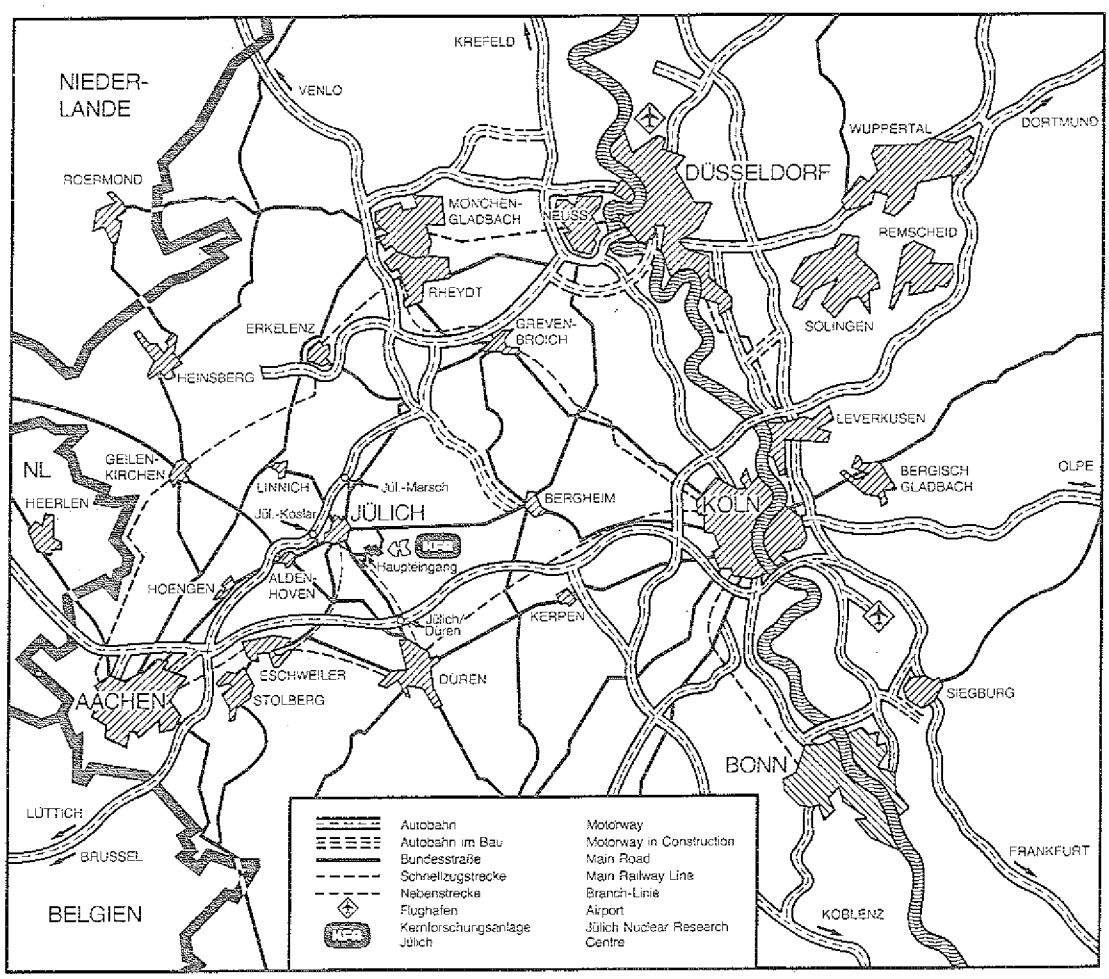
KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH
Institut für Neurobiologie

Lichtabhängiger Nukleotidaustausch an der Photorezeptormembran und seine Katalyse durch Rhodopsin

von

Marion Wehner

Jül – 2044
März 1986
ISSN 0366 – 0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2044

Institut für Neurobiologie Jül – 2044

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

Lichtabhängiger Nukleotidaustausch an der Photorezeptormembran und seine Katalyse durch Rhodopsin

von

Marion Wehner

D 82 (Diss. T. H. Aachen)

Häufig benutzte Abkürzungen:

ROS =	Stäbchenaußensegment (Rod Outer Segment)
Rh* =	gebleichtes Rhodopsin
$T_{\alpha\beta\gamma}$ =	Transducin mit den Untereinheiten α, β und γ
NA =	Nukleotidaustausch
GDP-βS =	Guanosin-5'-o-(2-thiodiphosphat)
GTP-γS =	Guanosin-5'-o-(3-thiotriphosphat)
GNP =	GMP-PNP = GppNHp = Guanylyl-imidodiphosphat
^{3}H-GNP$_b$ =	^{3}H-GNP$_{bound}$ = an die α-Untereinheit von Transducin gebundenes, ring-tritiiertes GNP
PMSF =	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS =	Sodium-dodecylsulfat
Th(short) =	Rhodopsin, das mit Thermolysin unter short-term Bedingungen proteolysiert wurde
Th(long) =	unter long-term Bedingungen mit Thermolysin proteolysiertes Rhodopsin
Th(short)Cp =	Th(short), das mit Carboxypeptidase Y proteolysiert wurde
V8 =	mit Staphylococcus aureus-Protease V8 proteolysiertes Rhodopsin
V8Cp =	V8 mit Carboxypeptidase Y proteolysiert
T =	mit Trypsin proteolysiertes Rhodopsin
TCp =	T mit Carboxypeptidase Y proteolysiert
TCpV8 =	TCp mit Staphylococcus aureus-Protease V8 proteolysiert
TCpV8Cp =	TCpV8 mit Carboxypeptidase Y proteolysiert
SEM =	standard error of the mean

Summary

1) The ability of bleached rhodopsin (Rh*) to mediate light induced binding of ^{3}H-GTP, or of some GTP-analogues to the α-subunit of transducin ($T_{\alpha\beta\gamma}$) was measured in tracer experiments using filtration methods. Whole rod outer segments (ROS) were compared with a reconstituted system consisting of washed membranes with added peripheral proteins (mainly T and PDE). Bleaching 1 % of the rhodopsin leads to a maximum nucleotide binding reaction on T_α in both systems. In experiments with whole ROS half-maximum binding of ^{3}H-GNP to T_α occurred at a bleaching rate of 0.0263 % (respectively at 0.0229 % Rh* in a second preparation). The corresponding values for the reconstituted system were observed at bleaching degrees of 0.0234 % (respectively 0.0372 %) Rh*. The resulting amplification factors - that means the number of bound ^{3}H-GNP catalyzed by one Rh* - were 129 (respectively 122 in a second preparation) molecules ^{3}H-GNP$_{bound}$/Rh* in whole ROS, and 114 (respectively 70) molecules ^{3}H-GNP$_{bound}$/Rh* in the reconstituted system.

2) Rhodopsins modified with different proteases have been tested for their abilities to catalyze the nucleotide exchange on T_α. The enzymes used were trypsin, carboxypeptidase Y and Staphylococcus aureus-protease V8. The degrees of proteolysis were tested on PAGE and after carboxypeptidase Y treatment also by amino acid analysis. Two types of rhodopsin modifications must be distinguished: modifications

restricted to the C-terminus (removal of amino acids completely until Ala 16′ and 50 % until Pro 22′) using trypsin followed by carboxypeptidase Y, and modifications in the loop region between helices 5 and 6 in addition to the above-described C-terminal modification (using V8 hydrolyzing the peptid bound Ser 109′ - Glu 110′ either followed or not by carboxypeptidase Y treatment).

a) Removal of 15 - 22 amino acids from the C-terminus does not lead to a significant difference in the catalytic activity of Rh* concerning nucleotide exchange. In some cases a tendency to even higher light sensitivities was observed.
Rhodopsin treated in such a manner catalyzes half-maximum nucleotide binding when 0.0209 % was bleached, the corresponding amplification factor (^{3}H-GNP$_{bound}$ /Rh*) was 121. Maximum nucleotide binding occurred at a bleaching rate of 1 %.

b) Cutting the loop between helices 5 and 6 with the help of V8 protease, without removing amino acids from the loop, does not lead to a reduced catalyzing ability. Subjecting C-terminal modified rhodopsin to this loop modification (one preparation, n = 6) even leads to a significantly enhanced catalyzing property. Half-maximum nucleotide binding occurred when bleaching 0.0132 % of the rhodopsin, resulting in an amplification degree of 215 ^{3}H-GNP$_{bound}$/Rh*. Maximum nucleotide binding occurred when bleaching only 0.1 %

of the rhodopsin. Experiments done with a similar preparation led to comparable results.

c) Subsequent removal of amino acids from the loop between helices 5 and 6 with carboxypeptidase Y strongly reduced the ability to catalyze nucleotide exchange on T_α. Half-maximum nucleotide exchange with 1.9 ^{3}H-GNP$_{bound}$/Rh* was determined by 1.74 % Rh*. Maximum binding does not appear before bleaching 100 %.

3) The results lead to the following conclusion:
The light-activated site on the rhodopsin molecule, responsible for transient binding of transducin leading to nucleotide exchange on T_α, is to be found in the loop between helices 5 and 6 in the range of the amino acids Glu 110′ to Gln 113′.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung

In den Stäbchen (engl. rods) des Vertebratenauges, die für das Dämmerungssehen verantwortlich sind, führt die Absorption von Photonen letztlich zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Die ´Antenne´ für die Aufnahme des adäquaten Reizes stellt das Rhodopsin dar. Dieses Chromoprotein befindet sich nahezu ausschließlich in den Diskmembranen des Stäbchenaußensegmentes (engl. rod outer segment, ROS); ein geringer Teil (3 %) ist in die Zellmembran eingelagert.

Im Dunkeln ist die ROS-Plasmamembran permeabel für Na^+-Ionen (Na^+-Dunkelstrom). Dieser Na^+-Einstrom wird durch einen K^+-Ausstrom aus dem Innensegment kompensiert. Die Gradienten für Na^+ und K^+ werden durch eine Pumpe im Innensegment aufrecht erhalten. Das Schließen der Na^+-Kanäle infolge Belichtung und die unveränderte K^+-Permeabilität führen zu einer Hyperpolarisation der Zelle in Richtung auf das K^+-Gleichgewichtspotential.

Die Hyperpolarisation der Zelle ist die Folge einer Veränderung in den Ionenleitfähigkeiten der äußeren Zellmembran. Die Photonenabsorption findet jedoch im Wesentlichen in den davon räumlich getrennten Diskmembranen statt. Somit ist das Vorhandensein eines ´second-messengers´ für die funktionelle Kopplung zwischen beiden Bereichen zu erwarten.

Weiterhin findet innerhalb des Stäbchens bei der Übersetzung des Lichtsignals eine Verstärkung statt: die

Bleichung eines Rhodopsinmoleküls führt in der dunkeladaptierten Zelle zur Schließung von etwa 100 Ionenkanälen (1).

Als mögliche Kandidaten für die Rolle des second-messengers werden sowohl Ca^{2+}-Ionen als auch cGMP diskutiert (1 - 10).

Nach der Hagins'schen Hypothese setzt Ca^{2+}, das bei Belichtung aus den Disks freigesetzt wird, die Na^{+}-Leitfähigkeit an der ROS-Plasmamembran herab (1, 9).

Konträr zur Ca^{2+}-Hypothese stellten Yau und Nakatani (5) eine Abnahme der cytosolischen Ca^{2+}-Konzentration nach Belichtung infolge Ca^{2+}-Efflux fest. Dieser Ca^{2+}-Efflux beruht auf der lichtunabhängigen Wirkung eines Na^{+}/Ca^{2+}-Austauschers, der dafür sorgt, daß Ca^{2+}, welches zu etwa 10 - 15 % am Dunkelstrom durch die Na^{+}-Kanäle beteiligt ist, wieder aus dem rod transportiert wird. Der Na^{+}/Ca^{2+}-Austauscher arbeitet nach Belichtung so lange, bis die Ca^{2+}-Konzentration im Innern der Zelle auf einen Minimalwert gesunken ist (5, 10).

Nach der cGMP-Hypothese führt eine durch gebleichtes Rhodopsin ausgelöste Kaskade enzymatischer Reaktionen zu einer Hydrolyse von cGMP. Die Folge ist eine Herabsetzung des Kationen-Einstroms in das ROS (2 - 8).

Miller und Nicol (8) beschrieben den Einfluß der intrazellulären cGMP-Konzentration auf den Erregungszustand des rods. Sie zeigten, daß die Injektion von cGMP in

rods innerhalb von msec zu einer Depolarisation in Richtung auf das Na^+-Gleichgewichtspotential führt. Einen direkten Einfluß von cGMP auf die Na^+-Kanäle (Ca^{2+}-unabhängig und - weil ebenfalls unabhängig von Nukleosidtriphosphaten - ohne Beteiligung von Proteinkinasen) zeigen die Experimente von Fesenko et al. (3). An 'inside-out' patches der ROS-Plasmamembran stellten sie reversible, cGMP-induzierte Erhöhungen der Kationenleitfähigkeiten fest.

Die Konzentration von cGMP im ROS wird wechselseitig durch die Tätigkeit der Guanylat-Cyclase und einer Phosphodiesterase (PDE) bestimmt. Die Guanylat-Cyclase bildet aus GTP cGMP und Pyrophosphat. Die PDE hydrolysiert cGMP zu 5'GMP, wobei zusätzlich ein Proton freigesetzt wird. Auf Belichtung steigt die Aktivität der PDE. Diese Erhöhung der enzymatischen Aktivität wird durch aktiviertes Transducin ausgelöst (11 - 15).

Beim Transducin handelt es sich um ein aus den drei Untereinheiten α, β, γ bestehendes Protein aus der Familie der GTP-bindenden Proteine (G-Proteine) (16, 17, 11, 18, 19). G-Proteine sind in verschiedenen Systemen an der Transduktion von Signalen beteiligt. Sie sind zwischen Rezeptor und Effektor als Signalüberträger und Verstärker geschaltet (20 - 30). Im aktivierten Zustand haben die G-Proteine an ihren α-Untereinheiten GTP gebunden. Durch die ihnen eigene GTPase-Aktivität - mit sehr geringer Umsatzrate - versetzen sie sich selbst durch die Hydrolyse von GTP zu GDP wieder in den Grundzustand (17, 11, 18, 31). Den bisher untersuchten G-Pro-

teinen ist gemeinsam, daß über eine ADP-Ribosylierung ihre GTP-Bindungskapazität durch Pertussis-Toxin oder ihre GTPase-Aktivität durch Cholera-Toxin herabsetzbar ist, auf das Transducin wirken beide Toxine (32, 33, 30, 34).

