_s -Subtyps (TESMER et al., 1997). Diese Adenylatzyklen werden durch $G_s\alpha$ aktiviert.

4.3 Modell für die Regulation der ROS-GC1

Die minimale funktionelle Einheit aller partikulären Guanylatzyklen ist das Dimer, da die katalytische Domäne (CCD) nur im dimeren Zustand überhaupt aktiv sein kann. An der Bindung des Substrates und an der Katalyse sind jeweils Aminosäurereste beider CCD im Dimer beteiligt (LIU et al., 1997). Das Homologiemodell für die Struktur der CCD zeigt, daß die monomeren CCD im Dimer antiparallel angeordnet sind. Die Kontaktflächen der Monomere formen eine Spalte, in der zwei katalytische Zentren liegen. Die Regulation der katalytischen Aktivität erfolgt wahrscheinlich durch die Kontrolle der relativen Orientierung der beiden monomeren CCD im Dimer. Eine geringe Reorientierung beider Monomere kann zu deutlichen Verschiebungen zwischen den Aminosäureresten der katalytischen Zentren führen (zur Übersicht über die Regulation der Adenylatzyklen s. z.B. HURLEY, 1998; HURLEY, 1999).

Die antiparallele Orientierung der CCD im Dimer führt zu einer Einschränkung der möglichen Orientierungen der gesamten ROS-GC1. Das ROS-GC1-Dimer ist damit auf eine zweizählige Rotationssymmetrie festgelegt. Diese Symmetrie könnte aber durch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen gebrochen werden. Die Bindung von einem Molekül GCAP-1 an das ROS-GC1-Dimer würde zum Beispiel zu einem solchen Symmetriebruch führen. Binden zwei Moleküle oder ein eventuelles Dimer von GCAP-1 an die ROS-GC1, bliebe die Symmetrie des Komplexes erhalten. Die Stöchiometrie von GCAP-1 zu ROS-GC1 im funktionellen Komplex des Enzyms ist noch nicht geklärt. Für die Bildung eines Komplexes von einem Molekül GCAP-1 mit mehreren Monomeren der ROS-GC1 spricht, daß bei der ursprünglichen biochemischen Reinigung von GCAP-1 in ROS ein molarer Unterschuß von GCAP-1 gegenüber der ROS-GC1 gefunden wurde (etwa 1:4; FRINS, 1996). Dieses Ergebnis ist aber wahrscheinlich zum Teil darauf zurückzuführen, daß bei den allgemein verwendeten Methoden für die biochemische Präparation von ROS eine unbestimmte Menge von GCAP-1 verlorengeht (s. z.B. in dieser Arbeit, Abbildung 3.12, die Erhöhung der GC-Aktivität in ganzen ROS durch die Zugabe von exogenem GCAP-1; GORCZYCA et al., 1994; FRINS, 1996). Für die Bindung mehrerer GCAP-1-Moleküle an die funktionelle Einheit der ROS-GC1 spricht, daß die native ROS-GC und die heterolog exprimierte ROS-GC1 durch GCAP-1 oder das funktionell homologe Protein GCAP-2 kooperativ aktiviert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Aktivierung durch rekombinantes GCAP-1 Hill-Koeffizienten h ($\rightarrow$ 3.5.1) zwischen 1,3 und 1,7 beobachtet ($\rightarrow$ Abbildung 3.3 A, $h = 1,7$; Abbildung 3.19 A, $h = 1,3$). LAURA und HURLEY (1998) beobachteten für die Aktivierung der nativen ROS-GC durch GCAP-2 ebenfalls kooperatives Verhalten. Im folgenden wird deshalb davon ausgegangen, daß die ROS-GC1 und GCAP-1 einen Komplex mit zweizähliger Rotationssymmetrie bilden. Dieser Komplex ist unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich permanent und unabhängig von der $[Ca^{2+}]$ stabil ($\rightarrow$ 1.3).

In einem solchen Komplex würde die (symmetrische) Konformationsänderung eines Elements immer von Torsionsbewegungen begleitet sein. Wenn auf der Symmetrieachse geeignete Fixpunkte („Scharniere“) vorhanden sind, kann sich eine solche Torsionsbewegung durch die gesamte Quartärstruktur des Komplexes fortsetzen. Eine Konformationsänderung z.B. in einer Region der JMD könnte die relative Orientierung der beiden Hälften der katalytischen Domäne verändern, die in der Primärstruktur der ROS-GC1 mehr als 300 AS von der entsprechenden Region entfernt ist, und damit einen erheblichen Einfluß auf die katalytische Aktivität ausüben (s.o.).

Die Region, die durch das Peptid # 5 abgebildet wird, wäre in einem solchen Modell der erste Fixpunkt im intrazellulären Teil des funktionellen Komplexes der ROS-GC1 (→ Abbildung 4.4 A). Durch ihre wahrscheinliche Bindung an ein Element des Zytoskeletts (Tubulin; → 3.6.1) würde sie das System zur Übertragung von Konformationsänderungen an seinem „vorderen“ Ende verankern. Wenn diese Verankerung durch das Peptid # 5 gestört wird, ist nach diesem Modell die „richtige“ Übertragung der Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung von GCAP-1 auf die CCD nicht mehr möglich. Dadurch unterdrückt das Peptid die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der ROS-GC1 (→ 3.3, 3.5.1). Möglicherweise ist es auch diese Verankerung der ROS-GC1 im Zytoskelett, die bei der Solubilisierung des Proteins zerstört wird. Die rekonstituierte solubilisierete ROS-GC1 kann nicht mehr durch GCAP-1 aktiviert werden (KOCH, 1991). Die Region, die durch das Peptid # 5 abgebildet wird, enthält wahrscheinlich einen β -turn und folgt fast unmittelbar auf die Transmembrandomäne (→ 4.2.3). Wenn diese Region deletiert wird (Mutante $\Delta 1$; → 3.7.3), bekommen die beiden JMD im ROS-GC1-Dimer eine völlig andere relative Orientierung. Diese Störung wird dann durch den angenommenen Torsionsmechanismus auf die relative Orientierung der beiden Hälften der CCD übertragen, was deren Aktivität erheblich beeinträchtigt (→ Abbildung 4.4 B).

Die Region die durch das Peptid #36 repräsentiert wird, hat möglicherweise eine doppelte Funktion. Sie hat wahrscheinlich teilweise die Struktur eines β -Faltblattes (→ 4.2.3). Die Seitenketten ihrer Aminosäurereste würden damit alternierend nach zwei Seiten zeigen. Die Reste der einen Seite könnten Teil einer Bindungsstelle für GCAP-1 sein, was die beobachtete Wechselwirkung der abbildenden Peptide mit GCAP-1 erklären würde (→ 3.4, 3.6.2.1, 3.6.2.3.; SOKAL et al., 1999a). Andere Elemente der β -Faltblattstruktur könnten mit der gleichen Region im zweiten ROS-GC1-Monomer des funktionellen Komplexes wechselwirken. Für eine solche Funktion als Dimerisierungsregion spricht die Tendenz der abbildenden Peptide zur Selbstassoziation (→ 3.6.2). Die Region, die durch das Peptid #36 abgebildet wird, wäre nach diesem Modell also gleichzeitig eines der „Scharniere“, die notwendig sind, um Konformationsänderungen durch die ganze ROS-GC zu übertragen (s.o.), und einer der Kontaktpunkte für GCAP-1, durch die dessen Konformationsänderungen auf Bewegungen der ROS-GC1 übertragen werden (→ Abbildung 4.4 A). Die Wechselwirkungen, an denen

diese Region beteiligt ist, sind so zentral für die Struktur des funktionellen Komplexes der ROS-GC1, daß ihre Störung zu einer erheblichen Verschiebung in der relativen Position der zwei Hälften der katalytischen Domäne und damit zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust führt (→ Abbildung 4.4 C). Diese Störung kann durch das Peptid #36 (→ 3.5.1, 3.5.2), durch die Deletion der Region (Mutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$; → 3.7.3) oder nur durch den Austausch eines einzelnen kritischen Aminosäurerestes (Mutante LCA; → 3.7.4) hervorgerufen werden. Durch eine Mutagenesestudie von KRYLOV et al. (1999) (→ 1.3) wurden die Regionen von GCAP-1 identifiziert, deren Primärstruktur erhalten bleiben muß, damit die Aktivierung der ROS-GC möglich ist. Diese Regionen umfassen einen großen Teil des gesamten Proteins, d.h. die EF-Hände 1 (dysfunktionell), 2 und 3 und eine Region die C-terminal von der EF-Hand 4 liegt. Die EF-Hand 3 liefert vermutlich den größten Beitrag zur Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung des gesamten Proteins (SOKAL et al., 1999b). Die EF-Hände 1 und 2 bilden in der Tertiärstruktur des homologen GCAP-2 (AMES et al., 1999) zusammen eine exponierte hydrophobe Oberfläche und damit eine potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungsstelle aus. Bei GCAP-2 sind etwa die selben Bereiche der Primärstruktur für die Regulation der ROS-GC verantwortlich, wie bei GCAP-1 (OLSHEVSKAYA et al., 1999). Bei GCAP-1 ist wahrscheinlich die Region zwischen den EF-Händen 2 und 3 an der Bindung der ROS-GC1 beteiligt (SCHREM et al., 1999). Die C-terminale Region hinter der EF-Hand 4 liegt in der Tertiärstruktur von GCAP-2 und wahrscheinlich auch von GCAP-1 (für ein Homologiemodell der Tertiärstruktur von GCAP-1 s. z.B. SOKAL et al., 1999b) auf der Oberfläche des Proteins, die den EF-Händen 1 und 2 gegenüberliegt. Damit ergibt sich für GCAP-1 (und GCAP-2) ein Modell, nach dem mindestens zwei Wechselwirkungsstellen in räumlich getrennten Regionen des Proteins die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung der zentralen EF-Hände auf die ROS-GC1 übertragen. Es gibt danach in der ROS-GC1 mindestens zwei Bindungsstellen für GCAP-1, durch die die Konformationsänderung von GCAP-1 in eine angenommene Torsionsbewegung des ROS-GC1-Dimers übersetzt wird. Eine dieser Bindungsstellen wäre dann wahrscheinlich die Region aus der CCD, die durch das Peptid SOKAL#71' abgebildet wird (→ 4.2.4). Die Region der JMD, die durch das Peptid #36 abgebildet wird, bildet dann möglicherweise einen Teil der zweiten Bindungsstelle für GCAP-1 (→ Abbildung 4.4 A). Weitere, noch nicht identifizierte Regionen der ROS-GC1 könnten ebenfalls an der Wechselwirkung mit GCAP-1 beteiligt sein. Die quantitativen Unterschiede, die für die Regulation der ROS-GC1 bzw. der ROS-GC2 durch GCAP-1 bzw. GCAP-2 beobachtet werden (→ 1.3) wären danach auf die unterschiedlichen Affinitäten zwischen den verschiedenen Wechselwirkungsstellen auf beiden Proteinen zurückzuführen.

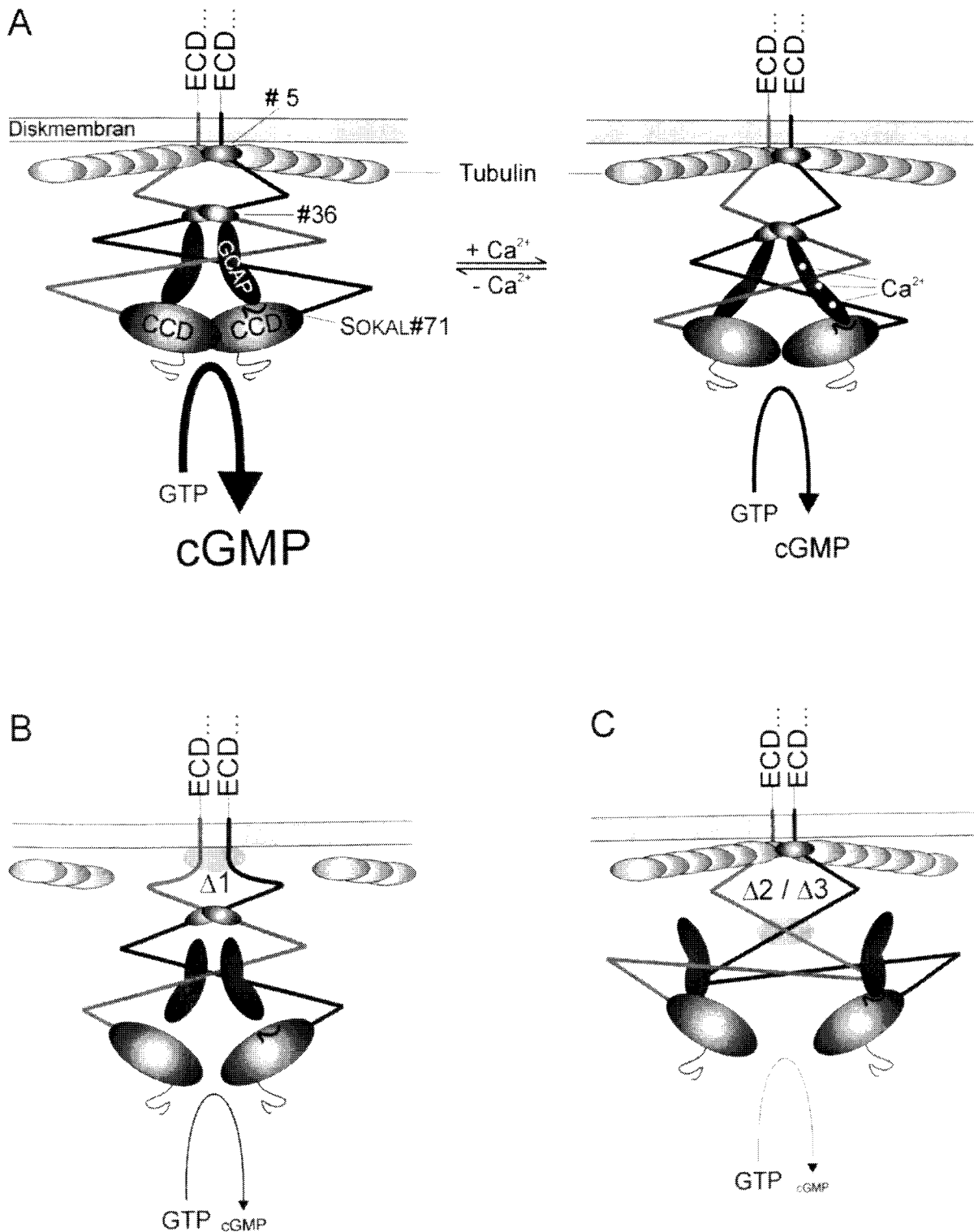


Abbildung 4.4 Schematisches Modell für die Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-1; A: Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-1. B: Gestörte Struktur der Mutante $\Delta 1$. C: Gestörte Struktur der Mutanten $\Delta 2$ und $\Delta 3$. Die Torsionsbewegungen, die im Text diskutiert werden, werden hier zur einfacheren Darstellung in der Papierebene als Scherenbewegungen dargestellt.