Weiterhin sind die ß-Untereinheiten der G-Proteine weitgehend identisch (35). Die α-Untereinheiten der verschiedenen G-Proteine unterscheiden sich voneinander. Es wurden jedoch Homologien in den Bereichen gefunden, die für Guanosin-Nukleotid-Bindung und Hydrolyse verantwortlich sind (29).

G-Proteine können unter Beibehaltung der Funktionalität mit Rezeptoren und Effektoren ´fremder Systeme´ interagieren (25, 33, 36). Tsai et al. (33) zeigten, daß belichtetes Rhodopsin bei Anwesenheit von Nukleosidtriphosphat-Analoga in der Lage ist, ein nicht retinales G-Protein (G_i, s.u.) zu aktivieren.

Im Adenylat-Cyclase-System steuern stimulatorische und inhibitorische G-Proteine (G_s und G_i) die Aktivität der Adenylat-Cyclase und damit, zusammen mit einer PDE, die Konzentration an cAMP (21, 22, 24, 32, 25, 33, 30, 36).

Bei der Synthese von Proteinen an Ribosomen benötigen initiation factor (IF), elongation factor (EF) und release factor (RF) im aktivierten Zustand die Bindung von GTP (24, 29).

Das ras-Gen Produkt p21, ein Protein mit dem Molekulargewicht 21KD, zeigt ebenfalls Homologien zu bestimmten Bereichen der G-Proteine und wird auch durch die Hydrolyse von GTP in den aktiven Zustand versetzt. Ras-Gen Produkte spielen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellwachstums und der Oncogenese (29, 26, 27, 28, 35).

Ebenfalls G-Protein (Np)-induziert läuft die nach Rezeptoraktivierung stattfindende Hydrolyse von Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat ($InsP_3$) und Diacylglycerol (DG) mit Hilfe einer PDE ab (37, 38).

Inositoltriphosphat wird als second-messenger zur Ca^{2+}-Freisetzung aus endogenen Speichern in verschiedenen Systemen (Oocyten, Pankreas, Insulin sezernierende ß-Zellen, Leber etc.) diskutiert. Diacylglycerol führt zur Aktivierung einer Proteinkinase C und damit zu Proteinphosphorylierungen (37, 39, 38). PIP_2 und Kinase C wurden beide im ROS von Fröschen nachgewiesen (40); ebenfalls wurde gezeigt, daß $InsP_3$ den Erregungszustand von Photorezeptorzellen bei Limulus polyphemus beeinflußt (41). Evtl. in Verbindung mit PIP_2 wird Ca^{2+} bei der Phototransduction eine Rolle in der Adaptation zugesprochen (39, 5, 41).

Dem System Rezeptor - G-Protein - Effektor scheint somit eine zentrale Rolle bei zellulären Regulationsmechanismen zuzukommen. Die Interaktion zwischen dem Rezeptor Rhodopsin und dem G-Protein Transducin sollte in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden.

Bleichung von Rhodopsin führt zu einer lichtinduzierten Bindung zwischen Rhodopsin und der α-Untereinheit des Transducins (42, 17, 11, 19). Bei Anwesenheit von Guanosin-Triphosphaten oder deren Analoga erfolgt am $T\alpha$ ein Austausch von GTP gegen zuvor gebundenes GDP. Das derart aktivierte Transducin verliert seine zuvor hohe Affinität zum gebleichten Rhodopsin und dissoziiert von der Diskmembran. Das Rhodopsin ist nun wieder frei und in der Lage, weitere Transducine zu aktivieren (42, 17, 43, 44, 13, 19). Die Nukleotidaustausch-Reaktion stellt somit einen ersten Verstärkungsschritt in einer Enzymkaskade dar, die, nach der cGMP-Hypothese, letztendlich über eine PDE-Aktivierung und damit verbundene cGMP-Hydrolyse zu einer Veränderung des Membranpotentials führen soll (12, 13, 4, 5, 3). Kühn et al. (42) ermittelten anhand von light-scattering-Experimenten für die Austauschreaktion einen Zeitverlauf von 100 msec, die enzymatischen Reaktionen laufen somit vor dem Auftreten des Rezeptorpotentials ab und wären demnach hinreichend schnell.

Für die nähere Charakterisierung der Beziehung zwischen Rhodopsin und Transducin wäre interessant, die Bereiche beider Moleküle zu kennen, die infolge einer Rhodopsinbleichung miteinander in Kontakt treten. Weiterhin wäre das Ausmaß der Signalverstärkung von Interesse, das darauf beruht, daß ein gebleichtes Rhodopsinmolekül (Rh*) den Nukleotidaustausch an einer ganzen Reihe von Transducinmolekülen auslöst.

Durch andere Arbeiten (16, 45, 25, 33, 29, 46, 47, 48, 49) konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß der Bereich am $T\alpha$, der mit Rh* in Kontakt tritt, durch die Aminosäuren Cys und Asp und eine terminale Region von etwa 100 Aminosäuren charakterisiert ist (s. Kap. 4.).

Beim Rhodopsin handelt es sich um ein intrinsisches Membranprotein, das sich aus dem Chromophor 11-cis-Retinal und der Proteinkomponente Opsin zusammensetzt. Das Opsin besteht jeweils zu etwa 50 % aus miteinander abwechselnden hydrophoben und hydrophilen Bereichen (50). Die hydrophoben Bereiche besitzen eine a-helikale Struktur und sind in den Lipid-bilayer eingelagert. In diesem Bereich befindet sich auch das Retinal, das über eine Schiffsche Base mit Lys 53′ des Opsins verbunden ist (50 - 55). Insgesamt besitzt das Rhodopsinmolekül 7 Helices. Diese Helices sind durch die hydrophilen Bereiche des Moleküls in Form von je 3 intra- und extradiscalen Schlingen (′loops′) verbunden. Die N-terminale Aminosäure Methionin befindet sich im Disklumen, der C-terminale Bereich der Polypeptidkette ragt in den interdiscalen Raum. Als C-Terminus des Rhodopsins wird in der vorliegenden Arbeit der Abschnitt der Polypeptidkette bezeichnet, der von der C-terminalen Aminosäure Ala 1′ bis zum Eintreten der Kette in den Lipidbilayer reicht (54, 53).

Daß der C-Terminus des Moleküls sich im interdiscalen Raum befindet, konnten Hargrave et al. (55) mit Proteolyseexperimenten zeigen. Diese Region des Moleküls ist reich an hydrophilen Aminosäuren und enthält sieben

Serin- und Threoninreste, die lichtinduziert durch eine Rhodopsin-Kinase phosphoryliert werden können (56).

Es ist bekannt, daß das Rhodopsinmolekül infolge der photochemischen Reaktionen seine Lage in der Membran ändert: der cytoplasmatische Teil des Moleküls ragt nach Belichtung weiter in den interdiscalen Raum (58, 59, 57). Möglicherweise ist dieser Effekt dafür verantwortlich, daß bestimmte Bereiche am Rhodopsinmolekül für cytoplasmatische Proteine wie Rhodopsin-Kinase, 48K und Transducin (besser) zugänglich werden.

Ziel dieser Arbeit war es, den Bereich am Rhodopsinmolekül zu identifizieren, der mit der $T\alpha$-Untereinheit des Transducins eine lichtinduzierte Bindung eingeht. Hierzu sollte über die Messung des Nukleotidaustausches untersucht werden, wie bestimmte enzymatische Proteolysen des Rhodopsinmoleküls seine katalytischen Eigenschaften bei der Reaktion mit Transducin beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsobjekt

Alle Versuche wurden mit ROS-Präparationen aus Rinderaugen durchgeführt. Die Augen wurden direkt nach dem Schlachten den Augenhöhlen entnommen und unter Lichtabschluß auf Eis zum Labor transportiert. Dort wurden sie sofort weiterverarbeitet.

2.2. ROS-Präparation

Nahezu alle ROS-Präparationen wurden von Herrn E. Wüst durchgeführt, angelehnt an die Methode, wie sie von Kühn (61) beschrieben wurde.

Alle Arbeiten wurden bei schwachem Rotlicht auf Eis durchgeführt; zentrifugiert wurde bei 4 °C.

ROS wurden von frischen Retinen ausgehend präpariert und auf diskontinuierlichen Sucrosedichtegradienten in 100 mMol/l K-PP, 1 mMol/l $MgCl_2$, 0,1 mMol/l EDTA und 1 mMol/l DTT (pH 7,0) gereinigt. Die gereinigten ROS wurden in Form von Pellets mit Argon überspült, luftdicht verschlossen, in Alufolie eingepackt und bei - 70 °C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Diese ROS-Pellets stellten das Ausgangsmaterial dar für die Gewinnung von Diskmembranen und Proteinextrakten sowie für alle durchgeführten Proteolysen am Rhodopsinmolekül.

2.3. Präparation von Diskmembranen sowie Präparation von löslichen und peripher gebundenen Proteinen

Zur Gewinnung von Diskmembranen, dem Material für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Rhodopsinproteolysen, die in der Hauptsache Rhodopsin als intrinsisches Membranprotein enthalten, wurde wie folgt verfahren. Als quasi "Nebenprodukte" dieser Präparation gewinnt man Extrakte von löslichen (E_1) und peripher gebundenen Proteinen (E_2) (11).

ROS-Pellets werden mit 10 mMol/l Hepes, 120 mMol/l KCl, 1 mMol/l DTT pH 7,0 auf Eis resuspendiert, homogenisiert (Teflon/Glas); die Rhodopsinkonzentration sollte etwa 4 mg/ml entsprechen

↓

ROS-Aliquots werden der Suspension für Versuche und zur genauen Bestimmung der Rhodopsinkonzentration entnommen, in Alufolie verpackt in N_2 eingefroren, bei - 70 °C aufbewahrt

↓

Die ROS-Suspension wird zentrifugiert: 4 °C, 50.000 g, 30 Minuten (Beckman-Zentrifuge)

↓

Der Überstand wird zur Entfernung evtl. vorhandener Membranteile erneut wie oben zentrifugiert

↓

Der so gewonnene Überstand E_1 enthält alle löslichen Proteine (wie 48K, Rhodopsin-Kinase) (62, 61, 11); der Überstand wird in Aliquots in N_2 eingefroren und bei - 70 °C aufbewahrt

Das Pellet wird in 10 mMol/l Hepes, 120 mMol/l KCl, 1 mMol/l $MgCl_2$, 1 mMol/l DTT, pH 7,0, resuspendiert und wie oben zentrifugiert

↓

Überstand verwerfen

↓

Das Pellet wird in 10 mMol/l Hepes, pH 7,0, resuspendiert, so daß die Rhodopsinkonzentration 4 mg/ml beträgt, zentrifugiert wie oben

↓

Der Überstand wird erneut zentrifugiert wie für E_1

↓

Der so gewonnene Überstand E_2 enthält peripher gebundene Proteine ($T_{a\beta\gamma}$ und PDE; (11, 62))

↓

500 µl Aliquots von E_2 werden in N_2 eingefroren und bei - 70 °C aufbewahrt. Die Konzentration an $T_{\alpha\beta\gamma}$ sollte nach Abzug von Verlusten durch die Präparation etwa 7 µMol/l sein. (Das Verhältnis von Rh : $T_{\alpha\beta\gamma}$ im intakten ROS beträgt etwa 10 : 1, dieses Verhältnis ist gemeint, wenn im Folgenden von der korrespondierenden Menge an $T_{\alpha\beta\gamma}$ gesprochen wird)

Das Pellet wird resuspendiert und homogenisiert in 10 mMol/l Hepes, 120 mMol/l KCl, 1 mMol/l $MgCl_2$, 1 mMol/l DTT, pH 7,0, so daß die Rhodopsinkonzentration 4 mg/ml beträgt

↓

Von der Rhodopsinsuspension werden Aliquots entnommen (die extakte Rhodopsinkonzentration bestimmt), in Alufolie verpackt, in N_2 eingefroren und bei - 70 °C aufbewahrt

2.4. Nukleotidaustausch-Experimente

2.4.1. Prinzip

Belichtetes Rhodopsin katalysiert am Transducin ($T_{\alpha\beta\gamma}$) einen Austausch von GTP gegen zuvor - im Dunkeln - gebundenem GDP (16, 42, 17, 11, 62, 18, 31, 63, 43, 44). Über ^{3}H-GTP oder ^{3}H-GNP läßt sich der Nukleotid-Protein-Komplex markieren und nach Auswaschen von freiem Nukleotid quantitativ erfassen.

2.4.2. Nukleotide und deren Analoga

Nukleotidaustauschexperimente wurden durchgeführt mit GTP und dessen nicht hydrolysierbaren Analoga GTP-γS und GNP. Zur radioaktiven Markierung wurden ring-tritiiertes GTP und GNP benutzt, für GTP-γS die ^{35}S markierte Form (GTP, GNP, GTP-γS von Boehringer; ^{3}H-GTP und ^{3}H-GNP von Amersham, ^{35}S-GTP-γS von NEN).

Als Nukleosiddiphosphat wurden GDP bzw. GDP-βS verwendet (beide von Boehringer).

2.4.3. Ansetzen von ^{3}H-GNP-Lösung und Berechnung der spezifischen Aktivität

Zunächst wurde nach Einwaage von nicht radioaktivem GNP eine 10 mMol/l Stammlösung angesetzt. Diese wurde dann nach Bedarf mit destilliertem Wasser auf etwa 100 µMol/l GNP verdünnt. Die exakten Molaritäten wurden spektralphotometrisch mit ε_{253} = 13.700 bestimmt.