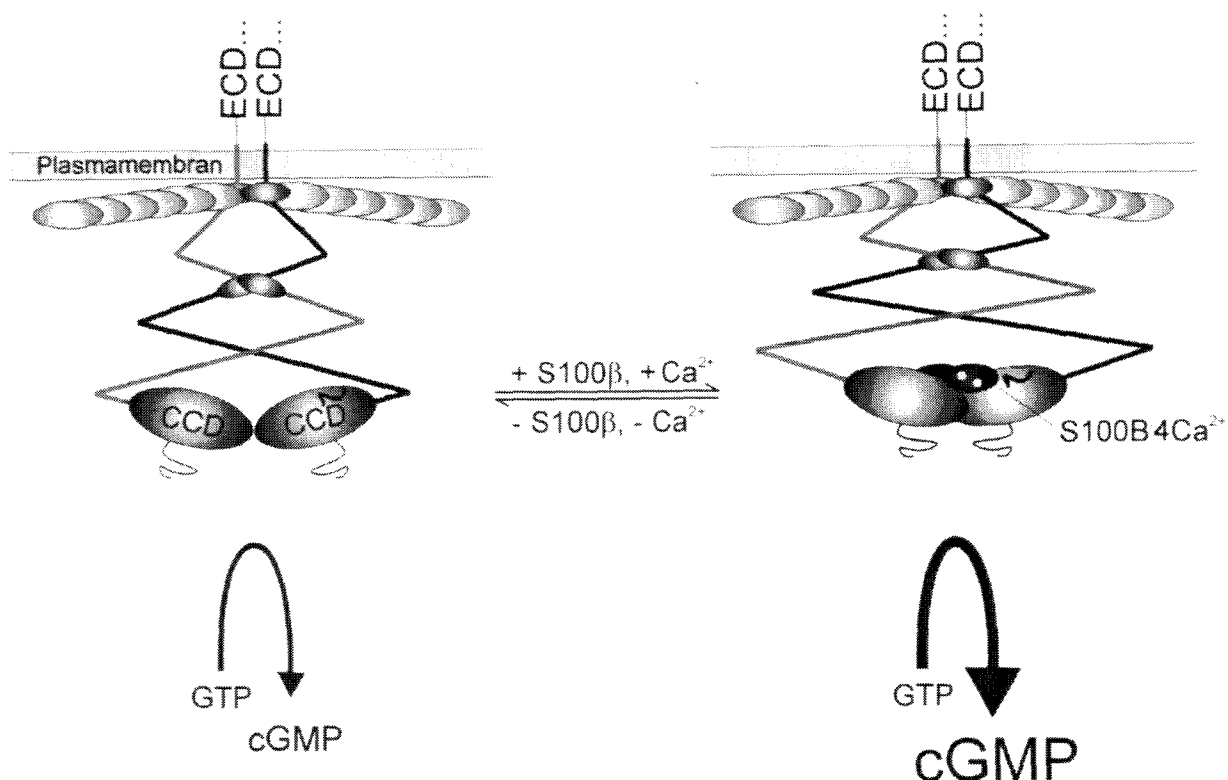


Abbildung 4.5 Schematisches Modell für die Regulation der ROS-GC1 durch S100β.

Das Ca^{2+} -bindende Protein S100β aktiviert die ROS-GC1 im Gegensatz zu den Isoformen von GCAP im Ca^{2+} -gebundenen Zustand (MARGULIS et al., 1996; POZDNYAKOV et al., 1997). Die ROS-GC2 wird durch S100β nur etwa halb so stark aktiviert wie die ROS-GC1 und der EC_{50} -Wert für die Aktivierung ist um fast eine Größenordnung höher. Die Aktivierung erfolgt wahrscheinlich durch die Bindung von S100β an die CCD der ROS-GC1 (DUDA et al., 1996b; DUDA et al., 1998). S100β bildet unter physiologischen Bedingungen Dimere (S100B), so daß wahrscheinlich auch bei seiner Bindung die zweizählige Rotationssymmetrie des funktionellen Komplexes der ROS-GC1 erhalten bleibt. Durch die direkte Wechselwirkung mit der CCD ist die Aktivierung der ROS-GC1 durch S100β auch dann möglich, wenn der Übertragungsmechanismus für die Aktivierung durch GCAP-1, wie bei den ROS-GC1-Mutanten $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ und LCA gestört ist ($\rightarrow$ Abbildung 4.5; 3.7.3, 3.7.4).

4.4 Ausblick

Das vorgestellte Modell für die Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-1 (→ 4.3) ist nicht sehr detailliert und teilweise spekulativ. Es erlaubt jedoch, die bisher verfügbaren experimentellen Informationen in einen konzeptionellen Rahmen einzuordnen.

Einzelne Aspekte des Modells können ohne zusätzliche strukturelle Informationen überprüft werden. Die Assoziation der ROS-GC1 mit Elementen des Zytoskeletts kann mit etablierten biochemischen Methoden genauer untersucht werden. Eine der Vorhersagen des Modells ist, daß die Mutante $\Delta 1$ im Gegensatz zum Wildtyp der ROS-GC1 bei der biochemischen Präparation nicht zusammen mit Tubulin fraktioniert werden sollte. Durch Mutagenesestudien könnte die Funktion einzelner Aminosäurereste in den identifizierten Regionen der ROS-GC1 untersucht werden. Interessant wären in diesem Zusammenhang kombinierte Untersuchungen mit mutierten Formen von GCAP-1 und GCAP-2, deren potentielle Wechselwirkungsregionen verändert wurden. Die Wechselwirkung von GCAP-1 und GCAP-2 mit heterolog exprimierten Domänen und Regionen der ROS-GC1 bzw. der ROS-GC2 kann durch biophysikalische Methoden, wie z.B. SPR-spektroskopische Messungen, quantitativ untersucht werden, um potentielle Wechselwirkungsstellen einzugrenzen und zu charakterisieren.

Das vorgestellte Modell für die Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-1 wird aber erst dann stringent überprüft werden können, wenn „harte“ Information über die Tertiär- und Quartärstruktur des funktionellen Komplexes der ROS-GC1 mit GCAP-1 zur Verfügung stehen werden.

5 Literatur

- AMES, J.B., DIZHOOR, A.M., IKURA, M., PALCZEWSKI, K. und STRYER, L. (1999);
Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases; *J.Biol.Chem.* **274**, 19329-19337.
- ANGELSON, J.K. und WENSEL, T.G. (1993);
A GTPase-accelerating factor for transducin, distinct from its effector cGMP phosphodiesterase, in rod outer segment membranes; *Neuron* **11**, 939-949.
- ANGELSON, J.K. und WENSEL, T.G. (1994);
Enhancement of rod outer segment GTPase accelerating protein activity by the inhibitory subunit of cGMP phosphodiesterase; *J.Biol.Chem.* **269**, 16290-16296.
- APARICIO, J.G. und APPLEBURY, M.L. (1996);
The photoreceptor guanylate cyclase is an autophosphorylating protein kinase; *J.Biol.Chem.* **271**, 27083-27089.
- ARSHAVSKY, V.Y., DUMKE, C.L. und BOWND, D.M. (1992);
Noncatalytic cGMP-binding sites of amphibian rod cGMP phosphodiesterase control interaction with its inhibitory γ -subunits; *J.Biol.Chem.* **267**, 24501-24507.
- BAEHR, W., DEVLIN, M.J. und APPLEBURY, M.I. (1979);
Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments; *J.Biol.Chem.* **254**, 11669-11677.
- BAUER, P.J. (1996);
Cyclic GMP-gated channels of bovine rod photoreceptors: Affinity, density and stoichiometry of Ca^{2+} -calmodulin binding sites; *J.Physiol.* **494**, 675-685.
- BIRNBOIM, H.C. und DOLY, J. (1979);
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1523.
- BRADFORD, M.M. (1976);
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- BULLOCK, W.O., FERNANDEZ, J.M. und SHORT, J.M. (1987);
XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection; *BioTechniques* **5**, 376-378.
- CALVERT, P.D., HO, T.W., LEFEBVRE, Y.M. und ARSHAVSKY, V.Y. (1998);
Onset of feedback reactions underlying vertebrate rod photoreceptor light adaptation; *J.Gen.Physiol.* **111**, 39-51.
- CERVETTO, L., LAGNADO, L., PERRY, R.J., ROBINSON, D.W. und MCNAUGHTON, P.A. (1989);
Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients; *Nature* **337**, 740-743.
- CHEN, C. und OKAYAMA, H. (1987);
High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA; *Molec.Cell Biol.* **7**, 2745-2752.
- CHINKERS, M. und GARBERS, D.L. (1989);
The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling; *Science* **245**, 1392-1394.
- CHINKERS, M., GARBERS, D.L., CHANG, M.-S., LOWE, D.G., CHIN, H., GOEDEL, D.G. und SCHULZ, S. (1989);
A membrane form of guanylyl cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor; *Nature* **338**, 78-83.
- COOPER, N., LIU, L., YOSHIDA, A., POZDNYAKOV, N., MARGULIS, A., und SITARAMAYYA, A. (1995);
The bovine rod outer segment guanylate cyclase, ROS-GC, is present in both outer segment and synaptic layers of the retina; *J.Mol.Neurosci.* **6**, 211-222.
- CORPET, F., GOUZY, J. und KAHN, D. (1999);
Recent improvements of the ProDom database of protein domain families; *Nucleic Acids Res.* **27**, 263-267.
- CORTESE, R., MONACI, P., LUZZAGO, A., SANTINI, C., BARTOLI, F., CORTESE, I., FORTUGNO, P., GALFRÈ, G., NICOSIA, A. und FELICI, F. (1996);
Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries; *Curr.Opin.Biotechnol.* **7**, 616-621.
- COTE, R.H., BOWND, D.M. und ARSHAVSKY, V.Y. (1994);
cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: Role in feedback regulation of visual transduction; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 4845-4849.

- CUENCA,N., LOPEZ,S., HOWES,K. und KOLB,H. (1998);
The localization of guanylate cyclase-activating proteins in the mammalian retina; *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* **39**, 1243-1250.
- DANCHIN,A. (1993);
Phylogeny of adenylyl cyclases; *Adv.Second Mess.Phosphoprot.Res.* **27**, 109-162.
- DENNINGER,J.W. und MARLETTA,M.A. (1999);
Guanylate cyclase and the NO/cGMP signalling pathway; *Biochim.Biophys.Acta* **1411**, 334-350.
- DESHMANE,S.P., PARKINSON,S.J., CRUPPER,S.S., ROBERTSON,D.C., SCHULZ,S. und WALDMAN,S.A. (1997);
Cytoplasmic domains mediate the ligand-induced affinity shift of guanylyl cyclase C; *Biochemistry* **36**, 12921-12929.
- DHALLAN,R.S., YAU,K.W., SCHRADER,K.A. und REED,R.R. (1990);
Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons; *Nature* **347**, 184-187.
- DIZHOOR,A.M., LOWE,D.G., OLSHEVSKAYA,E.V., LAURA,R.P. und HURLEY,J.B. (1994);
The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, retGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator; *Neuron* **12**, 1345-1352.
- DIZHOOR,A.M., OLSHEVSKAYA,E.V., HENZEL,W.J., WONG,S.C. STULTS,J.T., ANKODINOVA,I. und HURLEY,J.B. (1995);
Cloning, sequencing, and expression of a 24-kDa Ca²⁺-binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase; *J.Biol.Chem.* **270**, 25200-25206.
- DIZHOOR,A.M. und HURLEY,J.B. (1996);
Inactivation of EF-hands makes GCAP-2 (p24) a constitutive activator of photoreceptor guanylyl cyclase by preventing a Ca²⁺-induced "activator-to-inhibitor" transition; *J.Biol.Chem.* **271**, 19346-19350.
- DIZHOOR,A.M., BOIKOV,S.G. und OLSHEVSKAYA,E.V. (1998);
Constitutive activation of photoreceptor guanylate cyclase by Y99C mutant of GCAP-1. Possible role in causing autosomal dominant cone degeneration; *J.Biol.Chem.* **273**, 17311-17314.
- DOWLING,J.E. (1987);
The retina: An approachable part of the brain; Belknap Press; Cambridge, Massachusetts, USA.
- DREES,B.L. (1999);
Progress and variation in two-hybrid and three-hybrid technologies; *Curr.Opin.Chem.Biol.* **3**, 64-70.
- DUDA,T., GORACZNIK,R.M. und SHARMA,R.K. (1993);
Core sequence of ATP regulatory module in receptor guanylyl cyclases; *FEBS Lett.* **315**, 143-148.
- DUDA,T., GORACZNIK,R., SURGUCHEVA,I., RUDNICKA-NAWROT,M., GORCZYCA,W.A., PALCZEWSKI,K., SITARAMAYYA,A., BAEHR,W. und SHARMA,R.K. (1996a);
Calcium modulation of bovine photoreceptor guanylate cyclase; *Biochemistry* **35**, 8478-8482.
- DUDA,T., GORACZNIK,R.M. und SHARMA,R.K. (1996b);
Molecular characterization of S100A1-S100B protein in the retina and its activation mechanism of bovine photoreceptor guanylate cyclase; *Biochemistry* **35**, 6263-6266.
- DUDA,T., GORACZNIK,R., POZDNYAKOV,N., SITARAMAYYA,A. und SHARMA,R.K. (1998);
Differential activation of rod outer segment membrane guanylate cyclases, ROS-GC1 and ROS-GC2, by CD-GCAP and identification of the signaling domain; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **242**, 118-122.
- DUDA,T., VENKATARAMAN,V., GORACZNIK,R., LANGE,C., KOCH,K.-W. und SHARMA,R.K. (1999);
Functional consequences of a rod outer segment membrane guanylate cyclase (ROS-GC1) gene mutation linked with Leber's congenital amaurosis; *Biochemistry* **38**, 509-515.
- DURONIO,R.J., JACKSON-MACHELSKI,E., HEUCKEROOTH,R.O., OLINS,P.O., DEVINE,C.S., YONEMOTO,S., SLICE,L.W., TAYLOR,S.S. und GORDON,J.I. (1990);
Protein N-myristoylation in *Escherichia coli*: Reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**, 1506-1510.
- ERICKSON,M.A., LAGNADO,L., ZOZULYA,S., NEUBERT,T.A., STRYER,L. und BAYLOR,D.A. (1998);
The effect of recombinant recoverin on the photoresponse of truncated rod photoreceptors; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 6474-6479.
- FÄGERSTAM,L.G., FROSTELL-KARLSSON,Å., KARLSSON,R., PERSSON,B. und RÖNNEBERG,I. (1992);
Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis; *J.Chromatography* **597**, 397-410.
- FESENKO,E.E., KOLESNIKOV, S.S. und LYUBARSKY,A.L. (1985);
Induction by cyclic GMP of cationic conductance in the plasma membrane of retinal rod outer segment; *Nature* **313**, 310-313.

- FLEISCHMAN,D. und DENISEVICH,M. (1979);
Guanylate cyclase of isolated bovine retinal rod axonemes; *Biochemistry* **18**, 5060-5066.
- FLEISCHMAN,D., DENISEVICH,M., RAVEED,D. und PANNBACKER,R.G. (1980);
Association of guanylate cyclase with the axoneme of retinal rods; *Biochim.Biophys.Acta* **630**, 176-186.
- FORTE,R.L. (1999);
Guanylin regulatory peptides: Structures, biological activities mediated by cyclic GMP, and pathobiology; *Regul.Pept.* **81**, 25-39.
- FOSTER,D.C., WEDEL,B.J., ROBINSON,S.W. und GARBERS,D.L. (1999);
Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases; *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* **135**, 1-38.
- Fox,J.E. (1995);
Multiple peptide synthesis; *Mol.Biotechnol.* **3**, 249-258.
- FRINGS,S. (2000);
Chemo-electrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates; *Cell.Molec.Life Sci.* (im Druck).
- FRINS,S. (1996);
Funktionelle Charakterisierung eines Guanylatzyklase-aktivierenden Proteins aus Photorezeptorzellen von Wirbeltieren; *Berichte des Forschungszentrums Jülich* **3269**; Forschungszentrum Jülich, Jülich (Dissertation, Universität zu Köln).
- FRINS,S., BÖNIGK,W., MÜLLER,F., KELLNER,R. und KOCH,K.-W. (1996);
Functional characterization of a guanylyl cyclase-activating protein from vertebrate rods; *J.Biol.Chem.* **271**, 8022-8027.
- FÜLLE,H.-J., VASSAR,R., FOSTER,D.C., YANG,R.-B., AXEL,R. und GARBERS,D.L. (1995);
A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 3571-3575.
- FULLER,F., PORTER,J.G., ARFSTEN,A.E., MILLER,J., SCHILLING,J.W., SCARBOROUGH,R.M., LEWICKI,J.A. und SCHENK,D.B. (1988);
Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones; *J.Biol.Chem.* **263**, 9395-9401.
- FUNG,B.K.-K., HURLEY,J.B. und STRYER,L. (1981);
Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision; *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* **78**, 152-156.
- GAUDET,R., BOHM,A. und SIGLER,P.B. (1996);
Crystal structure at 2.4 Å resolution of the complex of transducin $\beta\gamma$ and its regulator, phosducin; *Cell* **87**, 577-588.
- GILMAN,A.G. (1995);
G-Proteine und die Regulation der Adenylat-Cyclase (Nobel-Vortrag); *Angew.Chemie* **107**, 1533-1548.
- GORACZNAK,R.M., DUDA,T. und SHARMA,R.K. (1992);
A structural motif that defines the ATP-regulatory module of guanylate cyclase in atrial natriuretic factor signalling; *Biochem.J.* **282**, 533-537.
- GORACZNAK,R.M., DUDA,T., SITTARAMAYA,A. und SHARMA,R.K. (1994);
Structural and functional characterization of the rod outer segment membrane guanylate cyclase; *Biochem.J.* **302**, 455-461.
- GORACZNAK,R.M., DUDA,T. und SHARMA,R.K. (1998);
Calcium modulated signaling site in type 2 rod outer segment membrane guanylate cyclase (ROS-GC2); *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **245**, 447-453.
- GORCZYCA,W.A., GRAY-KELLER,M.P., DETWILER,P.B. und PALCZEWSKI,K. (1994);
Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 4014-4018.
- GORCZYCA,W.A., POLANS,A.S., SURGUCHEVA,I.G., SUBBARAYA,I., BAEHR,W. und PALCZEWSKI,K. (1995);
Guanylyl cyclase activating protein. A calcium sensitive regulator of phototransduction; *J.Biol.Chem.* **270**, 22029-22036.
- GORDON,S.E., DOWNING-PARK,J. und ZIMMERMANN,A.L. (1995);
Modulation of the cGMP-gated ion channel in frog rods by calmodulin and an endogenous inhibitory factor; *J.Physiol.* **486**, 533-546.
- GRAY-KELLER,M.P., POLANS,A.S., PALCZEWSKI,K. und DETWILER,P.B. (1993);
The effect of recoverin-like calcium binding proteins on the photoresponse of retinal rods; *Neuron* **10**, 523-531.

- GRAY-KELLER, M.P. und DETWILER, P.B. (1994);
The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods; *Neuron* **13**, 849-861.
- GRAY-KELLER, M.P. und DETWILER, P.B. (1996);
Ca²⁺-dependence of dark- and light-adapted flash responses in rod photoreceptors; *Neuron* **17**, 323-331.
- HAESELEER, F., SOKAL, I., LI, N., PETTENATI, M., RAO, N., BRONSON, D., WECHTER, R., BAEHR, W. und PALZCEWSKI, K. (1999);
Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily; *J.Biol.Chem.* **274**, 6526-6535.
- HALLET, M.A., DELAAT, J.L., ARIKAWA, K., SCHLAMP, C.L., KONG, F. und WILLIAMS, D.S. (1996);
Distribution of guanylate cyclase within photoreceptor outer segments; *J.Cell Sci.* **109**, 1803-1812.
- HARRISON, S.M. und BERS, D.M. (1987);
The effect of temperature and ionic strength on the apparent Ca-affinity of EGTA and the analogous Ca-chelators BAPTA and dibromo-BAPTA; *Biochim.Biophys.Acta* **925**, 133-143.
- HAYNES, L.W. und YAU, K.-W. (1985);
Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones; *Nature* **317**, 61-64.
- HE, W., COWAN, C.W. und WENSEL, T.G. (1998);
RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction; *Neuron* **20**, 95-102.
- HIGGINS, D.G. und SHARP, P.M. (1988);
CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer; *Gene* **73**, 237-244.
- HILL, A.V. (1910);
The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves; *J.Physiol.* **40**, iv-vii.
- HISATOMI, O., HONKAWA, H., IMANISHI, Y., SATOH, T. und TOKUNAGA, F. (1999);
Three kinds of guanylate cyclase expressed in medaka photoreceptor cells in both retina and pineal organ; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **255**, 216-220.
- HOBBS, A.J. (1997);
Soluble guanylate cyclase: The forgotten sibling; *Trends Pharmacol.Sci.* **18**, 484-491.
- HOFMANN, K.P. (1986);
Photoproducts of rhodopsin in the disc membrane; *Photobiochem.Photobiophys.* **13**, 309-327.
- HOWES, K., BRONSON, J.D., DANG, Y.L., LI, N., ZHANG, K., RUIZ, C., HELEKAR, B., LEE, M., SUBBARAYA, I., KOLB, H., CHEN, J. und BAEHR, W. (1998);
Gene array and expression of mouse retina guanylate cyclase activating proteins 1 and 2; *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* **39**, 867-875.
- HSU, Y.-T. und MOLDAV, R.S. (1993);
Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin; *Nature* **361**, 76-79.
- HURLEY, J.B. und STRYER, L. (1982);
Purification and characterization of the γ regulatory subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase from rod outer segments; *J.Biol.Chem.* **257**, 11094-11099.
- HURLEY, J.H. (1998)
The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily; *Cur.Opinion Struct.Biol.* **8**, 770-777.
- HURLEY, J.H. (1999);
Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase; *J.Biol.Chem.* **274**, 7599-7602.
- ITAKURA, M., IWASHINA, M., MIZUNO, T., ITO, T., HAGIWARA, H. und HIROSE, S. (1994);
Mutational analysis of disulfide bridges in the type C atrial natriuretic peptide receptor; *J.Biol.Chem.* **269**, 8314-8318.
- JOHNSTON, J.P., FARHANGFAR, F., APARICIO, J.G., NAM, S.H. und APPLEBURY, M.L. (1997);
The bovine guanylate cyclase GC-E gene and 5' flanking region; *Gene* **193**, 219-227.
- JUILFS, D.M., FÜLLE, H.-J., ZHAO, A.Z., HOUSLAY, M.D., GARBERS, D.L. und BEAVO, J.A. (1997);
A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 3388-3395.
- KACHI, S., NISHIZAWA, Y., OLSHEVSKAYA, E., YAMAZAKI, A., MIYAKE, Y., WAKABAYASHI, T., DIZHOOR, A. und USUKURA, J. (1999);
Detailed localization of photoreceptor guanylate activating protein-1 and -2 in mammalian retinas using light and electron microscopy; *Exp.Eye Res.* **68**, 465-473.

- KAWAMURA,S. und MURAKAMI,M. (1991);
Calcium dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods; *Nature* **349**, 420-423.
- KAWAMURA,S. (1993);
Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin; *Nature* **362**, 855-857.
- KELSELL,R.K., GREGORY-EVANS,K., PAYNE,A.M., PERAULT,I., KAPLAN,J., YANG,R.-B., GARBERS,D.L., BIRD,A.C., MOORE,A.T. und HUNT,D.M. (1998);
Mutations in the retinal guanylate cyclase (*RETGC-1*) gene in dominant cone-rod dystrophy; *Hum.Molec.Genet.* **7**, 1179-1184.
- KOCH,K.-W. (1991);
Purification and identification of photoreceptor guanylate cyclase; *J.Biol.Chem.* **266**, 8634-8637.
- KOCH,K.-W. und STRYER,L. (1988);
Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions; *Nature* **334**, 64-66.
- KOCH,K.-W., STECHER,P. und KELLNER,R. (1994);
Bovine retinal rod guanyl cyclase represents a new N-glycosylated subtype of membrane-bound guanyl cyclases; *Eur.J.Biochem.* **222**, 589-595.
- KÖRSCHEN,H.G., BEYERMANN,M., MÜLLER,F., HECK,M., VANTLER,M., KOCH,K.-W., KELLNER,R., WOLFRUM,U., BODE,C., HOFMANN,K.P. und KAUPP,U.B. (1999);
Interaction of glutamic acid-rich proteins with components of the cGMP-signalling pathway in rod photoreceptors; *Nature* **400**, 761-766.
- KOESLING,D. und FRIEBE,A. (1999);
Soluble guanylate cyclase: Structure and regulation; *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* **135**, 41-65.
- KOIVUNEN,E., ARAP,W., RAJOTTE,D., LAHDENRANTA,J. und PASQUALINI,R. (1999);
Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries; *J.Nucl.Med.* **40**, 883-888.
- KOLLER,K.J., DE SAUVAGE,F.J., LOWE,D.G. und GOEDEL,D.V. (1992);
Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases; *Moll.Cell.Biol.* **12**, 2581-2590.
- KRISHNAN,A., GORACZNIAK,R.M., DUDA,T. und SHARMA,R.K. (1997);
Third calcium-modulated rod outer segment membrane guanylate cyclase transduction mechanism; *Mol.Cell.Biochem.* **178**, 251-259.
- KRYLOV,D.M., NIEMI,G.A., DIZHOOR,A.M. und HURLEY,J.B. (1999);
Mapping sites in guanylyl cyclase activating protein-1 required for regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases; *J.Biol.Chem.* **274**, 10833-10839.
- KÜHN,H. (1980);
Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes; *Nature* **283**, 587-589.
- KÜHN,H. und DREYER,W.J. (1972);
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP; *FEBS Lett.* **20**, 1-6.
- LABRECQUE,J., MC NICOLL,N., MARQUIS,M. und DE LÉAN,A. (1999);
A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction; *J.Biol.Chem.* **274**, 9752-9759.
- LAEMMLI,U.K. (1970);
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* **227**, 680-685.
- LAGNADO,L., CERVETTO,L. und McNAUGHTON,P.A. (1992);
Calcium homeostasis in the outer segments of retinal rods from the tiger salamander; *J.Physiol.* **455**, 111-142.
- LAMBRECHT,H.G. und KOCH,K.-W. (1991);
Phosphorylation of recoverin, the calcium-sensitive activator of photoreceptor guanylyl cyclase; *FEBS Lett.* **294**, 207-209.
- LAMBRECHT,H.G. und KOCH,K.-W. (1992);
Recoverin, a novel calcium-binding protein from vertebrate photoreceptors; *Biochim.Biophys.Acta* **1160**, 63-66.
- LAURA,R.P., DIZHOOR,A.M. und HURLEY,J.B. (1996);
The membrane guanylyl cyclase, retinal guanylyl cyclase-1, is activated through its intracellular domain; *J.Biol.Chem.* **271**, 11646-11651.