Eine solche Lösung wurde durch Zusatz von ^{3}H-GNP radioaktiv markiert. Das von Amersham gelieferte ^{3}H-GNP besaß meist eine spezifische Aktivität von 9 - 13 Ci/mMol. Die spezifische Aktivität der im Versuch benötigten ^{3}H-GNP-Lösung lag in der Regel zwischen 80.000 und 150.000 cpm/nMol; für die einzelnen Proben, die in der Regel 3 - 30 pMol ^{3}H-GNP$_{bound}$ enthielten, ergaben sich Zählraten von etwa 300 - 5.000 cpm.

In den meisten Fällen wurden 2 ml einer nicht radioaktiven GNP-Lösung, deren Konzentration exakt bekannt war, mit 20 µl im verdünnten ^{3}H-GNP markiert. Die Konzentration der von Amersham gelieferten ^{3}H-GNP-Lösung schwankte zwischen 60 und 110 µMol/l.

Die spezifische Aktivität der angesetzten, verdünnten ^{3}H-GNP-Lösung wurde exakt bestimmt, in dem Aliquots aus dem Ansatz entnommen, in Scintillationsflüssigkeit (Instantgel) inkubiert und im Scintillationszähler (ß-Scint) gemessen wurden.

Aus der gemessenen Radioaktivität und der GNP-Konzentration wurde die aktuelle spezifische Aktivität berechnet.

2.4.4. Rhodopsinbleichung

Rhodopsinsuspensionen wurden in einem nach außen hin dunkel abschließbaren Küvettenraum, der sich an einem umgebauten Diaprojektor (KFA/INB-Eigenbau) im Strahlengang der Projektorhalogenlampe befand, gebleicht. Zwi-

schen Lampe und Rhodopsinsuspension befand sich ein Zentralverschluß, dessen Öffnungszeiten über eine Compurautomatik gesteuert wurden. Im Versuch wurden Öffnungszeiten gewählt, die zwischen 0,1 und 10 sec lagen. Fest eingebaut in den Strahlengang waren ein Wärmeschutzfilter und ein Orangefilter (OD 530).

Durch Einsatz von Graufiltern, deren Transmissionswerte zwischen T 10^{-5} und T 0,5 lagen, wurde die Lichtintensität (W/m^2) variiert. Geeicht wurden Apparatur und benutzte Graufilter mit einem Lichtmeßgerät (Lichtstärke in footcandle) und einem Graufilter mit genau definierter Transmission. Die Projektorhalogenlampe war stromstabilisiert und die Lichtstärke weniger als 5 sec nach Anschalten konstant.

Aus unterschiedlichen Kombinationen von Öffnungszeiten und Graufiltern ergaben sich Rhodopsinbleichungsgrade von 10^{-4} bis 100 %.

2.4.5. Versuchsablauf, Probenbehandlung nach dem Versuch, Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Versuche für den Nukleotidaustausch bei Rotlicht auf Eis durchgeführt. Die Rotlichtlampe wurde so gegen eine Wand gerichtet, daß der Abstand zwischen Wand und Lichtquelle etwa 10 cm betrug. Daraus resultierte ein schwaches diffuses Rotlicht.

Die benutzten Puffer waren:

Inkubationspuffer:	10 mMol/l Hepes	
	120 mMol/l KCl	
	1 mMol/l $MgCl_2$	pH 7,0
Stoppuffer:	10 mMol/l Hepes	
	120 mMol/l KCl	
	1 mMol/l EDTA	pH 7,0
Waschpuffer:	Stoppuffer +	
	1 µMol/l GNP	pH 7,0

Die Filtrationsversuche zur Untersuchung lichtinduzierter Rhodopsin-katalysierter GNP-Austausche am Transducin gegen zuvor gebundenes GDP wurden angelehnt an Methoden, wie sie von Godchaux und Zimmermann 1979 (63, 43), Fung und Stryer 1980 (44) und Stryer et al. 1981 (13) beschrieben wurden.

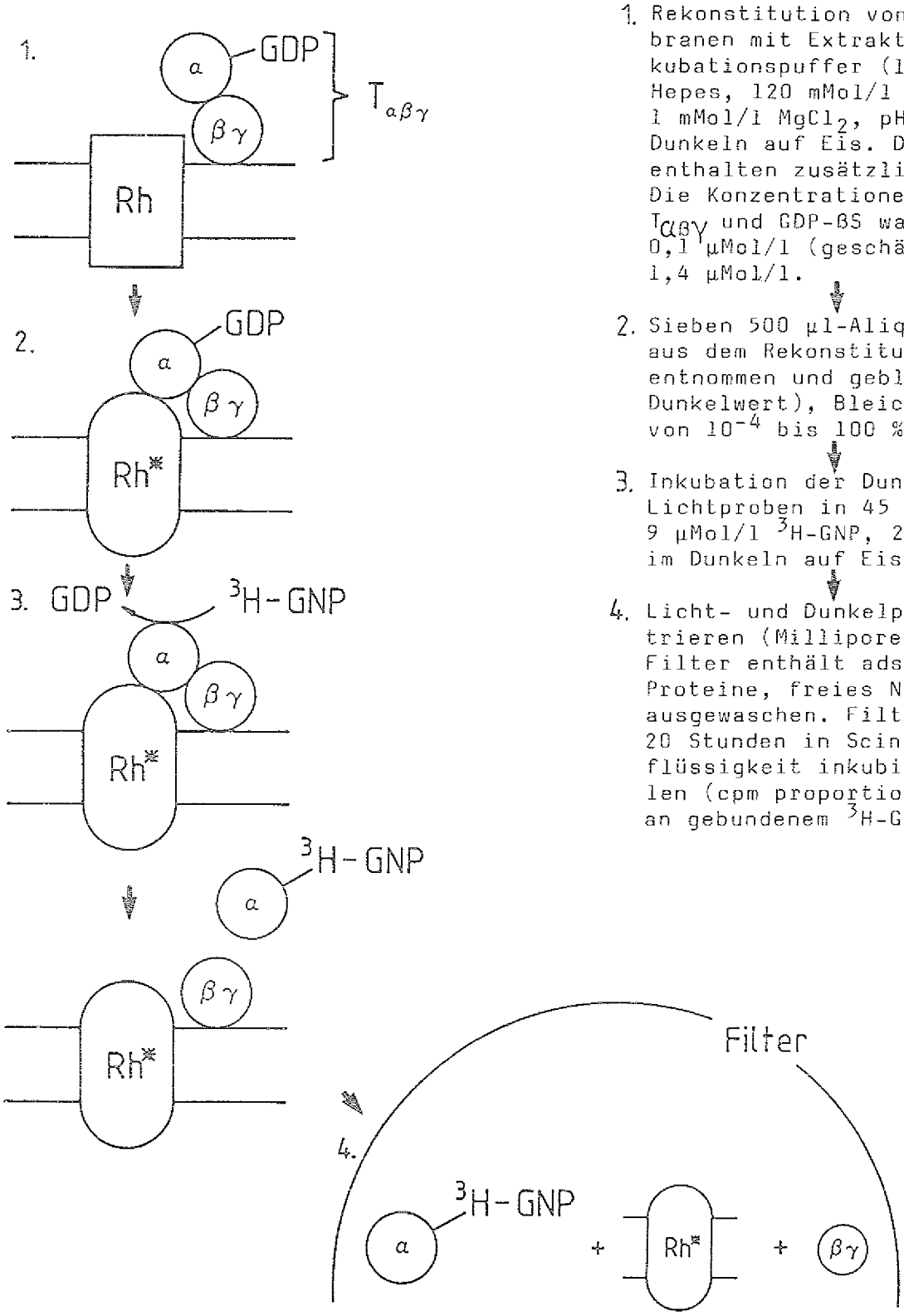
Für eine Versuchsreihe (s. Abb. 1) - bestehend aus 1 Dunkel- und 7 Lichtwerten - wurde eine Suspension in Inkubationspuffer angesetzt, die Rhodopsin, Transducin und GDP-ßS enthielt (die Konzentrationen an Rhodopsin und GDP-ßS waren zuvor spektralphotometrisch bestimmt worden, die Konzentration an Transducin wurde geschätzt). Dieser Ansatz wurde dann in Aliquots von je 500 µl auf 8 Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt.

In den meisten Experimenten wurde die Menge des Inkubationspuffers so gewählt, daß in dem 500 µl Probenvolumen

500 pMol Rhodopsin und die korrespondierende Menge an Transducin enthalten waren. 7 Aliquots wurden nacheinander, ausgehend von 10^{-4} % bis 100 %, belichtet. Während dieser Zeit sowie während der anschließenden Inkubation in ^{3}H-GNP und der Filtration wurden die jeweils nicht behandelten Proben auf dem Eisbad mit einem doppellagigen schwarzen Tuch abgedeckt.

Nach entsprechender Bleichung der 7 Lichtproben wurde zu allen 8 Aliquots 45 µl ^{3}H-GNP (etwa 7,5 - 9 µMol/l) zugefügt. So behandelt blieben die Proben 20 Minuten auf dem Eisbad stehen, bevor sie nacheinander filtriert wurden. Das folgende Flußschema soll den Versuchsablauf verdeutlichen:

Abb. 1: Schema zum lichtinduzierten Austausch von GDP gegen ^{3}H-GNP am Transducin ($T_{\alpha\beta\gamma}$) und der Ablauf im Nukleotidaustausch-Experiment



1. Rekonstitution von Disk-Membranen mit Extrakt E_2 in Inkubationspuffer (10 mMol/l Hepes, 120 mMol/l KCl, 1 mMol/l $MgCl_2$, pH 7,0) im Dunkeln auf Eis. Die Ansätze enthalten zusätzlich GDP-βS. Die Konzentrationen an Rh, $T_{\alpha\beta\gamma}$ und GDP-βS waren 1 µMol/l, 0,1 µMol/l (geschätzt) und 1,4 µMol/l.

2. Sieben 500 µl-Aliquots werden aus dem Rekonstitutionsansatz entnommen und gebleicht (1 Dunkelwert), Bleichungsgrade von 10^{-4} bis 100 %.

3. Inkubation der Dunkel- und Lichtproben in 45 µl 7,5 - 9 µMol/l ^{3}H-GNP, 20 Minuten im Dunkeln auf Eis.

4. Licht- und Dunkelproben filtrieren (Millipore-Filter), Filter enthält adsorbierte Proteine, freies Nukleotid wird ausgewaschen. Filter für etwa 20 Stunden in Scintillationsflüssigkeit inkubieren, auszählen (cpm proportional zur Menge an gebundenem ^{3}H-GNP).

Während der 20minütigen Inkubation der Aliquots wurden 8 Milliporefilter vom Typ HAWP 0025 mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm auf eine Filtrationsapparatur mit 8 Nutschen (KFA/INB-Eigenbau) gelegt und mit jeweils 3 ml Stoppuffer für etwa 5 Minuten vorinkubiert. Bevor die Aliquots zu diesem Stoppuffer gegeben wurden, wurde ein Wasserstrahlvakuum an die Apparatur angelegt, jedoch noch keine Flüssigkeit abgesaugt. Jeweils nach Zugabe eines Aliquots zum Stoppuffer wurde der Durchfluß freigegeben und direkt nach Ablauf der Flüssigkeit wurde der Filter 3 x nacheinander mit je 3 ml Waschpuffer zur Entfernung überschüssiger Nukleotide gewaschen. Nach Ablauf sämtlicher Flüssigkeit wurde der Hahn geschlossen und die nächste(n) Probe(n) in gleicher Weise behandelt; das heißt, daß immer nur 1 Probe gleichzeitig filtriert wurde. Die Filter wurden in Plastikscintillationsgläschen (Zinser) mit je 5 ml Scintillationsflüssigkeit für 20 - 24 h inkubiert und dann in einem Scintillationszähler (ß-Scint) für 1 bis 4 Minuten gezählt.

Aus den gemessenen cpm und der ^{3}H-GNP-Konzentration der Referenz wurde die spezifische Aktivität ermittelt und die Menge an proteingebundenem ^{3}H-GNP (T_{α}-^{3}H-GNP) für jeden Versuchspunkt errechnet.

2.5. Proteolytische Modifikationen am Rhodopsin mit Hilfe verschiedener Enzyme

2.5.1. Proteolysen

Rhodopsin als Katalysator für den lichtinduzierten Austausch von GNP am Transducin gegen im Dunkeln gebundenes GDP sollte näher charakterisiert werden. Um Aussagen über ein aktives Zentrum am Rhodopsinmolekül machen zu können, sollten bestimmte Stellen am Rhodopsin durch gezielte Proteolysen modifiziert werden. Hierdurch sollte der funktionelle Bereich eingekreist werden und dann durch eine einzige proteolytische Behandlung zerstört werden. Als proteolytisch wirksame Enzyme kamen solche in Betracht, die wenige gut definierte Stellen am Rhodopsinmolekül spalten. Da Rhodopsin als intrinsisches Membranprotein vorliegt, sollten nur die drei extradiscalen Loops und der C-Terminus einer Proteolyse zugänglich sein. Der Loop, der die Helices 5 und 6 verbindet, ist im Vergleich zu den beiden anderen stärker exponiert und proteolytischen Enzymen demnach besser zugänglich (55). Die Proteolysemanipulationen am Rhodopsin führen nicht zu Veränderungen der spektralen Eigenschaften; Regenerierbarkeit und Absorptionsspektrum bleiben ebenso unbeeinflußt wie das Gleichgewicht zwischen den Photoprodukten Metarhodopsin I und Metarhodopsin II (64). Es wurden Versuche gemacht mit Thermolysin, Trypsin, Staphylococcus aureus-Protease V8 und Carboxypeptidase Y (zur Durchführung der Proteolysen s. Tabelle I).