- LAURA,R.P. und HURLEY,J.B. (1998);
The kinase homology domain of retinal guanylyl cyclases 1 and 2 specifies the affinity and cooperativity of interaction with guanylyl cyclase activating protein-2; *Biochemistry* **37**, 11264-11271.
- LEBL,M. und KRCHNÁK,V. (1997);
Synthetic peptide libraries; *Meth.Enzymol.* **289**, 336-392.
- LEE,R.H., TING,T.D., LIEBERMAN,B.S., TOBIAS,D.E., LOLLEY,R.N. und HO,Y.K. (1992);
Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosducin and transducin; *J.Biol.Chem.* **267**, 25104-25112.
- LI,N., FARISS,R.N., ZHANG,K., OTTO-BRUC,A., HAESELEER,F., BRONSON,D., QIN,N., YAMAZAKI,A., SUBBARAYA,I., MILAM,A.H., PALCZEWSKI,K. und BAEHR,W. (1998);
Guanylate-cyclase-inhibitory protein is a frog retinal Ca^{2+} -binding protein related to mammalian guanylate-cyclase-activating proteins; *Eur.J.Biochem.* **252**, 591-599.
- LIPPO DE BÉCEMBERG,I., CORREA DE ADJOUNIAN,M.F., SÁNCHEZ DE VILLAROE,S., PEÑA DE AGUILAR,E., GONZÁLEZ DE ALFONZO,R. und ALFONZO,M. (1995);
G-protein sensitive guanylyl cyclase activity associated with plasma membranes; *Arch.Biochem.Biophys.* **324**, 209-215.
- LIU,X., SENO,K., NISHIZAWA,Y., HAYASHI,F., YAMAZAKI,A., MATSUMOTO,H., WAKABAYASHI,T. und USUKURA,J. (1994);
Ultrastructural localization of retinal guanylate cyclase in human and monkey retinas; *Exp.Eye Res.* **59**, 761-768.
- LIU,Y., RUOHO,A.E., RAO,V.D. und HURLEY,J.H. (1997);
Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: Modeling and mutational analysis; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 13414-13419.
- LÖFÄS,S. und JOHNSON,B. (1990);
A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands; *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1990**, 1526-1528.
- LOPEZ,M.J., WONG,S.K.-F., KISHIMOTO,I., DUBOIS,S., MACH,V., FRIESEN,J., GARBERS,D.L. und BEUVE,A. (1995);
Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide; *Nature* **378**, 65-68.
- LOWE,D.G., DIZHOOR,A.M., LIU,K., GU,Q., SPENCER,M., LAURA,R., LU,L. und HURLEY,J.B. (1995);
Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 5535-5539.
- MAKINO,E.R., HANDY,J.W., LI,T. und ARSHAVSKY,V.Y. (1999);
The GTPase activating factor for transducin in rod photoreceptors is the complex between RGS9 and type 5 G protein β subunit; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**, 1947-1952.
- MANDEL,M. und HIGA,A. (1970);
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection; *J.Mol.Biol.* **53**, 159-162.
- MANN,E.A., JUMP,M.L., WU,J., YEE,E. und GIANNELLA,R.A. (1997);
Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **239**, 463-466.
- MARGULIS,A., GORACZNAK,R.M., DUDA,T., SHARMA,R.K. und SITARAMAYYA,A. (1993);
Structural and biochemical identity of retinal rod outer segment membrane guanylate cyclase; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **194**, 855-861.
- MARGULIS,A., POZDNYAKOV,N. und SITARAMAYYA,A. (1996);
Activation of bovine photoreceptor guanylate cyclase by S100 proteins; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **218**, 243-247.
- MARTELL,A.E. und SMITH,R.M. (1974);
Critical stability constants, Vol.1; Plenum Press; New York, New York, USA.
- MASLAND,R.H. (1996);
Processing and encoding of visual information in the retina; *Curr.Opinion Neurobiol.* **6**, 467-474.
- MATTHEWS,H.R. (1996);
Static and dynamic actions of cytoplasmic Ca^{2+} in the adaptation of responses to saturating flashes in salamander rods; *J.Physiol.* **490**, 1-15.
- MATTHEWS,H.R., FAIN,G.L. und CORNWALL,M.C. (1996);
Role of cytoplasmic calcium concentration in the bleaching adaptation of salamander cone photoreceptors; *J.Physiol.* **490**, 293-303.
- McNAUGHTON,P.A. (1990);
Light response of vertebrate photoreceptors; *Physiol.Rev.* **70**, 847-883.

- MEYER, T.S. und LAMBERTS, B.L. (1965);
Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips; *Biochim.Biophys.Acta* **107**, 144-145.
- MISONO, K.S., SIVASUBRAMANIAN, N., BERKNER, K. und ZHANG, X. (1999);
Expression and purification of the extracellular ligand-binding domain of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor: Monovalent binding with ANP induces 2:2 complexes; *Biochemistry* **38**, 516-523.
- MOLDAY, R.S. (1998);
Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal degenerative diseases. The Friedenwald lecture; *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* **39**, 2493-2513.
- MOON, C., JABERI, P., OTTO-BRUC, A., BAEHR, W., PALCZEWSKI, K. und RONNETT, G.V. (1998);
Calcium-sensitive particulate guanylyl cyclase as a modulator of cAMP in olfactory receptor neurons; *J.Neurosci.* **18**, 3195-3205.
- MOU, H., GRAZIO, H.J., COOK, T.A., BEAVO, J.A. und COTE, R.H. (1999);
cGMP binding to noncatalytic sites on mammalian rod photoreceptor phosphodiesterase is regulated by binding of its γ and δ subunits; *J.Biol.Chem.* **274**, 18813-18820.
- MÜLLER, F. und KAUPP, U.B. (1998);
Signaltransduktion in Sehzellen; *Naturwissenschaften* **85**, 49-61.
- MURTHY, K.S., TENG, B., JIN, J. und MAKHLOUF, G.M. (1998);
G protein-dependent activation of smooth muscle eNOS via natriuretic peptide clearance receptor; *Am.J.Physiol.* **275**, C1409-C1416.
- MURTHY, K.S. und MAKHLOUF, G.M. (1999);
Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C); *J.Biol.Chem.* **274**, 17587-17592.
- NAKATANI, K., KOUTALOS, Y. und YAU, K.-W. (1995);
 Ca^{2+} -modulation of the cGMP-gated channel of bullfrog retinal rod photoreceptors; *J.Physiol.* **484**, 69-76.
- NIKONOV, S., ENGHETA, N. und PUGH, E.N. (1998);
Kinetics of recovery of the dark adapted salamander photoresponse; *J.Gen.Physiol.* **111**, 7-37.
- OLSHEVSKAYA, E.V., HUGHES, R.E., HURLEY, J.B. und DIZHOOR, A.M. (1997);
Calcium binding, but not a calcium-myristoyl switch, controls the ability of guanylyl cyclase-activating protein GCAP-2 to regulate photoreceptor guanylate cyclase; *J.Biol.Chem.* **272**, 14327-14333.
- OLSHEVSKAYA, E.V., BOIKOV, S., ERMILOV, A., KRYLOV, D., HURLEY, J.B. und DIZHOR, A.M. (1999);
Mapping functional domains of the guanylate cyclase regulator protein, GCAP-2; *J.Biol.Chem.* **274**, 10823-10832.
- OTTO-BRUC, A.E., FARISS, R.N., HAESELEER, F., HUANG, J., BUCZYLO, J., SURGUCHEVA, I., BAEHR, W., MILAM, A.H. und PALCZEWSKI, K. (1997a);
Localization of guanylate cyclase-activating protein 2 in mammalian retinas; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 4727-4732.
- OTTO-BRUC, A.E., BUCZYLO, J., SURGUCHEVA, I., SUBBARAYA, I., RUDNICKA-NAWROT, M., CRABB, J.W., ARENDT, A., HARGRAVE, P.A., BAEHR, W. und PALCZEWSKI, K. (1997b);
Functional reconstitution of photoreceptor guanylate cyclase with native and mutant forms of guanylate cyclase-activating protein 1; *Biochemistry* **36**, 4295-4302.
- OTTO-BRUC, A.E., FARISS, R.N., VAN HOOSER, P.J. und PALCZEWSKI, K. (1998);
Phosphorylation of photolyzed rhodopsin is calcium-insensitive in retina permeabilized by α -toxin; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 15014-15019.
- PALCZEWSKI, K., SUBBARAYA, I., GORCZYCA, W.A., HELEKAR, B.S., RUIZ, C.C., OHGURO, H., HUANG, J., ZHAO, X., CRABB, J.W., JOHNSON, R.S., WALSH, K.A., GRAY-KELLER, M.P., DETWILER, P.B. und BAEHR, W. (1994);
Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein; *Neuron* **13**, 395-404.
- PANNBACKER, R.G. (1973);
Control of guanylate cyclase activity in the rod outer segment; *Science* **182**, 1138-1140.
- PERLMAN, I. und NORMAN, R.A. (1998);
Light adaptation and sensitivity controlling mechanisms in vertebrate photoreceptors; *Prog.Retinal Eye Res.* **17**, 523-563.
- PERRAULT, I., ROZET, J.M., CALVAS, P., GERBER, S., CAMUZAT, A., DOLLFUS, H., CHÂTELIN, S., SOUÏED, E., GHAZI, I., LEOWSKI, C., BONNEMAISON, M., LE PASLIER, D., FRÉZAL, J., DUFIER, J.-L., PITTLER, S., MUNNICH, A. und KAPLAN, J. (1996);
Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis; *Nat.Genetics* **14**, 461-463.

- POTTER, L.R. und HUNTER, T. (1998a);
Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor; *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2164-2172.
- POTTER, L.R. und HUNTER, T. (1998b);
Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor; *J. Biol. Chem.* **273**, 15533-15539.
- POZDNYAKOV, N., GORACZNAK, R., MARGULIS, A., DUDA, T., SHARMA, R.K., YOSHIDA, A. und SITARAMAYYA, A. (1997);
Structural and functional characterization of retinal calcium-dependent guanylate cyclase activator protein (CD-GCAP): Identity with S100 β protein; *Biochemistry* **36**, 14159-14166.
- PUGH, E.N. und LAMB, T.D. (1993);
Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction; *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 111-149.
- REBRIK, T.I. und KORENBROT, J.I. (1998);
In intact cone photoreceptors, a Ca²⁺-dependent, diffusible factor modulates the cGMP-gated ion channel differently than in rods; *J. Gen. Physiol.* **112**, 537-548.
- RINK, H. (1987);
Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin; *Tetrahedron Lett.* **28**, 3787-3790.
- RODI, D.J. und MAKOWSKI, L. (1999);
Phage-display technology - finding a needle in a vast molecular haystack; *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 87-93.
- ROST, B. (1996);
PHD: Predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks; *Meth. Enzymol.* **266**, 525-539.
- RUDNICKA-NAWROT, M., SURGUCHEVA, I., HULMES, J.D., HAESELEER, F., SOKAL, I., CRABB, J.W., BAEHR, W. und PALCZEWSKI, K. (1998);
Changes in biological activity and folding of guanylate cyclase-activating protein as a function of calcium; *Biochemistry* **37**, 248-257.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. und EHRLICH, H. (1988);
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase; *Science* **239**, 487-491.
- SAGOO, M.S. und LAGNADO, L. (1996);
The action of cytoplasmic calcium on the cGMP-activated channel in salamander rod photoreceptors; *J. Physiol.* **497**, 309-319.
- SAGOO, M.S. und BAYLOR, D.A. (1997);
G-protein deactivation is rate-limiting for shut-off of the phototransduction cascade; *Nature* **389**, 392-395.
- SAMPATH, A.P., MATTHEWS, H.R., CORNWALL, M.C. und FAIN, G.L. (1998);
Bleached pigment produces a maintained decrease in outer segment Ca²⁺ in salamander rods; *J. Gen. Physiol.* **111**, 53-64.
- SAMPATH, A.P., MATTHEWS, H.R., CORNWALL, M.C., BANDARCHI, J. und FAIN, G.L. (1999);
Light-dependent changes in outer segment free-Ca²⁺ concentration in salamander cone photoreceptors; *J. Gen. Physiol.* **113**, 267-277.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A.R. (1977);
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SCHOENEMAKERS, T.J., VISSER, G.J., FLIK, G. und THEUVENET, A.P. (1992);
CHELATOR: An improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions; *BioTechniques* **12**, 870-879.
- SCHNETKAMP, P.P.M. und DAEHMEN, F.J.M. (1982);
Isolation and characterization of osmotically sealed bovine rod outer segments; *Meth. Enzymol.* **81**, 110-116.
- SCHREM, A., LANGE, C., BEYERMANN, M. und KOCH, K.-W. (1999);
Identification of a domain in guanylyl cyclase-activating protein 1 that interacts with a complex of guanylyl cyclase and tubulin in photoreceptors; *J. Biol. Chem.* **274**, 6244-6249.
- SCHULZ, S., SINGH, S., BELLET, R.A., SINGH, G., TUBB, D.J., CHIN, H. und GARBERS, D.G. (1989);
The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family; *Cell* **58**, 1155-1162.
- SCHULZ, S., GREEN, C.K., YUEN, P.S.T. und GARBERS, D.L. (1990);
Guanylyl Cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor; *Cell* **63**, 941-948.
- SCHULZ, S., WEDEL, B.J., MATTHEWS, A. und GARBERS, D.L. (1998);
The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor; *J. Biol. Chem.* **273**, 1032-1037.

- SCHULZ, S. und WALDMAN, S.A. (1999);
The guanylyl cyclase family of natriuretic peptide receptors; *Vitam.Horm.* **57**, 123-151.
- SCHWARTZ, R.M. und DAYHOFF, M.O. (1978);
in: *Atlas of protein sequence and structure*, Vol.5, suppl.3, 353-358; Nat.Biomed.Res.Found.; Washington D.C., USA.
- SEEBACHER, T., BEITZ, E., KUMAGAMI, H., WILD, K., RUPPERSBERG, J.P. und SCHULTZ, J.E. (1999);
Expression of membrane-bound and cytosolic guanylyl cyclases in the rat inner ear; *Hear.Res.* **127**, 95-102.
- SENIN, I.I., DEAN, K.R., ZARGAROV, A.A., AKHTAR, M. und PHILIPPOV, P.P. (1997);
Recoverin inhibits the phosphorylation of dark-adapted rhodopsin more than that of bleached rhodopsin: A possible mechanism through which rhodopsin kinase is prevented from participation in a side reaction; *Biochem.J.* **321**, 551-555.
- SENO, K., KISHIGAMI, A., IHARA, S., MAEDA, T., BONDARENKO, V.A., NISHIZAWA, Y., USUKARA, J., YAMAZAKI, A. und HAYASHI, F. (1998);
A possible role of RGS9 in phototransduction. A bridge between the cGMP-phosphodiesterase system and the guanylyl cyclase system; *J.Biol.Chem.* **273**, 22169-22172.
- SHUSTA, E.V., VANANTWERP, J. und WITTRUP, K.D. (1999);
Biosynthetic polypeptide libraries; *Curr.Opin.Biotechnol.* **10**, 117-122.
- SHYJAN, A.W., DE SAUVAGE, F.J., GILLET, N.A., GOEDEL, D.V. und LOWE, D.G. (1992);
Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase; *Neuron* **9**, 727-737.
- SIMONDS, W.F. (1999);
G protein regulation of adenylate cyclase; *Trends Pharmacol.Sci.* **20**, 66-73.
- SINGH, S., LOWE, D.G., THORPE, D.S., RODRIGUEZ, H., KUANG, W.-J., DANGOTT, L.J., CHINKERS, M., GOEDEL, D.V. und GARBERS, D.L. (1988);
Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases; *Nature* **334**, 708-712.
- SJÖLANDER, S. und URBANICZKY, C. (1991);
Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis; *Anal.Chem.* **63**, 2338-2345.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J. und KLENK, D.C. (1985);
Measurement of protein using bicinchoninic acid; *Anal.Biochem.* **150**, 76-85.
- SOKAL, I., HAESELEER, F., ARENDT, A., ADMAN, E.T., HARGRAVE, P.A. und PALCZEWSKI, K. (1999a);
Identification of a guanylyl cyclase-activating protein-binding site within the catalytic domain of retinal guanylyl cyclase; *Biochemistry* **38**, 1387-1393.
- SOKAL, I., OTTO-BRUC, A.E., SURGUCHEVA, I., VERLINDE, C.L.M.J., WANG, C.-K., BAEHR, W. und PALCZEWSKI, K. (1999b);
Conformational changes in guanylyl cyclase-activating protein 1 (GCAP1) and its tryptophan mutants as a function of calcium concentration; *J.Biol.Chem.* **274**, 19829-19837.
- STENBERG, E., PERSSON, B., ROOS, H. und URBANICZKY, C. (1991);
Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins; *J.Colloid Interface.Sci.* **143**, 513-526.
- STRYER, L. (1988);
Molecular basis of visual excitation; *Cold Spring Harbor Symposia Quant.Biol.* **LIII**, 283-294.
- STULTS, J.T., O'CONNELL, K.L., GARCIA, C., WONG, S., ENGEL, A.M., GARBERS, D.L. und LOWE, D.G. (1994);
The disulfide linkages and glycosylation sites of the human natriuretic peptide receptor-C homodimer; *Biochemistry* **33**, 11372-11381.
- SUN, H. und NATHANS, J. (1997);
Stargardt's ABCR is localized to the disc membrane of retinal rod outer segments; *Nature Genet.* **17**, 15-16.
- SUNAHARA, R.K., BEUVE, A., TESMER, J.J.G., SPRANG, S.R., GARBERS, D.L. und GILMAN, A.G. (1998);
Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases; *J.Biol.Chem.* **273**, 16332-16338.
- TAUSSIG, R. und GILMAN, A.G. (1995);
Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases; *J.Biol.Chem.* **270**, 1-4.
- TESMER, J.G., SUNAHARA, R.G., GILMAN, A.G. und SPRANG, S.R. (1997);
Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with $G_{s\alpha}$ -GTP γ S; *Science* **278**, 1907-1916.

- THOMPSON, D.K. und GARBERS, D.L. (1995);
Dominant negative mutations of the guanylyl cyclase-A receptor. Extracellular domain deletion and catalytic domain point mutations; *J.Biol.Chem.* **270**, 425-430.
- TOWBIN, H., STAHLIN, T. und GORDON, J. (1979);
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**, 4350-4354.
- TSIEN, R. und POZZAN, T. (1989);
Measurement of cytosolic free Ca^{2+} with Quin2; *Meth.Enzymol.* **172**, 230-262.
- TUCKER, C.L., LAURA, R.P. und HURLEY, J.B. (1997);
Domain-specific stabilization of photoreceptor membrane guanylyl cyclase by adenine nucleotides and guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs); *Biochemistry* **36**, 11995-12000.
- TUCKER, C.L., HURLEY, J.H., MILLER, T.R. und HURLEY, J.B. (1998);
Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 5993-5997.
- VENKATARAMAN, V., DUDA, T. und SHARMA, R.K. (1998);
The $\alpha_{2A/D}$ -adrenergic receptor-linked membrane guanylate cyclase: A new signal transduction system in the pineal gland; *FEBS Lett.* **427**, 69-73.
- VIDAL, M. und LEGRAIN, P. (1999);
Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems; *Nucl.Acids Res.* **27**, 919-929.
- WADA, A., HASEGAWA, M., MATSUMOTO, K., NIIDOME, T., KAWANO, Y., HIDAKA, Y., PADILLA, P.I., KURAZONO, H., SHIMONISHI, Y. und HIRAYAMA, T. (1996);
The significance of Ser1029 of the heat-stable enterotoxin receptor (STaR): Relation of STa-mediated guanylyl cyclase activation and signaling by phorbol myristate acetate; *FEBS Lett.* **384**, 75-77.
- WÄSSLE, H. und BOYCOTT, B.B. (1991);
Functional architecture of the mammalian retina; *Physiol.Rev.* **71**, 447-480.
- WALD, G. (1968);
The molecular basis of visual excitation; *Nature* **219**, 800-807.
- WELFORD, K. (1991);
Surface plasmon-polaritons and their uses; *Opt.Quant.Electronics* **23**, 1-27.
- WIESNER, B., WEINER, J., MIDDENDORFF, R., HAGEN, V., KAUPP, U.B. und WEYAND, I. (1998);
Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm; *J.Cell Biol.* **142**, 473-484.
- WILDEN, U., HALL, S.W. und KÜHN, H. (1986);
Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **83**, 1174-1178.
- WILSON, E.M. und CHINKERS, M. (1995);
Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization; *Biochemistry* **34**, 4696-4701.
- WOLBRING, G., BAEHR, W., PALCZEWSKI, K. und SCHNETKAMP, P.P.M. (1999);
Light inhibition of bovine retinal rod guanylyl cyclase mediated by $\beta\gamma$ -Transducin; *Biochemistry* **38**, 2611-2616.
- WRAY, W., BOULIKAS, T., WRAY, V.P. und HANCOCK, R. (1981);
Silver staining of proteins in polyacrylamide gels; *Anal.Biochem.* **118**, 197-203.
- YAMAZAKI, A., BONDARENKO, V.A., DUA, S., YAMAZAKI, M., USUKURA, J. und HAYASHI, F. (1996);
Possible stimulation of retinal rod recovery to dark state by cGMP release from a cGMP phosphodiesterase noncatalytic site; *J.Biol.Chem.* **271**, 32495-32498.
- YANG, R.-B., FOSTER, D.C., GARBERS, D.L. und FÜLLE, H.-J. (1995);
Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 602-606.
- YANG, R.-B., FÜLLE, H.-J. und GARBERS, D.L. (1996);
Chromosomal localization and genomic organization of genes encoding guanylyl cyclase receptors expressed in olfactory sensory neurons and retina; *Genomics* **31**, 367-372.
- YANG, R.-B. und GARBERS, D.L. (1997);
Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers; *J.Biol.Chem.* **272**, 13738-13742.
- YANG, R.-B., ROBINSON, S.W., XIONG, W.-H., YAU, K.-W., BIRCH, D.G. und GARBERS, D.L. (1999);
Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behaviour; *J.Neurosci.* **19**, 5889-5897.

-
- YAU,K.W. (1994)
Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald lecture; Invest.Ophtalmol.Vis.Sci. **35**, 9-32.
 - YOSHIDA,T., WILLARDSON,B.M., WILKINS,J.F., JENSEN,G.J., THORNTON,B.D. und BITENSKY,M.W. (1994);
The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin; J.Biol.Chem. **269**, 24050-24057.
 - YU,S., AVERY,L., BAUDE,E. und GARBERS,D.L. (1997);
Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: A new family of chemosensory receptors;
Proc.Natl.Acad.Sci.USA **94**, 3384-3387.
 - YUEN,P.S.T., DOOLITTLE,L.K. und GARBERS,D.L. (1994);
Dominant negative mutants of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase; J.Biol.Chem. **269**, 791-793.
 - ZHANG,G., LIU,Y., RUOHO,A.E. und HURLEY,J.H. (1997);
Structure of the adenylyl cyclase catalytic core; Nature **386**, 247-253.
 - ZOCHÉ,M., BIENERT,M., BEYERMANN,M. und KOCH,K.-W. (1996);
Distinct molecular recognition of calmodulin-binding sites in the neuronal and macrophage nitric oxide synthases: A surface plasmon resonance study; Biochemistry **35**, 8742-8747.

Anhang

A Der Ein-Buchstabenkode für Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

B Die Primärstruktur der ROS-GC1

Im folgenden wird die abgeleitete Aminosäuresequenz der ROS-GC1 aus dem Rind gezeigt (GenBank accession number U77095; SHARMA et al., 1994; JOHNSTON et al., 1997).

```

MTACTFLAGGLRDFGLCGFTRWAPSFPGLPFIPFRRLRLRFPLLLLLLLPKSVLSAVFTVGLGPWACDPIFARARPD 80
AARLAASRLNHAAALEGGPRFEVALLPEPCRTPGSLGAVSSALTRVSGLVGPVNPAACRPAELLAQEAGVALVPWGPCGT 160
RAAGTTAPVVTAPADALYALLRAFRWAHVALVTAPQDLWVEAGHALSTALRARGLPVALVTSMEPSDLSGAREALRRVQD 240
GPRVRVIMVMHSLVLLGGEQRCLEAAEELGLADGSLVFLPFDTLHYALSPGPDALAVLANSSQLRKAHDAVLTLTRHC 320
PLGGSVRDSLRRQAQEHRELPLDLNLQQVSPFLFGTIYDSVFLLAGGVARARVAAGGGWVSGAAVARHIRDARVPGFCGALG 400
GAEEPSFVLDDTDATGDQLFATYVLDPTQGGFFHSAGTPVHFPGKGRGPGDPSCWFDPDTCNGGVEPSVVFIFGLLVVG 480
MGLAGAFLAHYCRHRLLIHQMVSGPNKIILTLDITFLHPHGGNSRKVAQGSRTSLAARSISDVRSIHSQLPDYTNIGLY 560
EGDWVWLKKFPGDRHTAIRPATKMAFSKIRELRHENVALYLGFLAGGAGGPAAPGEGVLAVVSEHCARGSLQDLLAQRD 640
IKLDWMFKSSLLLDLIKIRYLHHRGVAHGRRLKSRNCVVDGRFVLKVDHGHGRLLQAQVLPPEPPSAEDQLWTAPELLR 720
DPVLERRGTLAGDVFSLGIIMQEVVCRSAPYAMLELTPEEVVKRVQSPPLCRPSVSIDQAPMECIQLMKQCWAEQPELR 800
PSMDRTFELEFKSINKGRKMNIIDSMLRMLEQYSSNLEDLIRERTEELEKQKTDRLITQMLPPSVAEALKMGTPVEPEY 880
FEEVTLYFSDIVGFTTISAMSEPIEVVDLLNDLYTLFDALIGSHDVYKVTIGDAYMVASGLPQRNGHRHAAEIANMALD 960
ILSAVGTFMRMHMPEVPVRIRIGLHSGPCVAGVGLTMPRYCLFGDVTNTASRMESTGLPYRIHVNRSTVQILSALNEGF 1040
LTEVRGRTELKKGKAAETWLVGRRGFNKP IKPPDLQPGASNHGISELHEIPDRRQKLEKARPGQFSGK 1110

```

Die 56 AS des N-terminalen Signalpeptides, das bei der Prozessierung des Proteins abgespalten wird, sind grau gedruckt. Die putative Transmembrandomäne ist unterstrichen. Die Sequenzbereiche, die auf die Peptidbibliothek (→ Anhang D.1) abgebildet wurden, sind schwarz unterlegt.