Im Überblick einige Enzymcharakteristika:

Enzym	MW	Herkunft	Inhibitor	Bezugsquelle
Thermolysin	35000	Bacillus Thermoproteolyticus	EDTA/EGTA	Serva
Trypsin	24000	Rinderpankreas (TPCK-behandelt)	Trasylol = Aprotinin	Sigma
Staphylococcus aureus-Protease V8	27700	Staphylococcenstamm V8	PMSF	Miles
Carboxypeptidase Y	35000	Hefen	PMSF	Calbiochem Pierce

In der Literatur wurde die Wirkung der benutzten Enzyme wie folgt beschrieben:

<u>Thermolysin</u> hydrolysiert Peptidbindungen auf der NH-Seite von Resten mit hydrophoben Seitenketten

<u>Trypsin</u> hydrolysiert an Lysin- und Arginin-peptidbindungen

<u>Carboxypeptidase Y</u> spaltet als Exopeptidase vom Carboxylterminus eines Proteins ausgehend Aminosäuren ab; Schwierigkeiten treten auf bei einer Aufeinanderfolge saurer Aminosäuren, vor allem aber auch bei Peptidbindungen, an denen Prolin beteiligt ist

Staphylococcus aureus-Protease	hydrolysiert Glutaminsäure- und Asparaginsäure-spezifisch Peptidbindungen.

In Vorversuchen wurde der Proteaseinhibitor Trasylol, ein Peptid vom MW 6500, das aus Rinderlungen gewonnen wird, auf seine Fähigkeiten hin untersucht, die Protease-Wirkung von Trypsin zu hemmen. Dazu wurde ein Gesamtextrakt, der in Hepespuffer lösliche und peripher gebundene Proteine enthielt, folgendermaßen aufgeteilt:

- ein Aliquot nur Extrakt
- Aliquots mit Extrakt und Trypsin
- Aliquots mit festen Mengen an Extrakt und Trypsin, aber variierenden Mengen an Trasylol (Trypsin : Trasylol von 1 : 0,1 bis 1 : 50).

Diese Aliquots wurden 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Im Anschluß daran wurde SDS zu den Proben gegeben, diese für weitere 30 Minuten bei 50 °C inkubiert und die Proben auf Laemmli-Gele aufgetragen. Trasylol zu Trypsin im Verhältnis 2 : 1 zeigte eine deutliche Inhibition der Proteolyse; bei einem Trasylol zu Trypsin Verhältnis von 10 : 1 wurde die Proteolyse komplett inhibiert.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde Trasylol als Trypsininhibitor eingesetzt.

Die benutzten Bedingungen für die Proteolyse von Rhodopsin mit Thermolysin, Staphylococcus aureus-Protease V8,

Trypsin und Carboxypeptidase Y sind in Tabelle I dargestellt.

Rhodopsin und Protease wurden im entsprechenden Proteolysepuffer im Rotlicht unter den für die jeweilige Protease als am bestem ermittelte Proteolysebedingungen zusammengegeben. Inkubiert wurde direkt in Beckman-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß, die in Alufolie verpackt wurden.

Nach Beendigung der Probeninkubation wurde das proteolytische Gemisch zunächst durch Zugabe von Inkubationspuffer auf etwa das doppelte Volumen gebracht und dann in der Beckman-Zentrifuge bei 4 ^{o}C für 30 Minuten bei 50.000 g zentrifugiert. Der Verdauungsüberstand wurde möglichst quantitativ abgenommen und bei - 70 ^{o}C aufbewahrt. Das Pellet wurde im Anschluß 4 x in Puffer resuspendiert und jeweils bei 4 ^{o}C für 30 Minuten bei 50.000 g zentrifugiert. Die dabei entstehenden Überstände wurden verworfen. Nach jedem Proteolyseschritt wurde die benutzte Protease durch Waschungen (s. Tab. I) entfernt. Im Anschluß an die letzte Zentrifugation wurde das Pellet homogenisiert. Erst danach wurde das nächste Enzym zur Proteolyse eingesetzt.

Tabelle I: Übersicht über die zur Rhodopsin-Proteolyse eingesetzten Proteasen und die je nach Proteasespezifität benutzten Proteolysebedingungen und Inhibitoren. Ebenfalls dargestellt sind die zur Proteaseentfernung benutzten Waschungen.

Protease	Verhältnis Protease:Rhodopsin Rhodopsinkonzentration	Puffer	Inkubationstemperatur und -zeit	Inhibitor+	Waschungen
Thermolysin (5, 19, 61, 44, 62, 63, 73)	1) 1 : 200 (400) Th(short-term) Rh 100 µMol/l	5 mMol/l Hepes 2 mMol/l $CaCl_2$	20 °C, 60 (30) Min pH 7,0	EDTA/EGTA	3 x in 5 mMol/l Hepes 2 mMol/l EDTA pH 7,0 1 x in 5 mMol/l Hepes 0,1 mMol/ EGTA pH 7,0
	2) 1 : 12,5 Th(long-term) Rh 100 µMol/l	5 mMol/l Hepes 2 mMol/l $CaCl_2$ pH 7,0	20 °C, 20 h	EDTA/EGTA	3 x in 5 mMol/l Hepes 2 mMol/l EDTA pH 7,0 1 x in 5 mMol/l Hepes 0,1 mMol/l EGTA pH 7,0
Staph. aureus Protease (74, 8, 62)	1 : 50 Rh 100 µMol/l	67 mMol/l Na-PP pH 7,0	30 °C, 3 h	PMSF	1 x in 67 mMol/l Na-PP pH 7,0 3 x in 10 mMol/l Hepes pH 7,0
Trypsin (5, 55, 73)	1 : 20 Rh 25 µMol/l	10 mMol/l Hepes 120 mMol/l KCl 0,1 mMol/l EDTA pH 7,0	20 - 25 °C, 2,5 h	Trasylol	4 x in 10 mMol/l Hepes 120 mMol/l KCl 0,1 mMol/l EDTA pH 7,0
Carboxypeptidase Y (7, 55)	1 : 20 Rh 50 µMol/l Nor-Leu als interner Standard	100 mMol/l Pyridinacetat, pH 5,5	3-stufige Hydrolyse: 1) 3 - 5 h, 25 °C 2) über Nacht, Raumtemp. 3) 5 - 7 h, 25 °C	PMSF	4 x in 10 mMol/l Hepes pH 7,0

+) Die Inhibitoren wurden mit Ausnahme von EDTA/EGTA nur dann eingesetzt, wenn die Präparationen keiner weiteren Proteolyse ausgesetzt wurden. Aliquots, die zur Durchführung von Nukleotidaustauschversuchen entnommen wurden, wurden mit einem etwa 20-fachen Überschuß über eine geschätzte, evtl. noch vorhandene Menge an Enzym versetzt.

Zusätzlich zu den in der Tabelle I angegebenen Proteolysen wurden folgende aufeinander folgende Proteolysen gewählt:

1) Thermolysin short-term (Th(short)) ⟹ Carboxypeptidase Y (Th(short)Cp)

2) Trypsin (T) ⟹ Carboxypeptidase Y (TCp)

3) Staphylococcus aureus-Protease V8 ⟹ Carboxypeptidase Y (V8Cp)

4) Trypsin (T) ⟹ Carboxypeptidase Y (TCp) ⟹ Staphylococcus aureus-Protease V8 ⟹ Carboxypeptidase Y (TCpV8Cp)

Die Abkürzungen in den Klammern bezeichnen die jeweils entstandenen modifizierten Rhodopsine. Die Einzel- bzw. Kombinationsproteolysen sollten zu den folgenden Modifikationen am Rhodopsin führen:

Th(short)	12 Aminosäuren, des (1´-12´) vom C-terminus sind entfernt (55, 65, 66, 67);
Th(long)	- vom C-terminus sind die Aminosäuren bis Leu 21´ entfernt - im Loop zwischen den Helices 5 + 6 wurde die Peptidbindung zwischen Ala 108´ und Ser 109´ hydrolysiert - ein weiterer Schnitt in dieser Loopregion, der zwischen Gln 113´ und Ala 114´ vermutet wird, führte zur Entfernung von etwa 5 Aminosäuren aus dieser Region. Daraus resultieren die Spaltprodukte F1 + F2; F1 entspricht dem N-terminalen Bereich und trägt die Oligosaccharidketten, F2 entspricht dem C-Terminus und enthält Retinal am Lys 53´ (55, 68, 65, 66, 70).
Th(short)Cp	- die Aminosäuren Thr 13´ bis Leu 21´, des (1´-21´) sind entfernt (71, 72).
V8	- die C-terminalen Aminosäuren Ala 1´ - Thr 7´, des (1´ - 7´), sind entfernt. - im Loop zwischen den Helices 5 + 6 wurde die Peptidbindung zwischen Ser 109´ und Glu 110´ hydrolysiert (71, 73,).
V8Cp	- ausgehend von V8 wurden durch die Carboxypeptidase Y Aminosäuren aus dem Loop entfernt - ausgehend von des (1´ - 7´) wurden vom C-Terminus die Aminosäuren Glu 8´ bis etwa Leu 21´, des (1´ - 21´) entfernt.
T	- 9 C-terminale Aminosäuren, des (1´ - 9´) sind entfernt (55, 72, 67).
TCp	- von des (1´ - 9´) ausgehend, wurden einzelne Aminosäuren bis etwa Leu 21´, des (1´ - 21´) entfernt.
TCpV8	- von des (1´ - 21´) ausgehend, wurde die Peptidbindung Ser 109´ - Glu 110´ hydrolysiert
TCpV8Cp	- von TCpV8 ausgehend, wurden Loopaminosäuren entfernt.

2.5.2. Gele zur Überprüfung der Modifikationen

Zur Überprüfung der Quantität der erfolgten Modifikation und zur Identifizierung evtl. zusätzlich entstandener Spaltstellen am Rhodopsin wurden alle Proteolyseprodukte auf SDS-Gele (nach Laemmli) aufgetragen.

Die Präparationsprodukte T, TCp, TCpV8 und TCpV8Cp wurden zusätzlich auf Gradienten-Plattengelen überprüft.

2.5.3. Aminosäureanalysen

Die Aminosäureanalysen wurden von Herrn Dr. J. Föhles am Deutschen Wollforschungsinstitut in Aachen durchgeführt. Es wurde mit der Methode nach Moore und Stein gearbeitet.

Sämtliche Proteolysen, die mit Carboxypeptidase Y durchgeführt wurden (Th(short)Cp, V8Cp, TCp und TCpV8Cp), wurden zur Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren untersucht. Hierzu wurde nach Zentrifugieren des Proteolyseansatzes der Überstand möglichst quantitativ entnommen und gefriergetrocknet.

Die Proteolyseansätze enthielten als internen Standard Nor-Leu, in etwa in den Mengen (in nMol), in denen Rhodopsin im Ansatz enthalten war. Das Nor-Leu diente dazu, evtl. auftretende Materialverluste festzustellen. Außerdem diente Nor-Leu zur Quantifizierung der im Überstand enthaltenen Aminosäuren.

In Vorversuchen wurde eine mögliche Autoproteolyse von Carboxypeptidase Y untersucht. Dazu wurden 1,4 mg Substanz, die 9 % Enzym (= 0,126 mg) enthielt (Angabe Calbiochem) in 100 µl 2fach destilliertem Wasser gelöst und zu 1200 µl 100 mMol/l Pyridinacetat, pH 5,5, gegeben. Der Ansatz enthielt weiterhin 50 nMol Nor-Leu als Aminosäurestandard. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 30 °C wurde der Ansatz gefriergetrocknet für die anschließende Aminosäureanalyse.

2.6. Zentrifugationsversuche

Bei nahezu allen durchgeführten Dosis-Wirkungskurven (s. Kapitel 3.2., 3.3., 3.5., 3.7.) zeigten die Nukleotidaustauschwerte nach Erreichen eines Maximums kein Sättigungsverhalten (Plateau), sondern nahmen zu höheren Bleichungsgraden hin ab. Diese Beobachtung sollte durch Zentrifugationsversuche näher untersucht werden. Folgender Gedankengang war Grundlage für die Versuche:

- In einem Puffer mittlerer Ionenstärke (s. 2.4.5.), der Rhodopsin und Transducin im Verhältnis von etwa 10 : 1 enthält, sollte $T_{\alpha\beta\gamma}$ im Dunkeln über T_β an die Membran gebunden sein (19, 44, 42, 17, 11, 62, 18, 63). Demzufolge ließe sich $T_{\alpha\beta\gamma}$ mit den Membranen zusammen sedimentieren, der Zentrifugationsüberstand sollte mehr oder weniger frei sein von T_α und $T_{\beta\gamma}$.
- Bei Rhodopsinbleichung sollte unter der Voraussetzung, daß der Puffer kein GNP enthält, zusätzlich

zur Dunkelbindung $T_{\alpha\beta\gamma}$ über T_{α} lichtinduziert an Rh* gebunden sein. Enthält der Puffer zusätzlich GNP, so sollte nach Austausch gegen zuvor gebundenes GDP die T_{α}-Untereinheit als T_{α}-GNP vom Rhodopsin und vom $T_{\beta\gamma}$ abdissoziieren. Nach Zentrifugieren sollte der Überstand vor allem T_{α}-GNP enthalten.

In Nukleotidaustausch-Experimenten ist die Menge an T_{α}-^{3}H-GNP bei 1 % Bleichung größer als bei 100 %. Folglich sollten die Überstände in Zentrifugationsexperimenten von zuvor zu 1 % bzw. zu 100 % gebleichten Proben die gleichen Unterschiede hinsichtlich der vorhandenen Mengen an T_{α}-GNP aufweisen.

2.6.1. Versuchsablauf

Wie für Nukleotidaustausch-Experimente bereits beschrieben, wurden Suspensionen angesetzt, die Rhodopsin, Transducin und GDP-ßS in Inkubationspuffer enthielten.

Nach 1 bzw. 100%iger Bleichung der Ansätze (s. Kap. 2.4.4.) wurden die Proben mit GNP versetzt und auf Eis 20 Minuten bei Rotlicht inkubiert. 1 ml des Probenvolumens enthielt 1 nMol Rhodopsin und die korrespondierende Menge an $T_{\alpha\beta\gamma}$. In den Experimenten angesetzte GNP-Konzentrationen waren 8, 50, 250 und 500 µMol/l. Zusätzlich zu den 1 und 100 % Lichtproben wurden Dunkelproben angesetzt.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben in kleine Zentrifugenröhrchen pipettiert, diese in Adapter für den JA21-Rotor der Beckman-Zentrifuge eingesetzt und 30 Minuten bei 4 °C und 50.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden möglichst quantitativ mit einer Pasteurpipette abgenommen und erneut 20 Minuten bei 4 °C und 50.000 g zentrifugiert. Diese Überstände wurden entnommen, in Eppendorfreaktionsgefäßen in N_2 eingefroren und gefriergetrocknet.

Jeder Rückstand aus der Gefriertrocknung wurde im Folgenden mit 60 µl destilliertem Wasser und 25 µl SDS-Cocktail resuspendiert, für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert und auf 10 %ige Laemmli-Gele aufgetragen. Neben den Zentrifugationsüberständen wurden zur Quantifizierung der Transducin-Mengen in den Überständen die Hälfte, das gleiche sowie das doppelte Volumen des Volumens an Transducin auf die Gele aufgetragen, was in den Zentrifugationsexperimenten eingesetzt wurde.

2.6.2. Versuchsauswertung

Nach Coomassie-Färben der Gele wurden diese in Essigsäure entfärbt und die Extinktion der Proteinbanden durch Scannen der Gele in einem Zeiss-Gerät bei 580 nm ausgewertet (s. Abb. 6a). Die für 1 % und 100 % Bleichung erhaltenen $T\alpha$-Peaks wurden in Bezug gesetzt zu den Peakgrößen der aufgetragenen Standardmengen. Dazu wurden die Flächen unter den Peaks mit Hilfe eines Planimeters ermittelt.

3. Ergebnisse

Belichtetes Rhodopsin ist der Katalysator für die Nukleotidaustauschreaktion am T_α; ein Nukleosidtriphosphat wird gegen ein im Dunkeln gebundenes Nukleosiddiphosphat ausgetauscht (16, 42, 17, 11, 62, 18, 31, 63, 43, 44). Für diese Austauschreaktion ist es zunächst unerheblich, ob die γ-Phosphatgruppe am Nukleotid unhydrolysierbar ist, wie bei GNP und GTP-γS, oder nicht (18, 60). Ein belichtetes Rhodopsinmolekül kann bei hunderten von Transducinen die Austauschreaktion stimulieren (42, 44), bevor es selbst inaktiviert wird.

Ziel dieser Arbeit war es, das Zentrum am Rhodopsinmolekül zu identifizieren, das den Nukleotidaustausch am Transducin katalysiert. In Vorversuchen wurde zunächst der Einfluß verschiedener Parameter auf die Nukleotidaustauschreaktion untersucht.

3.1. Vorversuche

3.1.1. Einfluß von Inkubationsdauer und Temperatur auf den Nukleotidaustausch

Zunächst wurde mit einer ROS-Suspension bei mittlerer Ionenstärke der Einfluß der Inkubationsdauer auf den Nukleotidaustausch getestet. In diesen Versuchen wurde mit 1 µMol/l Rhodopsin, der korrespondierenden Menge an $T_{\alpha\beta\gamma}$ und 8 µMol/l ^{3}H-NTP gearbeitet.

Lichtproben wurden bei Tageslicht und Raumtemperatur in Abwesenheit von NTP für 3 Minuten gebleicht und der Versuch anschließend im Dunkeln bei 0 °C durchgeführt. Unter den Bedingungen wurde ein Bleichungsgrad für Rhodopsin von etwa 90 % geschätzt. Die belichteten Proben zeigten unter Verwendung von ^{3}H-GTP eine schnellere Austauschkinetik als in Gegenwart von ^{3}H-GNP. Wurde ^{3}H-GTP benutzt, trat nach einer 20minütigen Inkubation ein Sättigungsverhalten auf, welches bei ^{3}H-GNP nach 60 Minuten noch nicht erreicht wurde. Es zeigte sich jedoch weiterhin, daß im Dunkeln die Austausche bei Verwendung von ^{3}H-GTP generell höher waren als in Gegenwart von ^{3}H-GNP: nach einer 20minütigen Inkubation läßt sich für ^{3}H-GNP ein Hell-Dunkel-Verhältnis von 4,1 : 1 ermitteln, für ^{3}H-GTP beträgt das Verhältnis lediglich 1,4 : 1. Zwei weitere Versuche führten zu ähnlichen Ergebnissen. Da deutliche Hell-/Dunkel-Unterschiede für die Bewertung der Dosis-Wirkungs-Kurven entscheidend sind, wurde für die folgenden Versuche das GTP-Analogon GNP verwendet; die Inkubation des Reaktionsansatzes in ^{3}H-GNP wurde für die folgenden Versuche auf 20 Minuten festgelegt. Um die Temperaturabhängigkeit des Nukleotidaustausches zu ermitteln, wurden Messungen auf Eis, bei Raumtemperatur (T = 20 - 22 °C) und bei 37 °C durchgeführt. Mit steigender Temperatur erhöht sich vor allem der Dunkel-Austausch. Für die am Tageslicht gebleichten Proben ergaben sich (nach 20 Minuten in ^{3}H-GNP) bei den unterschiedlichen Temperaturen folgende Verhältnisse:

Eis : 21 °C : 37 °C = 1 : 1,04 : 1,3

für die Dunkelproben

Eis: 21 °C : 37 °C = 1 : 1,94 : 2,6

Da in den Nukleotidaustausch-Experimenten die Hell-/Dunkel-Unterschiede möglichst groß sein sollten, wurde im folgenden bei 0 °C gemessen.

3.1.2. Einfluß der Konzentrationen von Rhodopsin und Transducin auf den Nukleotidaustausch

Da die Notwendigkeit bestand, die Nukleotidaustausch-Versuche mit rekonstituierten Systemen durchzuführen, d.h. Rhodopsin zunächst von löslichen und peripher gebundenen Proteinen zu trennen und später wieder mit diesen zu vereinigen, wurden die für die Rekombination optimalen Verhältnisse ermittelt. Im intakten ROS sind die Verhältnisse von $T_{\alpha\beta\gamma}$: GTP : Rh = 1 : 3 : 10 (42, 11), die Rhodopsinkonzentration ist etwa 3,3 mMol/l (50). Bei konstanten Konzentrationen von $T_{\alpha\beta\gamma}$ (0,1 µMol/l) und ^{3}H-GNP (8,9 µMol/l) wurde zunächst die Konzentration von Rhodopsin von 0,071 bis 5 µMol/l variiert. In einer Versuchsserie wurden die Proben am Tageslicht gebleicht, in einer zweiten Serie wurde nicht belichtet. Abb. 2 zeigt ein typisches Einzelexperiment. Bei den Dunkelproben wurde bei Rhodopsinkonzentrationen, die größer waren als 0,5 µMol/l ein ständiger Anstieg des Nukleotidaustausches beobachtet. Bei den belichteten Proben führte eine Erhöhung der Rhodopsin-Konzentration von 0,071 bis 0,5 µMol/l zunächst zu einem steilen Anstieg des Nukleotidaustausches. Weitere Erhöhung der

Rhodopsin-Konzentration führte dann zu einer leichten Abnahme des Austausches. Für weitere Versuche wurde eine Rhodopsin-Konzentration von 1 µMol/l gewählt. Bei dieser Konzentration läßt sich die korrespondierende Menge an Transducin, die unter physiologischen Bedingungen 1/10 der Rhodopsinmenge beträgt, noch gut handhaben.

In der folgenden Versuchsreihe wurden die Konzentrationen von Rhodopsin und ^{3}H-GNP konstant gehalten (1 bzw. 8,9 µMol/l) und die Konzentration von $T_{\alpha\beta\gamma}$ zwischen 0,01 und 1 µMol/l variiert. Die Konzentration an $T_{\alpha\beta\gamma}$ wurde für diese Experimente über Geldensitometrie bestimmt. Abb. 3 zeigt ein typisches Einzelexperiment. Eine Verdopplung der Menge an $T_{\alpha\beta\gamma}$ führte im Mittel zu einer Erhöhung des Austausches um den Faktor 1,9. Dies entspricht sehr gut dem theoretisch zu erwartenden Faktor 2 (43, 42). Anhand der aus 3.1. und 3.2. gewonnenen Erkenntnisse wurden die im Abschnitt 2.4.5. beschriebenen Bedingungen für die Nukleotidaustausch-Experimente ausgewählt.

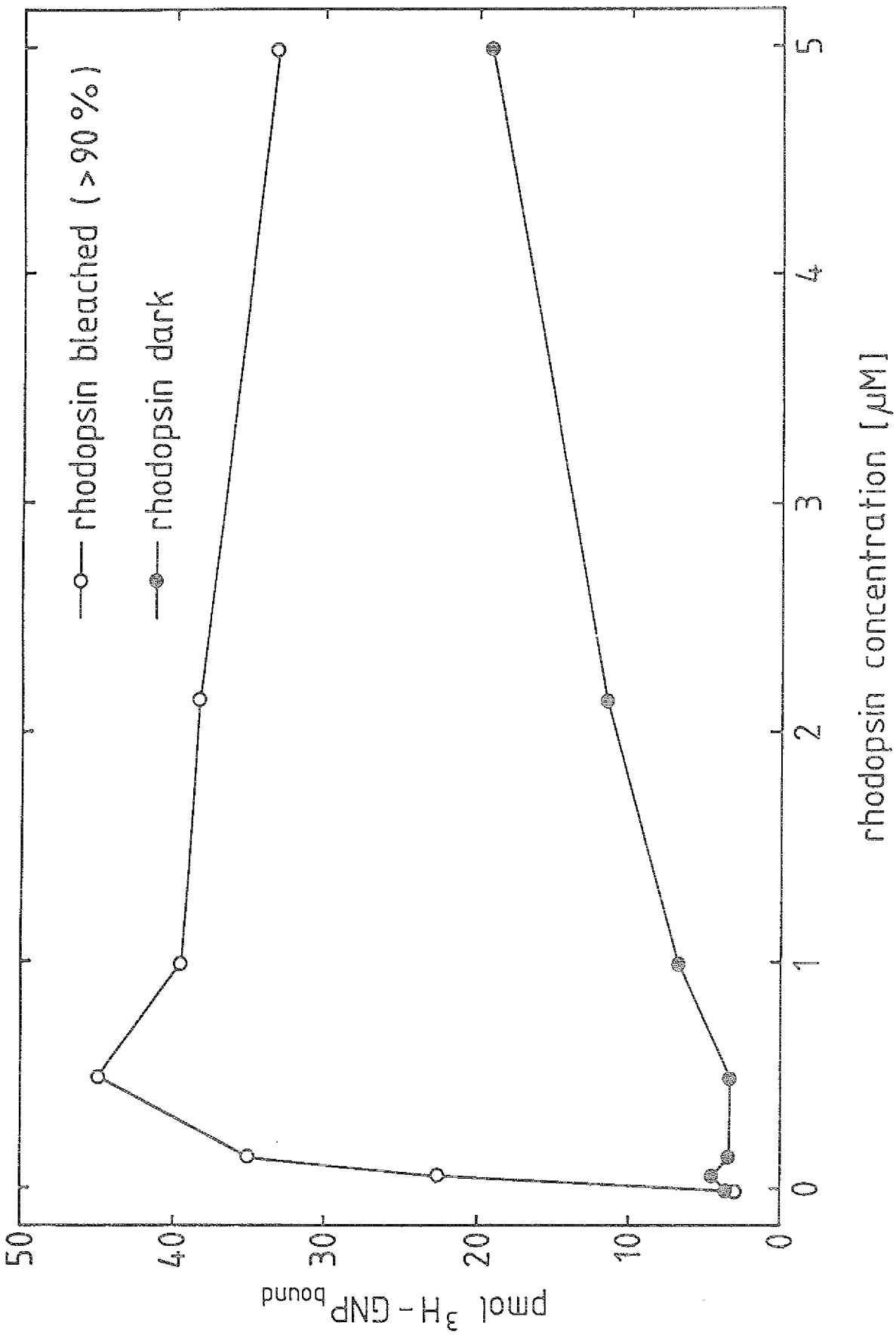


Abb. 2: Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin in Abhängigkeit von der Rhodopsin-Konzentration bei gebleichtem und ungebleichtem Rhodpsin. Die Konzentrationen von ^{3}H-GNP und Transducin waren 8,9 µMol/l bzw. 0,1 µMol/l.

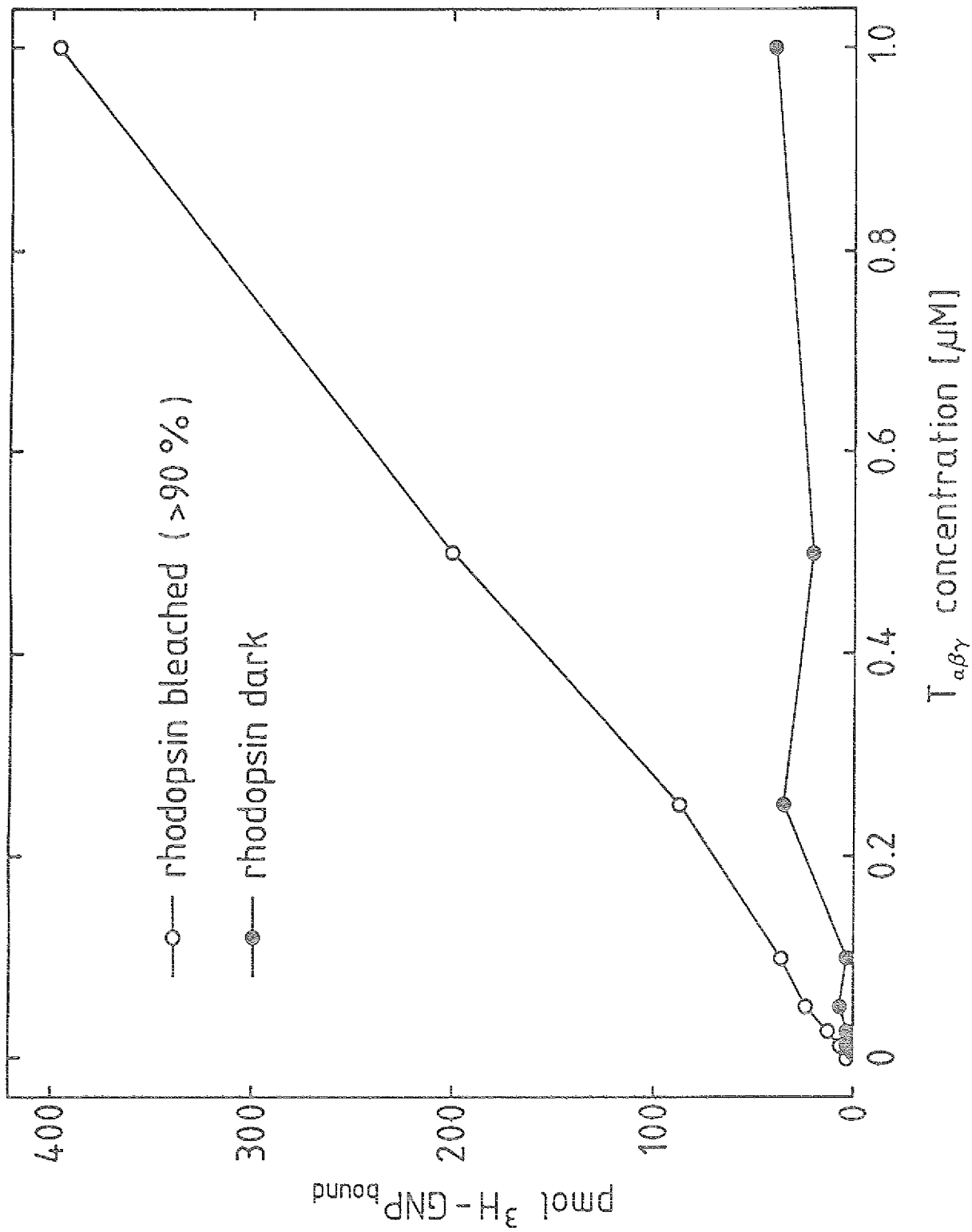


Abb. 3: Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin in Abhängigkeit von der Transducin-Konzentration bei gebleichtem und ungebleichtem Rhodopsin. Die Konzentrationen von Rhodopsin und ^{3}H-GNP waren 1 µMol/l bzw. 8,9 µMol/l.