C DNA-Primer

C.1 cDNA-Sequenz von GCAP-1 und Hybridisierungsbereiche der Primer #1940 und #1941

Im folgenden wird die Sequenz des cDNA-Klons GCAP(5) (FRINS et al., 1996) mit den Hybridisierungsbereichen der Primer #1940 und #1941 gezeigt. Die Nukleotide in der Sequenz werden durch die Anfangsbuchstaben ihrer Basen bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin). Die Sequenzen der Primer #1940 und #1941 sind kursiv gedruckt. Hybridisierende Nukleotide werden in Großbuchstaben angegeben, nicht-hybridisierende Nukleotide in Kleinbuchstaben. Das Startkodon (Position 1) und das Stopkodon für GCAP-1 sind fett gedruckt, das zusätzlich eingefügte Stopkodon ist grau unterlegt. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

5' - CAGGgaTccaCc**ATG**

-77 5' - CCAGCCGCGCTGGTGTGGGGACCAGCGGTGAAAAGAACCGGTCCCCCTTGGGCATCAGCCTCCCGCAGGCCTGAGCG**ATG**
 3' - GGTCGGCGCGACCACACCCCTGGTCGCCACTTTTCTTGCCAGGGGAACCCGTAGTCGGAGGGCGTCCGGACTCGCTAC

GGGAACATTATGGAC-3' (#1941)

4 GGGAACATTATGGACGGTAAGTCGGTGGAGGAGCTGAGCAGCACCGAGTGCCACCAGTGGTACAAGAAGTTCATGACAGAC
 CCTTGTAATACCTGCCATTACGCCACCTCCTCGACTCGTCGTGGCTCACGGTGGTCACCATGTTCTTCAAGTACTGTCT

84 GTGCCCCCTCCGGCCAGCTCACCTCTACGAGTTCGGCCAGTTCTTCGGCCTCAAGAACCTGAGCCCGTGGGCCAGCCAGT
 CACGGGGAGGCCGGTCGAGTGGGAGATGCTCAAGCGGGTCAAGAAGCCGGAGTTCCTGGACTCGGGCACCCGGTCGGTCA

164 ACGTGGAGCAGATGTTTGAGACCTTTGACTTCAACAAAGACGGCTACATTGATTTTCATGGAGTACGTGGCGGCTCTGAGC
 TGCACTCGTCTACAACTCTGGAACTGAAGTTGTTTCTGCCGATGTAAGTAAAGTACCTCATGCACCGCCGAGACTCG

244 CTGGTCTCAAGGGGAAGTGGAACAGAAGCTGCGTTGGTACTTCAAGCTCTACGACGTGGACGGCAACGGATGCATCGA
 GACCAGGAGTTCCCTTCCACCTTGTTCTCGACGCAACCATGAAGTTTCGAGATGCTGCACCTGCCCTTGCTACGTAGCT

324 CCGCGACGAGCTGCTCACCATCATCCGGGCCATCCGAGCCATTAACCCCTGCAGCGACTCGACCATGACCGCCGAGGAGT
 GCGCTGCTCGACGAGTGGTAGTAGGCCCGGTAGGCTCGGTAATTGGGGACGTCGCTGAGCTGGTACTGGCGGCTCCTCA

404 TCACCGATACAGTGTCTCCAAGATTGACGTCAATGGGGATGGGGAAGTCTCCCTAGAGGAGTTCATGGAGGGCGTCCAG
 AGTGGCTATGTCAAGAGGTTCTAAGTCAGTTACCCCTACCCCTTGAGAGGATCTCCTCAAGTACCTCCCGCAGGTC

484 AAGGACCAGATGCTCTTGACACGCTGACCCGAAGCTTGGACCTTACCCGATTTGTGCGCAGGCTCCAGAATGGAGAGCA
 TTCTTGCTTACGAGAACCTGTGCGACTGGGCTTCGAACCTGGAATGGGCGTAACACGCGTCCGAGGTCTTACCTCTCGT

564 GGATGAGGAGGGGCTAGCGGCAGGGAAACGGAGGCCGCGGAGGCCGACGGCT**GAG**CTCACTGCCTACTCTTTCTGTACT-3'
 CCTACTCTCCCCCGATCGCCGTCCCTTTGCCTCCGGCGCTCCGGCTGCCACTCGAGTGACGGATGAGAAAGACATGA-5'

3' - GCGCCTCCGGCTGCCGACTatctTaAgGGA-5' (#1940)

C.2 Sequenzierprimer

M13 Uni 5' - GTAAAACGACGGCCAGT-3'

#9001 5' - AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'

M13 Rev 5' - CAGGAAACAGCTATGAC-3'

#9002 5' - TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Alle angegebenen Sequenzierprimer hybridisieren in der Polylinkerregion des Plasmidvektors pBluescript SK(-). Die Primer #9001 und #9002 sind mit dem Fluorophor IRD800 (MWG BIOTECH) markiert.

D Die Sequenzen der eingesetzten Peptide

Die Sequenzen der Peptide sind von links nach rechts vom N- zum C-Terminus notiert. Ac- steht für eine N-terminale Acetylgruppe, -NH₂ für eine C-terminale Amidgruppe.

D.1 Die Peptidbibliothek

# 1	Ac-RHRLHLHIQMVSG-NH ₂	#49	Ac-IRELRHENVALY-NH ₂
# 2	Ac-RLHLHIQMVSGPN-NH ₂	#50	Ac-ELRHENVALYLG-NH ₂
# 3	Ac-LHIQMVSGPNKI-NH ₂	#51	Ac-RHENVALYLGLF-NH ₂
# 4	Ac-IQMVSGPNKIIL-NH ₂	#52	Ac-ENVALYLGLFLA-NH ₂
# 5	Ac-MVSGPNKIILTL-NH ₂	#53	Ac-VALYLGLFLAGG-NH ₂
# 6	Ac-SGPNKIILTLDD-NH ₂		
# 7	Ac-PNKIILTLDDIT-NH ₂	#54	Ac-RPSMDRTFELFK-NH ₂
# 8	Ac-KIILTLDDITFL-NH ₂	#55	Ac-SMDRTFELFKSI-NH ₂
# 9	Ac-ILTLDITFLHP-NH ₂	#56	Ac-DRTFELFKSINK-NH ₂
#10	Ac-TLDDITFLHPHG-NH ₂	#57	Ac-TFELFKSINKGR-NH ₂
#11	Ac-DDITFLHPHGGN-NH ₂	#58	Ac-ELFKSINKGRKM-NH ₂
#12	Ac-ITFLHPHGGNSR-NH ₂	#59	Ac-FKSINKGRKMNI-NH ₂
#13	Ac-FLHPHGGNSRKV-NH ₂	#60	Ac-SINKGRKMNIID-NH ₂
#14	Ac-HPHGGNSRKVAQ-NH ₂	#61	Ac-NKGRKMNIIDSM-NH ₂
#15	Ac-HGGNSRKVAQGS-NH ₂	#62	Ac-GRKMNIIDSMRL-NH ₂
#16	Ac-GNSRKVAQGSRT-NH ₂	#63	Ac-KMNIIDSMRLML-NH ₂
#17	Ac-SRKVAQGSRTSL-NH ₂	#64	Ac-NIIDSMRLMLEQ-NH ₂
#18	Ac-KVAQGSRTSLAA-NH ₂	#65	Ac-IDSMRLMLEQYS-NH ₂
#19	Ac-AQGSRTSLAARS-NH ₂	#66	Ac-SMLRMLEQYSSN-NH ₂
#20	Ac-GSRTSLAARSIS-NH ₂	#67	Ac-LRMLEQYSSNLE-NH ₂
#21	Ac-RTSLAARSISDV-NH ₂	#68	Ac-MLEQYSSNLEDL-NH ₂
#22	Ac-SLAARSISDVRS-NH ₂	#69	Ac-EQYSSNLEDLIR-NH ₂
#23	Ac-AARSISDVRSIH-NH ₂	#70	Ac-YSSNLEDLIRER-NH ₂
#24	Ac-RSISDVRSIHSQ-NH ₂	#71	Ac-SNLEDLIRERTE-NH ₂
#25	Ac-ISDVRSIHSQLP-NH ₂	#72	Ac-LEDLIRERTEEL-NH ₂
#26	Ac-DVRSIHSQLEPDY-NH ₂	#73	Ac-DLIRERTEELEL-NH ₂
#27	Ac-RSIHSQLEPDYTN-NH ₂	#74	Ac-IRERTEELELEK-NH ₂
#28	Ac-IHSQLEPDYTNIG-NH ₂	#75	Ac-ERTEELELEKQK-NH ₂
#29	Ac-SQLEPDYTNIGLY-NH ₂	#76	Ac-TEELELEKQKTD-NH ₂
#30	Ac-LPDYTNIGLYEG-NH ₂	#77	Ac-ELELEKQKTDRL-NH ₂
#31	Ac-DYTNIGLYEGDW-NH ₂	#78	Ac-ELEKQKTDRLLT-NH ₂
#32	Ac-TNIGLYEGDWVW-NH ₂	#79	Ac-EKQKTDRLLTQM-NH ₂
#33	Ac-IGLYEGDWVWLK-NH ₂	#80	Ac-QKTDRLLTQMLP-NH ₂
#34	Ac-LYEGDWVWLKKF-NH ₂		
#35	Ac-EGDWVWLKKFPG-NH ₂	#81	Ac-DLQPGASNHGIS-NH ₂
#36	Ac-DWVWLKKFPGDR-NH ₂	#82	Ac-QPGASNHGISLH-NH ₂
#37	Ac-VWLKKFPGDRHI-NH ₂	#83	Ac-GASNHGISLHEI-NH ₂
#38	Ac-LKKFPGDRHIAI-NH ₂	#84	Ac-SNHGISLHEIPP-NH ₂
#39	Ac-KFPGDRHIAIRP-NH ₂	#85	Ac-HGISLHEIPPDR-NH ₂
#40	Ac-PGDRHIAIRPAT-NH ₂	#86	Ac-ISLHEIPPDRRQ-NH ₂
#41	Ac-DRHIAIRPATKM-NH ₂	#87	Ac-LHEIPPDRRQKL-NH ₂
#42	Ac-HIAIRPATKMAF-NH ₂	#88	Ac-EIPPDRRQKLEK-NH ₂
#43	Ac-AIRPATKMAFSK-NH ₂	#89	Ac-PPDRRQKLEKAR-NH ₂
#44	Ac-RPATKMAFSKIR-NH ₂	#90	Ac-DRRQKLEKARPG-NH ₂
#45	Ac-ATKMAFSKIREL-NH ₂	#91	Ac-RQKLEKARPGQF-NH ₂
#46	Ac-KMAFSKIRELRH-NH ₂	#92	Ac-KLEKARPGQFSG-NH ₂
#47	Ac-AFSKIRELRHEN-NH ₂		
#48	Ac-SKIRELRHENVA-NH ₂		