3.1.3. Nukleotidaustausch-Experimente mit Nukleotid-Überschüssen und ohne katalytisch aktives Rhodopsin

Gibt man zu lichtaktiviertem Rhodopsin $T_{\alpha\beta\gamma}$ und GNP hinzu, führt das zu Nukleotidaustausch-Reaktionen am T_{α} (43, 44, 42, 13, 16). Es wäre denkbar, daß diese Austauschreaktionen auch in Abwesenheit von belichtetem Rhodopsin stattfinden, wenn das Verhältnis von GNP zu $T_{\alpha\beta\gamma}$ wesentlich erhöht ist.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Nukleotidaustausch-Experimente mit ROS-Suspensionen bei schwachem Rotlicht auf Eis durchgeführt. Die Endkonzentration an ^{3}H-GNP betrug 8 bzw. 80 µMol/l bei einer Rhodopsinkonzentration von 1 µMol/l und der korrespondierenden Menge an $T_{\alpha\beta\gamma}$. Der Inkubationszeitraum betrug 20 Minuten. Das Probenvolumen war 500 µl. Abb. 4 zeigt, daß sich die Mengen an gebundenem ^{3}H-GNP deutlich voneinander unterscheiden: 8 µMol/l ^{3}H-GNP führte im Versuch zu 2,3 pMol ausgetauschtem Nukleotid, in Gegenwart der 10fachen Menge an ^{3}H-GNP war dieser Wert auf 14,1 pMol erhöht.

Wie die folgenden Versuche zeigten, beruht dieser Effekt jedoch sehr wahrscheinlich auf einer unspezifischen Bindung von ^{3}H-GNP an die in der Suspension vorhandenen Proteine und/oder einer Bindung an die Millipore-Filter. Mit denaturierten ROS (10 Min bei ca. 95 ^{o}C) wurde in Gegenwart von 80 µMol ^{3}H-GNP ein scheinbarer Nukleotidaustausch von 11,9 pMol gemessen.

In anschließenden Versuchen wurde der Einfluß von Nukleotid-Überschüssen auf die Nukleotidaustausch-Reaktion am T_α gemessen, wobei die Versuchsansätze frei von Rhodopsin waren. Die Experimente wurden bei Tageslicht durchgeführt; die Proben enthielten in einem Volumen von 500 µl den Extrakt E_2 mit einer Konzentration an $T_{\alpha\beta\gamma}$ von etwa 0,1 µMol/l, 8 bzw. 80 µMol/l ^{3}H-GNP und 8 (bzw. 7) und 80 µMol/l ^{35}S-GTP-γS. Folgende Werte in pMol wurden ermittelt (vgl. Abb. 4):

8 µMol/l	^{3}H-GNP	: 1,6 (2,3)
80 µMol/l	^{3}H-GNP	: 10,9 (14,1; 11,9)
7 µMol/l	^{35}S-GTP-γS	: 7,9
80 µMol/l	^{35}S-GTP-γS	: 18,6

In Klammern sind die Werte angegeben, die für die Dunkelaktivierung in ROS ermittelt wurden (s.o.).

Die bisherigen Ergebnisse lassen noch offen, ob T_α durch Nukleotidüberschüsse aktivierbar ist, oder ob die höheren Austauschwerte allein auf unspezifische Bindungen zurückzuführen sind. Weiterhin wäre denkbar, daß der Extrakt E_2 noch Spuren von katalytisch aktivem Rhodopsin enthält. Zur Beantwortung der letzten Frage wurde der Extrakt E_2 in einer Beckman-´air-fuge´ für 5 Minuten bei 160.000 g (27-28 pSi) zentrifugiert, um evtl. noch vorhandenes Rhodopsin zu pelletieren. In Nukleotidaustausch-Experimenten mit 1 % belichtetem Rhodopsin wurde zur Kontrolle ein Teil des so behandelten Extraktes auf seine Funktionstüchtigkeit hin überprüft. Die Experimente mit dem ultra-zentrifugierten Extrakt führten bei

beiden Nukleotid-Konzentrationen zu niedrigeren Werten; ingesamt blieb aber der Austausch bei 80 µMol/l ^{35}S-GTP-γS deutlich höher als bei 8 µMol/l ^{35}S-GTP-γS, so daß Spuren von Rhodopsin letztendlich nicht verantwortlich sind für die unterschiedlichen Austauschreaktionen.

Die folgenden Versuche sollten klären, inwieweit ^{3}H-GNP und ^{35}S-GTP-γS an Proteine und Filtermaterial adsorbieren. Dazu wurden die Nukleotide alleine, zusammen mit E_2 und mit E_2 plus Rhodopsin (bzw. ROS) auf die Filter aufgetragen. Hierbei betrugen die Volumina, die auf die Filter gegeben wurden, ebenfalls 500 µl. Folgende Ergebnisse wurden erzielt (vgl. Abb. 4):

^{3}H-GNP bzw. ^{35}S-GTP-γS wird in geringen Mengen unspezifisch an das Filtermaterial adsorbiert. Enthalten die Proben neben ^{3}H-GNP bzw. ^{35}S-GTP-γS noch Proteine, dann steigt die Menge an gebundenem Nukleosidtriphosphat an. Es kommt also zu unspezifischen Bindungen zwischen Nukleosidtriphosphat und Protein; dabei ist es jedoch weitgehend unerheblich, ob es sich um 8 oder 80 µMol/l Nukleosidtriphosphat-Lösungen handelt: der prozentuale Anteil ist in etwa gleich. Die erhöhten Austauschraten bei erhöhten Nukleotidkonzentrationen sind demnach größtenteils auf Adsorption von ^{3}H-GNP und ^{35}S-GTP-γS an die Filtersubstanz zurückzuführen. Dafür sprechen auch die bereits erwähnten Versuche mit denaturierten ROS-Suspensionen und die Adsorptionsversuche mit 8 und 80 µMol/l ^{35}S-GTP-γS. Abschließend wurde der lichtinduzierte Nukleotidaustausch einer ROS-Suspension mit 7 und

80 µMol/l ^{35}S-GTP-γS ermittelt (Abb. 4). Es wurde mit den in den Experimenten üblichen Mengen (d.h. 1 µMol/l Rh) gearbeitet, der Bleichungsgrad betrug 1 %. 7 µMol/l ^{35}S-GTP-γS führte zu 42,9 pMol ausgetauschtem Nukleotid, 80 µMol/l ^{35}S-GTP-γS zu 63,3 pMol. Zieht man von beiden Werten die für ^{35}S-GTP-γS ermittelten Adsorptionswerte ab, so ergeben sich 37,8 bzw. 49,3 pMol ausgetauschtes Nukleotid. Die Menge an gebundenem ^{3}H-GNP, die in Nukleotidaustauschversuchen ermittelt wird, ist also in der Hauptsache auf eine spezifische Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin zurückzuführen und demzufolge davon abhängig, daß der Reaktionsansatz neben dem Transducin-haltigen Extrakt E_2 auch belichtetes Rhodopsin enthält. Methodisch bedingte unspezifische Bindungen zwischen ^{3}H-GNP und Filtersubstanz bzw. unspezifische Bindungen zwischen ^{3}H-GNP und Protein sind weitgehend unbedeutend.

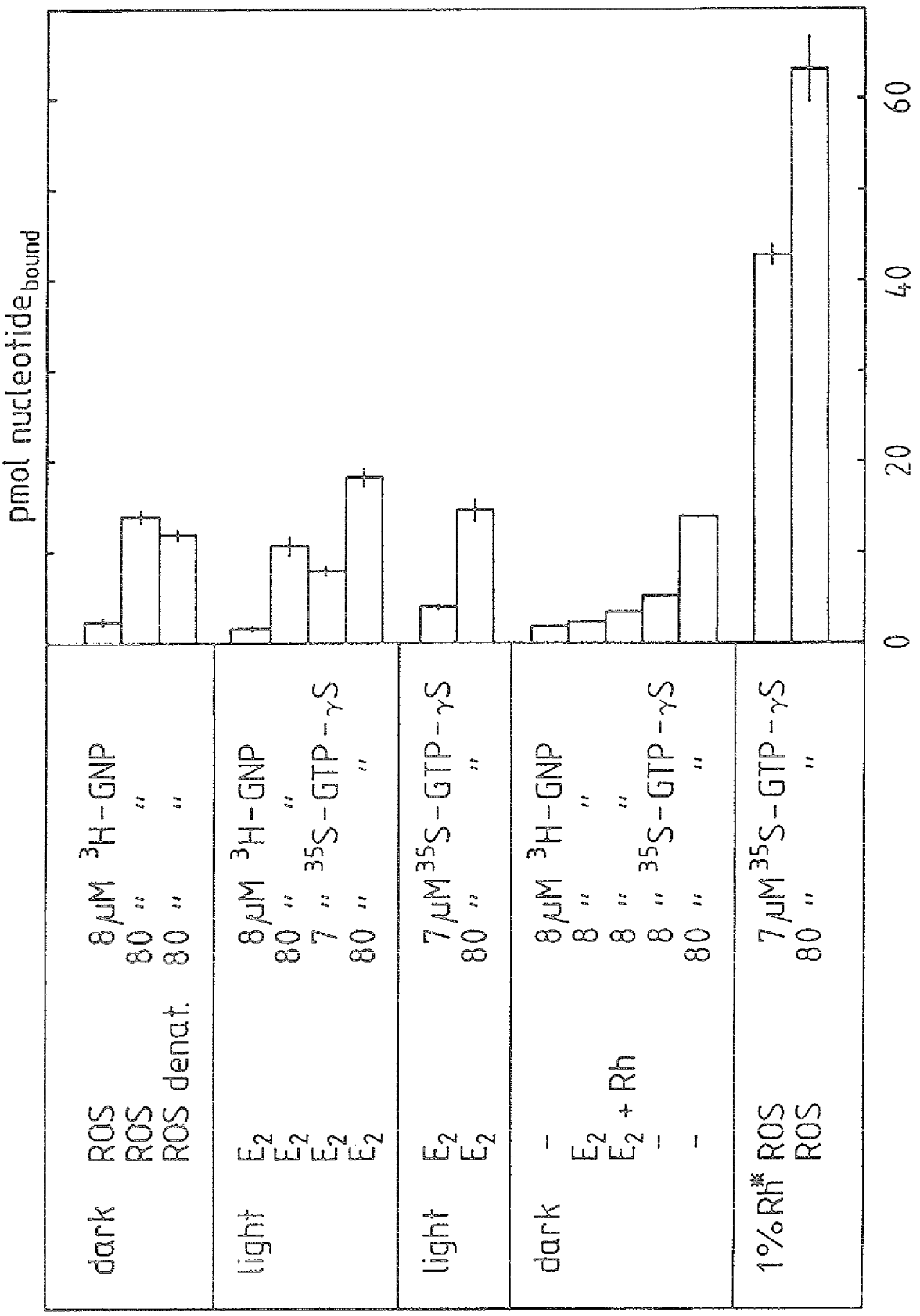


Abb. 4: Spezifische und unspezifische Nukleotidbindung in Abhängigkeit von Belichtung, verwendeter Probe, sowie vom verwendeten Nukleotid und dessen Konzentration. Mittelwerte ± SEM (n = 6). Die Ergebnisse in Spalte 4 sind aus jeweils 2 Versuchen gemittelt. Die Versuche dargestellt in Spalte 3 unterscheiden sich von denen aus Spalte 2 dadurch, daß E_2 bei 160.000 g zentrifugiert wurde.

3.1.4. Versuche zur Verdrängung von proteingebundenem ^{3}H-GNP

Baehr et al. (18) geben für den Komplex T_α-GNP eine Dissoziationskonstante $K_d = 2 * 10^{-7}$ Mol/l an; die K_d für T_α-GDP beträgt ebenfalls $2 * 10^{-7}$ Mol/l. Die Bindung an belichtetes Rhodopsin erhöht die K_d für T_α-GDP von $2 * 10^{-7}$ auf $2 * 10^{-5}$ Mol/l (74), und bei Vorhandensein einer ausreichenden GNP-Konzentration findet der Austausch von GNP gegen GDP statt. Es wäre demnach durchaus möglich, daß ein gebildetes T_α-GNP an ein belichtetes Rhodopsinmolekül bindet, die K_d für T_α-GNP dadurch erhöht wird und ein erneuter Nukleotidaustausch, je nach Konzentrationsverhältnis GNP gegen GNP oder GNP gegen GDP stattfindet. Dieser Möglichkeit sollte vor allem deswegen Beachtung geschenkt werden, weil bei der gewählten Inkubationszeit von 20 Minuten in den Versuchen höhere Bleichungen (über 1 %) im Vergleich zu den Maximalwerten zu einer Herabsetzung des Nukleotidaustausches führten. Wird ein normal behandelter Reaktionsansatz, der zu 1 % belichtet wurde, mit steigenden Mengen bzw. für zunehmende Dauer mit nicht radioaktiv markiertem Nukleosidtriphosphat versetzt, so nimmt die Menge der im Tracer-Experiment gefundenen ^{3}H-GNP-markierten Transducine ab (Tab. II, Abb. 5). Als nichtradioaktive Nukleotide wurden GNP, GTP-γS und GTP benutzt. In den Experimenten, in denen GTP Verwendung fand, wurden im Durchschnitt die niedrigsten Werte für T_α-^{3}H-GNP ermittelt, bei GTP-γS waren sie größer als bei GTP, aber immer noch geringer als bei GNP. Bei Verwendung von GDP führte erst ein 100 facher Überschuß bei einer 10minütigen

Nachinkubation zu deutlich reduzierten ^{3}H-GNP-Werten. Belichtet man die Rhodopsin-Suspension zu 100 statt zu 1 %, wird der Effekt deutlich verstärkt. Bei einem Verhältnis von ^{3}H-GNP zu GNP von 1 : 2 und einer 20minütigen Nachinkubation in nicht radioaktivem Nukleotid sinkt die Menge an gebundenem ^{3}H-GNP von 18,7 pMol bei 1 % Bleichung auf 11,2 pMol bei 100 %. Verglichen mit den Kontrollen enthält die 100 %-Probe noch 44 % der tritiierten Nukleotide. Wurden Proben zu 1 % belichtet, die 8 µMol/l nicht radioaktives GNP enthielten, und nach 20 Minuten die doppelte Menge an ^{3}H-GNP zugefügt (Reaktionszeit erneut 20 Minuten), so wurden nur noch 8,3 pMol an T_α gebundenem ^{3}H-GNP ermittelt; bei zu 100 % belichteten Proben lag der Wert für ^{3}H-GNP bei 14,3 pMol (s. Abb. 5). Dies bestätigt die Vermutung, daß in einer Suspension, die 1 % gebleichtes Rhodopsin enthält, die Wahrscheinlichkeit für eine zweite Nukleotidaustausch-Reaktion geringer ist, als in einer Suspension, in der nahezu alle vorhandenen Rhodopsin-Moleküle belichtet wurden.

Tabelle II: Gegenübergestellt sind die Ergebnisse der Verdrängung von proteingebundenem ^{3}H-GNP (bzw. GNP) durch verschiedene, nicht radioaktiv markierte Nukleotide (bzw. ^{3}H-GNP) bei verschiedenen Inkubationszeiten und Bleichungen von 1 bzw. 100 %. 1 µMol/l Rh, 0,1 µMol/l $T_{\alpha\beta\gamma}$ (geschätzt), 8 (bzw. 16) µMol/l ^{3}H-GNP

^{3}H-GNP: nicht radioaktivem Nukleotid	t_2 (min)	% Bleichung	pMol ^{3}H-GNP$_{bound}$			
			GNP	GDP	GTP-γS	GTP
(nur ^{3}H-GNP)	-	1	27,6			
			25,4			
"	-	100	21,6			
1 : 1	5	1	25,7	25,1	24,1	23,9
1 : 2	5	1	24,0	-	24,2	23,4
1 : 2	20	1	18,7			
1 : 2	20	100	11,2			
1 : 10	5	1	25,4	27,8	23,3	22,7
1 : 10	10	1	26,4	24,9	21,1	21,1
1 : 10	20	1	19,4	-	-	-
1 : 100	5	1	24,3	25,7	21,6	17,3
1 : 100	10	1	23,6	22,6	21,1	17,3
1 : 100	20	1	15,0	-	-	-
1 : 200	5	1	-	22,5	-	-
2 : 1 +	20	1	8,3			
2 : 1 +	20	100	14,3			

+) Die Proben wurden zuerst für 20 Minuten mit nicht radioaktivem GNP inkubiert, dann wurde die doppelte Menge an ^{3}H-GNP dazugegeben.

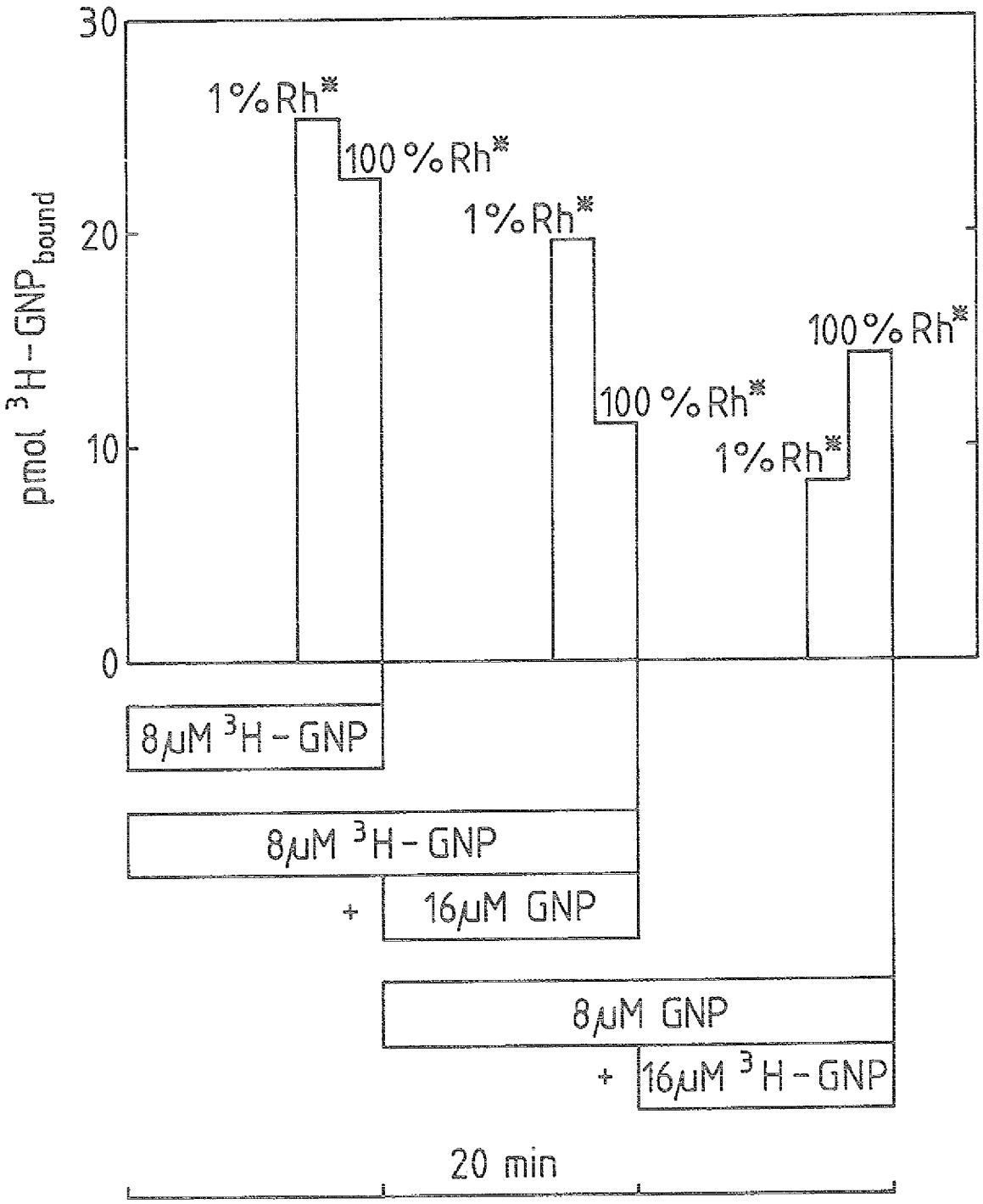


Abb. 5: Wechselwirkungen zwischen ^{3}H-GNP und GNP bei der Bindung an Transducin. Erläuterungen im Text.

3.1.5. Zentrifugationsversuche

Nahezu alle Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen nach Erreichen eines Maximums kein einfaches Sättigungsverhalten: die Menge an gebundenem ^{3}H-GNP nahm zu Bleichungsgraden oberhalb von 1 % ab (s. auch Abschnitt 3.1.4.). Diese Beobachtung sollte durch Zentrifugationsversuche, wie sie im Kapitel 2.6. beschrieben wurden, näher untersucht werden. Wie in den Tracer-Experimenten, zeigte sich auch in den Zentrifugationsversuchen ein Unterschied in der Menge an gebundenem GNP bei 1 und 100 % Bleichung. Die Menge an gebundenem GNP in den Zentrifugationsexperimenten ist proportional der Menge an im Zentrifugations-Überstand vorhandenem T_α (T_α ist solubilisiert als T_α-GNP). 1 % Rhodopsin-Bleichung führt in einem rekonstituierten System, das 1 µMol/l Rhodopsin, 0,1 µMol/l $T_{\alpha\beta\gamma}$ und 8 µMol/l GNP enthält, zu einer 68 %igen Solubilisierung von T_α, d.h. 68 % der eingesetzten T_α-Menge befindet sich als T_α-GNP im Zentrifugationsüberstand. Bei einer 100 %igen Bleichung ist T_α als T_α-GNP nur zu 44 % solubilisiert (vergl. Abb. 6a und 6b).

Der Unterschied in der Menge an gebundenem ^{3}H-GNP bei 1 und 100 % Bleichung liegt in den Tracer-Experimenten im Mittel bei 25 %; aus den Zentrifugationsversuchen (n = 15) ergibt sich bei einer 100 %igen Bleichung eine Reduktion der Solubilisierung um 35 % im Vergleich zur Solubilisierung bei einer 1 %igen Bleichung.

Durch Erhöhung der Nukleotidkonzentrationen von 8 auf 50, 250 und 500 µMol/l GNP sollte untersucht werden, ob

evtl. ein Mangel an GNP für das Ausbleiben eines stabilen Plateaus verantwortlich ist. Bei 1 % Bleichung führten 50 (n = 1), 250 (n = 3) bzw. 500 (n = 5) µMol/l GNP im Vergleich zu 8 µMol/l GNP zu einer vermehrten Solubilisierung von T_α-GNP (s. Abb. 6b).

Bei 100 % Bleichung führten GNP-Konzentrationen von 50 (n = 1), 250 (n = 5) bzw. 500 (n = 12) µMol/l im Vergleich zu 8 µMol/l GNP ebenfalls zu einer vermehrten Solubilisierung von T_α als T_α-GNP (s. Abb. 6b), jedoch in geringerem Maße, als es in den Versuchen mit 1 % Bleichung der Fall war.

Die Ergebnisse zeigen, daß durch Erhöhung der GNP-Konzentration vermehrt T_α-GNP gebildet wurde, vor allem dann, wenn die Rhodopsin-Suspension zu 100 % gebleicht wurde. Der deutliche Unterschied in der T_α-Solubilisierung zwischen 1 und 100 % gebleichtem Rhodopsin bei 8 µMol/l GNP wird durch Erhöhung der GNP-Konzentration auf 50 µMol/l und mehr reduziert. Für alle Nukleotidkonzentrationen bleibt jedoch der Befund bestehen, daß eine 1 %ige Bleichung zu einer höheren Solubilisierung von T_α führt als eine 100 %ige Belichtung. Die Abnahme des Nukleotidaustausches bei Rhodopsin-Bleichungen oberhalb 1 % läßt sich also nicht vollständig durch einen GNP-Mangel erklären.

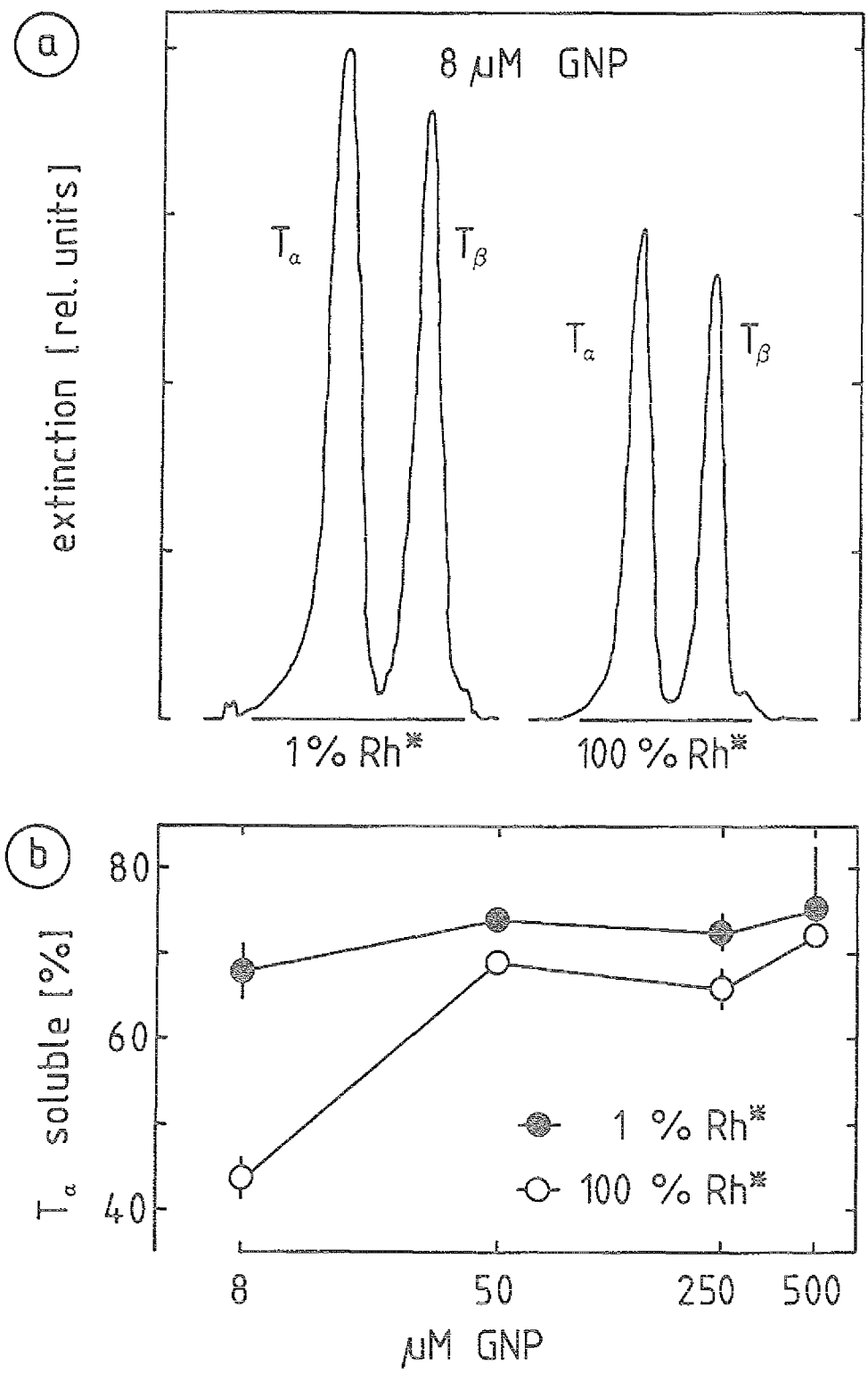


Abb. 6: Solubilisierung von T_α (T_β) in Zentrifugationsexperimenten in Abhängigkeit von Bleichung und GNP-Konzentration bei einer Rhodopsinkonzentration von 1 µMol/l und der korrespondierenden Menge an Transducin. Gefriergetrocknete, in SDS-Cocktail resolubilisierte Zentrifugationsüberstände wurden auf Gele aufgetragen.