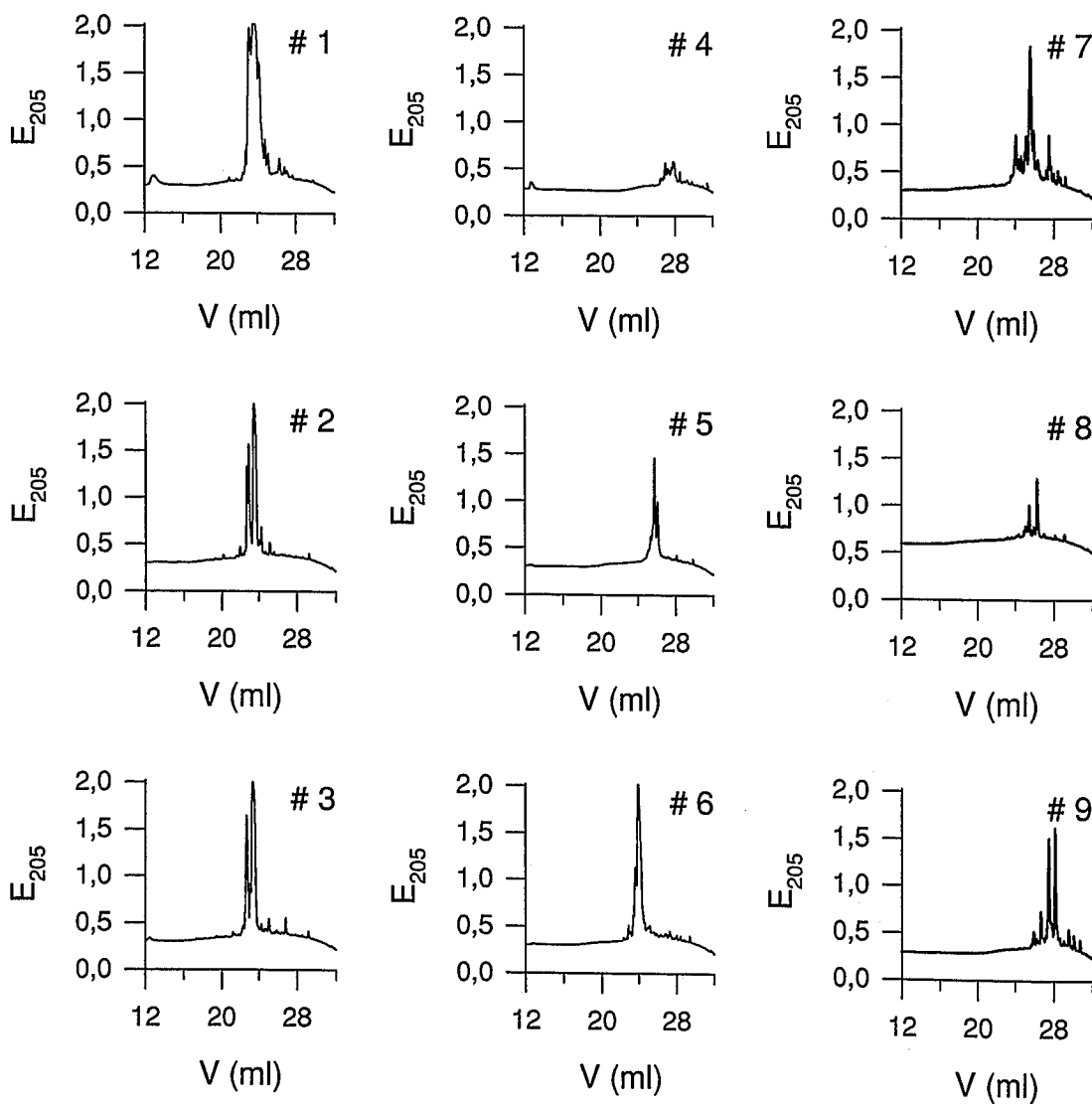
D.2 Weitere eingesetzte Peptide

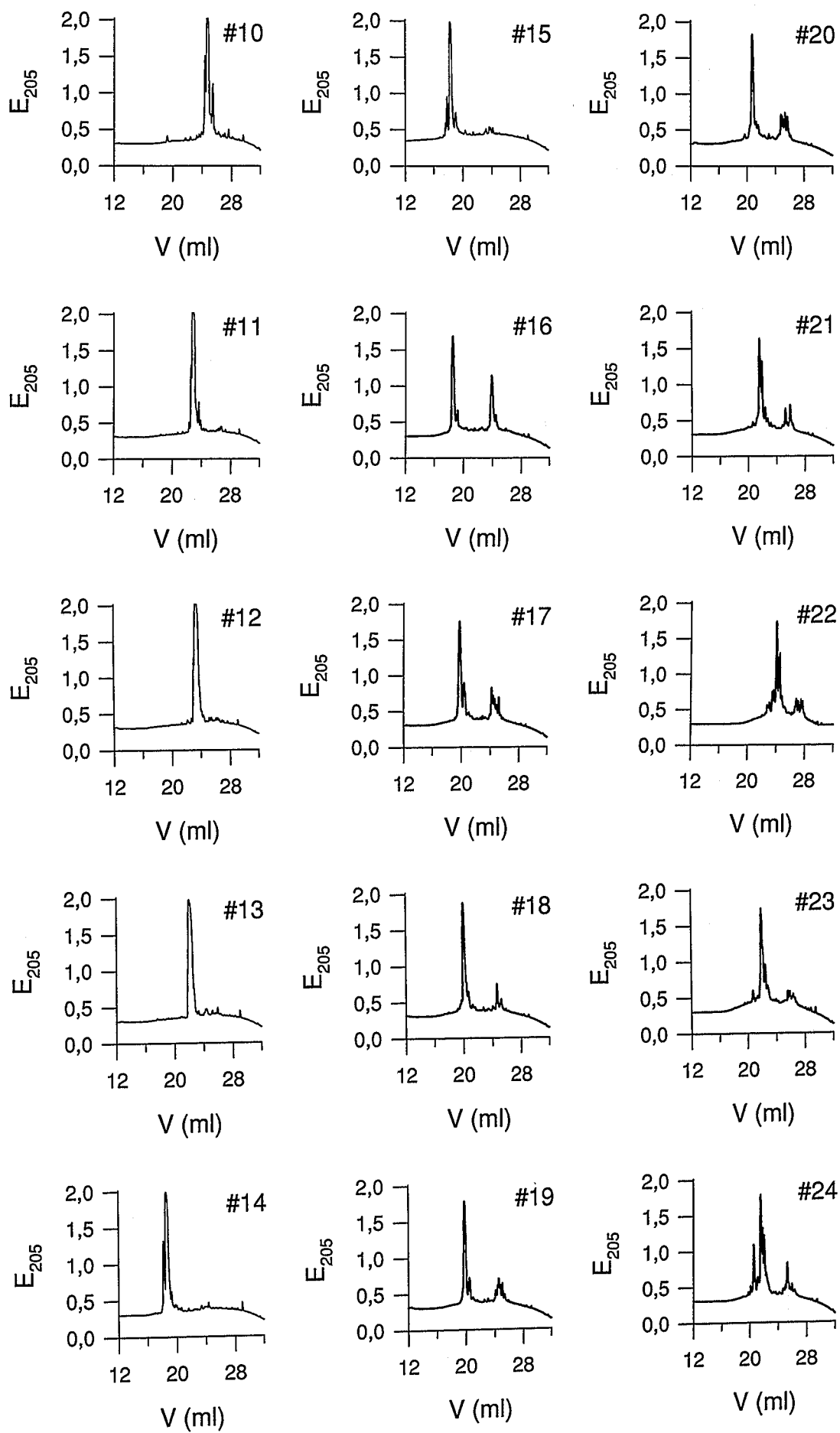
3a LHIQMVSGPNKIILTLDDIT-NH₂
CG-# 3a CGLHIQMVSGPNKIILTLDDIT-NH₂

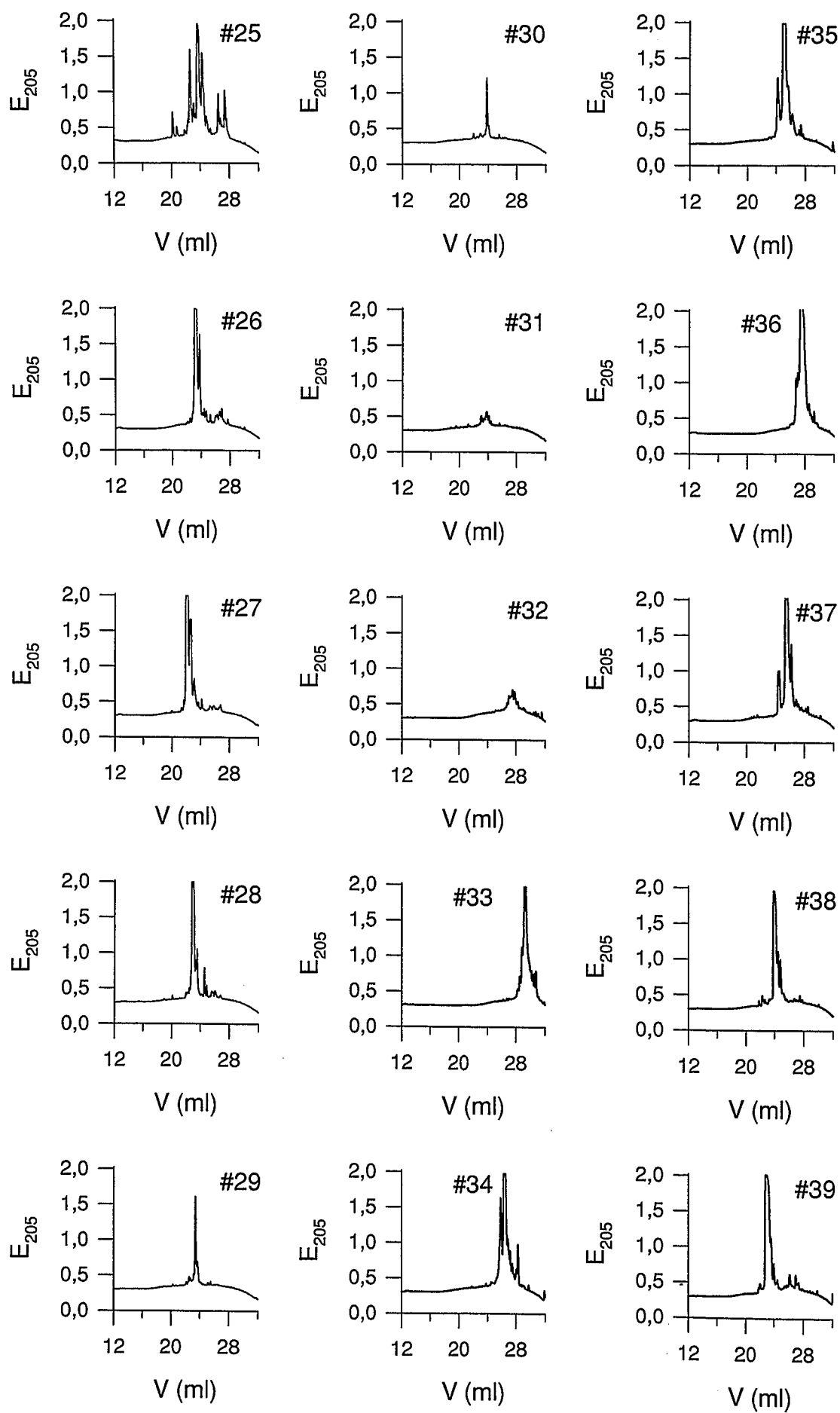
#34a LYEGDWVWLKKFPGDRHIAI-NH₂
CG-#34a CGLYEGDWVWLKKFPGDRHIAI-NH₂

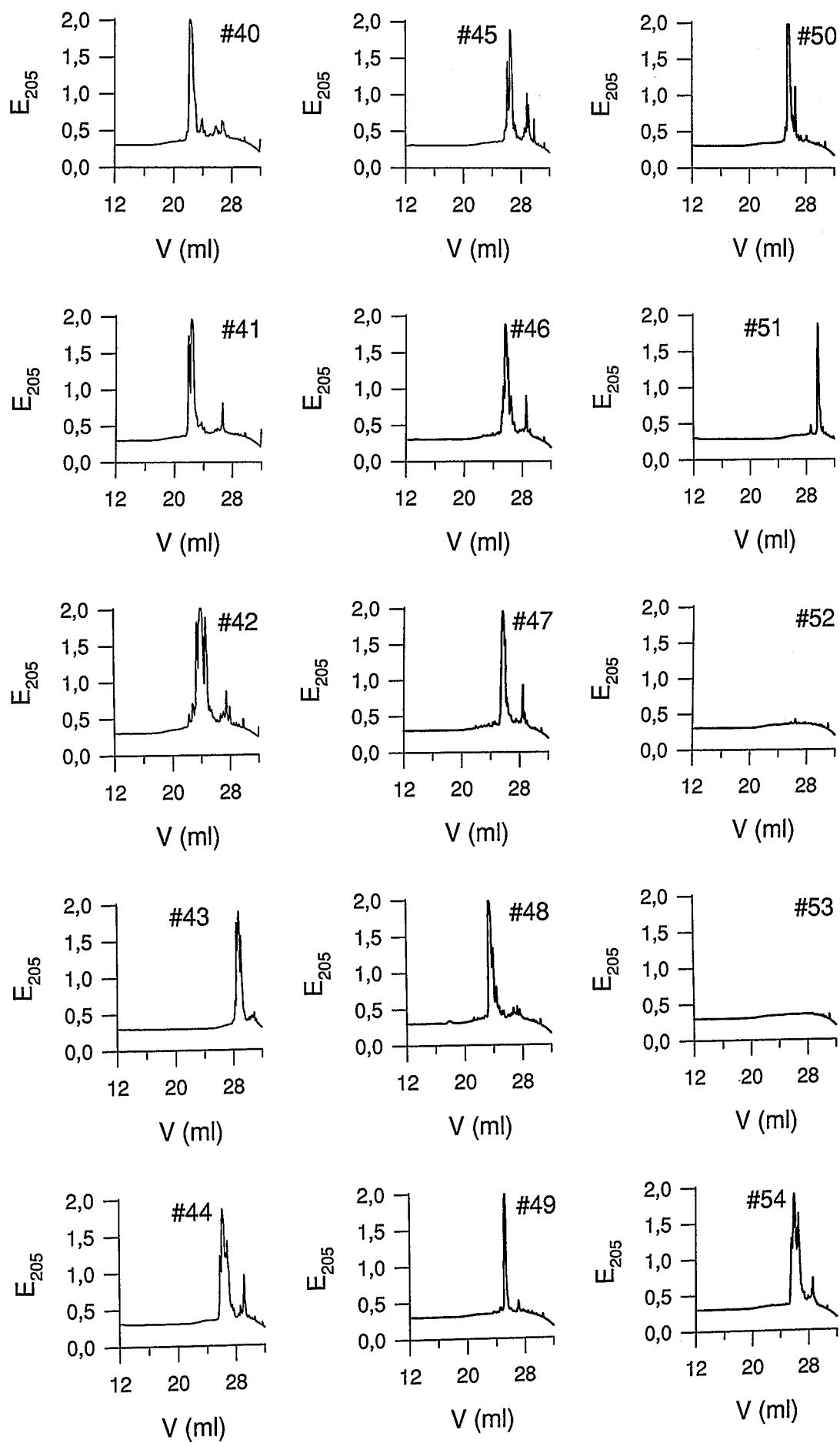
E Charakterisierung der Peptide aus der Peptidbibliothek

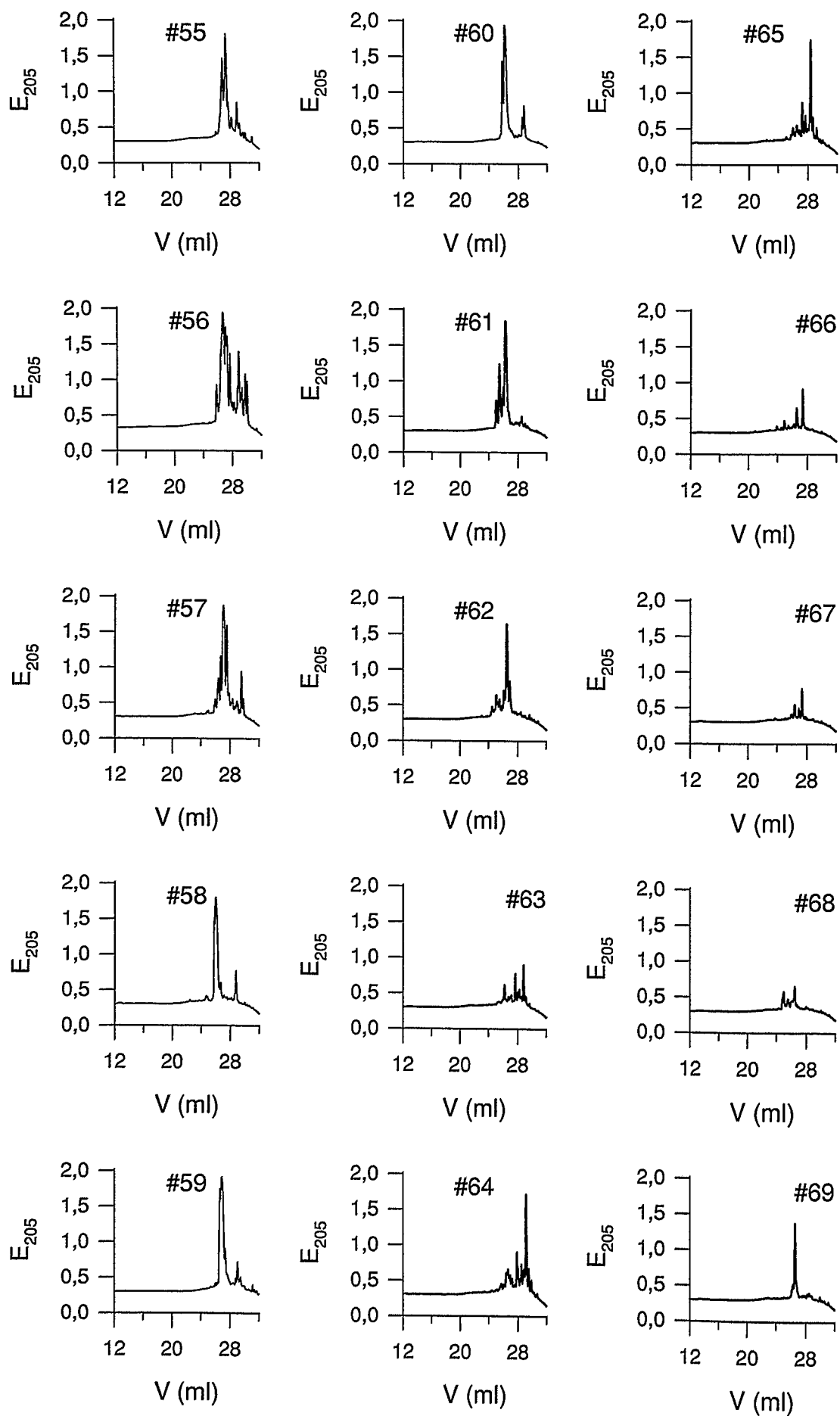
Die Peptide wurden durch analytische HPLC charakterisiert (→ 2.6). Im folgenden werden die Chromatogramme für die analytische Trennung aller Peptide aus der Peptidbibliothek (→ Anhang D.1, 2.3.1) gezeigt.

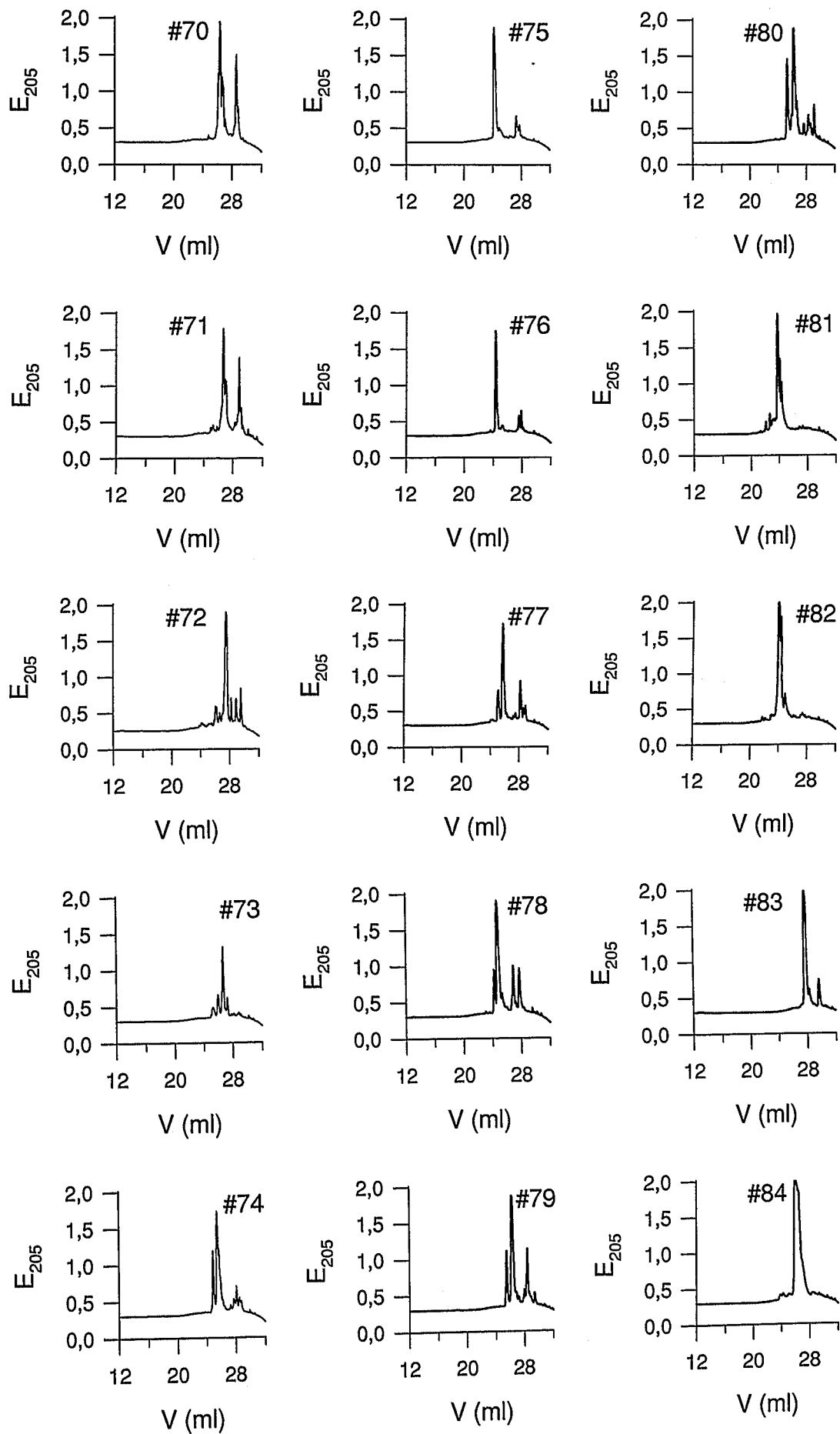


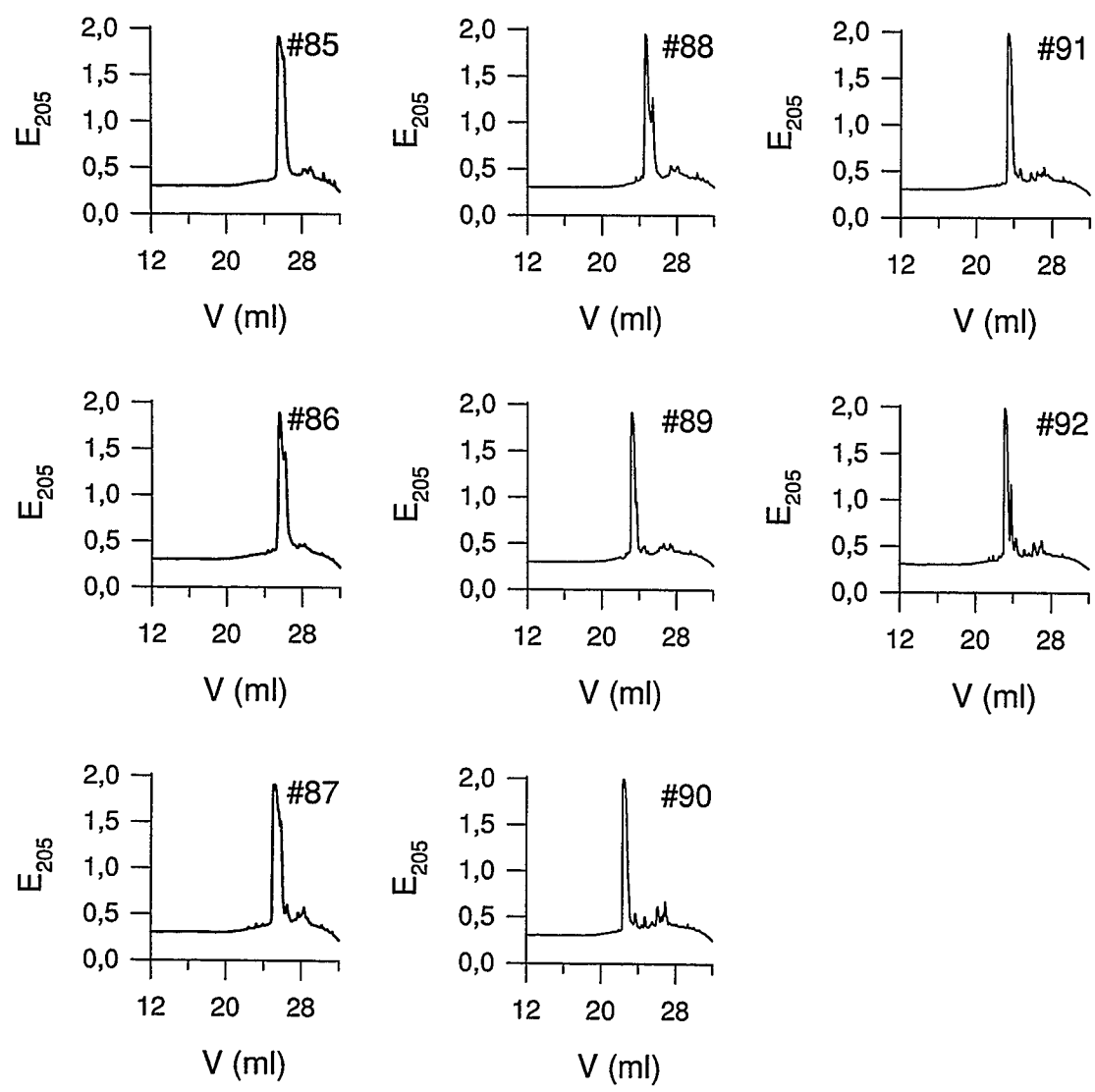












Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Karl-Wilhelm Koch für die Überlassung des Themas, für die engagierte Betreuung und für die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln.

Herrn Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp für die Möglichkeit, diese Arbeit im IBI-1 des Forschungszentrums Jülich anzufertigen.

Frau Dr. Teresa Duda und Herrn Prof. Dr. Rameshwar K. Sharma von der University of Medicine and Dentistry of New Jersey für die fruchtbare Kooperation.

Herrn Dr. Michael Beyermann und seinen Mitarbeitern vom Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin für die Synthese vieler Peptide.

Frau Doris Höppner-Heitmann, Frau Petra Twelker, Herrn Dr. Dietmar Weitz, Herrn Dr. Martin Zoche, Herrn Torsten Fischer und Herrn Alexander Schrem für die angenehme Zusammenarbeit im Labor.

Frau Doris Höppner-Heitmann und Herrn Rudi Esser für die ROS.

Frau Mechthilde Bruns für die Pflege der Zellkultur.

Frau Anja Rodenbrock vom Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen.

Herrn Dr. Wolfgang Bönigk und Herrn Dr. Arnd Baumann für die molekularbiologische Infrastruktur.

Frau Anita Eckert für die Organisation.

Frau Dr. Renate Gauß, Frau Heike Schauf, Herrn Priv.-Doz. Dr. Stephan Frings, Herrn Dr. Ingo Weyand und Herrn Dr. Heinz G. Körschen für ihre konstruktiven Anmerkungen zum Manuskript.

und allen Mitarbeitern des IBI für Unterstützung, Diskussionen und Unterhaltung.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3719
Dezember 1999
ISSN 0944-2952