a) Gel-Scanning zur Ermittlung der Solubilisierung von T_α (T_β) nach 1 bzw. 100 % Rh*.

b) Solubilisierung von T_α nach 1 bzw. 100 % Rh* als Funktion der GNP-Konzentration. Die Werte für T_α soluble (%) wurden aus den Gelscans ermittelt.

3.2. Nukleotidaustauch-Experimente mit kompletten ROS

Die Funktion des Rhodopsins beim lichtinduzierten Nukleotidaustausch am Transducin sollte durch gezielte proteolytische Modifikationen am Rhodopsinmolekül charakterisiert werden.

Vor den Proteolysen wurde Rhodopsin von löslichen und peripher gebundenen Proteinen getrennt (s. Abschnitt 2.3.), da nur Rhodopsin und nicht auch andere ROS-Proteine verdaut werden sollten.

Das Verhalten von kompletten ROS, dem eigentlichen Ausgangsmaterial für die anschließenden Proteolysen, wurde im Vergleich zu den im Folgenden benutzten rekonstituierten Systemen im Nukleotidaustausch-Experiment überprüft.

Abb. 7 zeigt eine aus 6 Versuchen gemittelte Dosis-Wirkungs-Kurve für ROS-Suspensionen. Jedem Versuchspunkt liegt eine Menge von 500 pMol Rhodopsin zugrunde. Belichtung von 1 % des in der Suspension vorhandenen Rhodopsins führt zu einem Maximum in der Nukleotidaustausch-Reaktion. Dabei katalysieren 5 pMol gebleichtes Rhodopsin den Austausch von 33,4 pMol ^{3}H-GNP gegen zuvor gebundenes GDP (die Austauschrate im Dunkeln beträgt 5,4 pMol ^{3}H-GNP), d.h. ein gebleichtes Rhodopsin-Molekül katalysiert im Mittel 5,6 Nukleotidaustausch-Reaktionen.

Der Bleichungsgrad, der zu 1/2 maximalen Austauschen führt, wurde aus der Kurve ermittelt. Ein Austausch von

14 pMol ^{3}H-GNP ((Maximalwert - Dunkelwert) /2) fand dann statt, wenn 0,0229 % des Rhodopsins belichtet waren. Das bedeutet, daß ein gebleichtes Rhodopsin-Molekül beim halbmaximalen Bleichungsgrad 122 Nukleotidaustausch-Reaktionen katalysiert.

3.3. Nukleotidaustausch-Experimente mit rekonstituierten Systemen

3.3.1. Experimente mit Diskmembranen und löslichen Proteinen

Rhodopsin-haltige Diskmembranen und der Extrakt E_1, der lösliche Proteine enthält, wurden für die Aufzeichnung von Dosis-Wirkung-Beziehungen in Hepespuffer mittlerer Ionenstärke rekonstruiert. Ansonsten wurden die Versuche so durchgeführt, wie es in Abb. 1 (S. 17) dargestellt ist.

Abb. 7 zeigt, daß Rhodopsin zusammen mit dem Extrakt E_1 nicht zu Nukleotidaustausch-Reaktionen führt. Dies entspricht der Erwartung, da der Extrakt E_1 kein Transducin enthält.

3.3.2. Experimente mit Diskmembranen und peripher gebundenen Proteinen

Wurden Diskmembranen statt mit dem Extrakt E_1 mit dem Extrakt E_2 rekonstituiert, der neben der PDE in der Hauptsache $T_{\alpha\beta\gamma}$ enthält, entsteht ein völlig anderes

Bild. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigt jetzt einen ähnlichen Verlauf wie die komplette ROS-Suspension (Abb. 7). Das Maximum der Nukleotidaustausch-Reaktion liegt wie für das nicht rekonstituierte System bei 1 % belichtetem Rhodopsin. Im Mittel ergibt sich dabei ein Austausch von 5,2 pMol ^{3}H-GNP pro gebleichtem Rhodopsin, ähnlich wie bei ROS. Der 1/2 maximale Austausch mit 13,1 pMol wurde bei einem Rhodopsin-Bleichungsgrad von 0,0372 % erreicht, d.h., daß im Mittel ein gebleichtes Rhodopsin-Molekül 70 Nukleotidaustausche katalysiert.

Bei einem Bleichungsgrad von 0,001 % ergibt sich ein Nukleotidaustausch-Wert über dem ´dark background´ von 220 Austauschen pro Rh* bei ROS; beim rekonstituierten System ergab sich ein Verhältnis von 321 : 1.

3.4. Proteolytische Modifikationen am Rhodopsin mit Hilfe verschiedener Enzyme

In Vorversuchen wurden die katalytischen Eigenschaften von gebleichtem Rhodopsin hinsichtlich des Nukleotidaustausches am T_α untersucht. Die in Kapitel 3.2. und 3.3. beschriebenen Experimente mit kompletten ROS und rekonstituierten Systemen (Diskmembranen + E_2) bildeten die Kontrolle für die im Folgenden mit proteolysierten rekonstituierten Systemen durchgeführten Versuche. Anhand von schrittweise durchgeführten Proteolysen mit Enzymen, die unterschiedliche Wirkungsspezifitäten aufweisen, sollte der Bereich am Rhodopsinmolekül identifiziert werden, der zur Aktivierung von T_α führt. Die folgenden Anforderungen wurden dafür an die benutzten

Proteasen gestellt:

- sie sollten möglichst wenige Stellen im Molekül gleichzeitig angreifen,
- die erzielten Proteolysegrade sollten weitgehend vollständig sein,
- die Proteasen sollten gut inhibierbar sein.

3.4.1. Strategie der Proteolyse mit Thermolysin, Carboxypeptidase Y und Staphylococcus aureus-Protease

Bei Verwendung der oben genannten Proteasen wurde die folgende Strategie zur Rhodopsinproteolyse benutzt:

Thermolysin wurde eingesetzt zur Entfernung der ersten 12 C-terminalen Aminosäuren (Th(short)) (s. Abb. 8).

In einem zweiten Proteolyseschritt wurden weitere 9 C-terminale Aminosäuren und Aminosäuren aus dem 3. extradiscalen Loop entfernt (Th(long)) (s. Abb. 8).

Bei Verwendung von Thermolysin unter long-term Bedingungen wird Rhodopsin an drei Stellen angegriffen (s. Abb. 8), und zwar einmal C-terminal und zweimal im Loop zwischen den Helices 5 und 6. Jeder einzelne Eingriff oder Kombinationen dieser drei Modifikationen können verantwortlich sein für veränderte katalytische Aktivitäten des Rhodopsins.

Mit Hilfe der Carboxypeptidase Y, eingesetzt nach Thermolysin short-term Behandlung, sollte geklärt werden, ob der C-terminale Bereich von Thr 13′ bis Leu 21′ wichtig ist für die katalytische Aktivität des Rhodopsins.

Staphylococcus aureus-Protease sollte Aufschluß darüber geben, ob ein einzelner Schnitt in den 3. extradiscalen Loop die Rhodopsineigenschaften beeinflußt (Thermolysin schneidet an zwei Stellen in den 3. extradiscalen Loop, was zur Entfernung von Aminosäuren führt).

Eine Nachbehandlung des Proteolyseproduktes mit Carboxypeptidase Y sollte klären, welchen Einfluß die Entfernung von Aminosäuren aus dem Loop auf die katalytischen Eigenschaften des Rhodopsins hat.

Anhand von Nukleotidaustausch-Experimenten, die Aufschluß über die Dosis-Wirkungsbeziehung geben, wurde die katalytische Aktivität der einzelnen Präparationen überprüft (siehe dazu Abb. 10 und 11) (69).

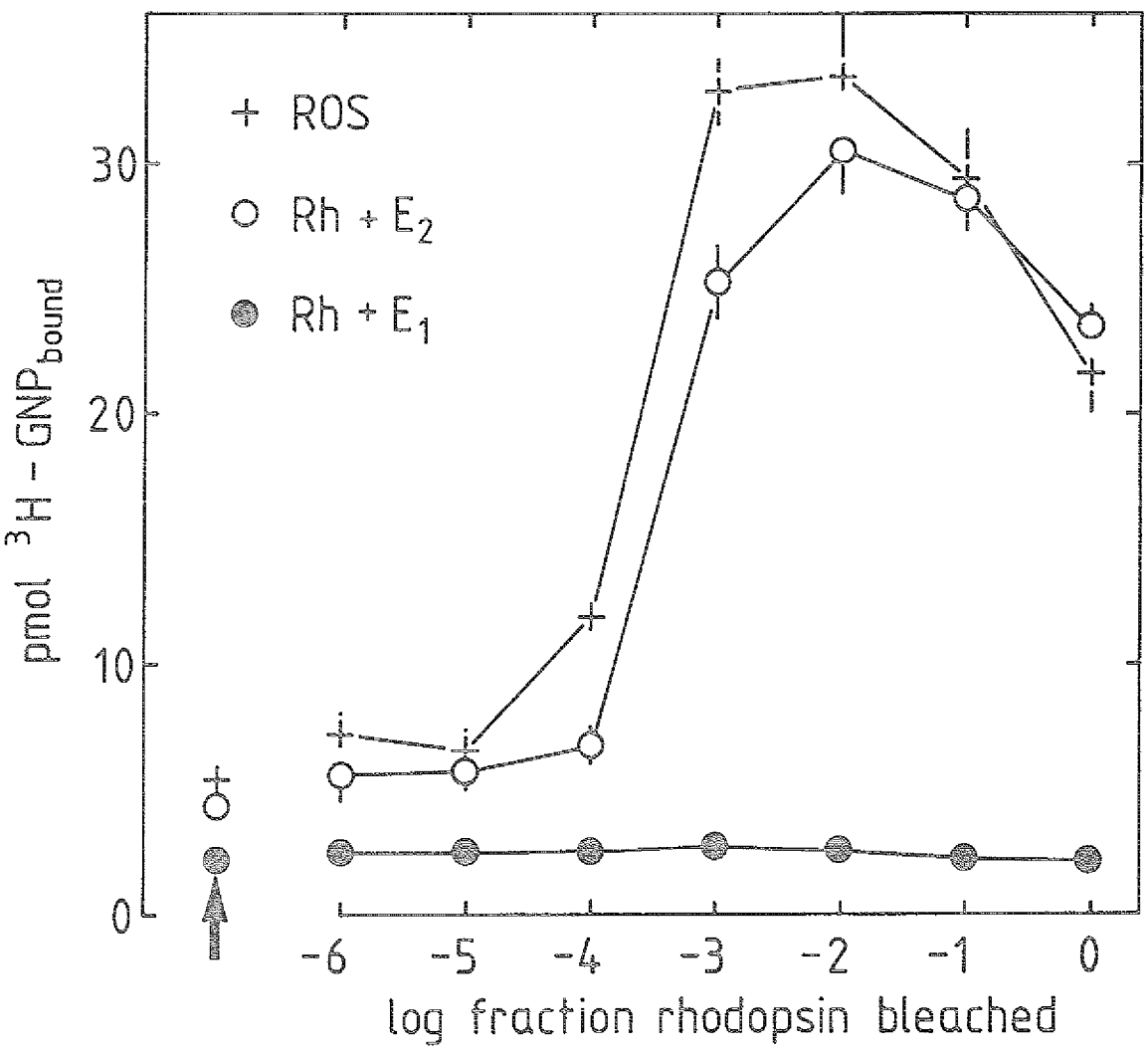


Abb. 7: Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin als Funktion des Rhodopsin-Bleichungsgrades gemessen mit ROS (n = 6) und mit rekonstituierten Systemen; die Rhodopsinkonzentration in Experimenten mit ROS und dem rekonstituierten System war 1 µMol/l, die Konzentration an $T_{\alpha\beta\gamma}$ im E_2 war 0,1 µMol/l (geschätzt). Die Proteine im E_1 waren so konzentriert, daß bei Vorhandensein von $T_{\alpha\beta\gamma}$ in diesem Extrakt dieses etwa 0,1 µMol/l gewesen wäre.

Rh + E_2 = Diskmembranen + peripher gebundene Proteine (n = 8)

Rh + E_1 = Diskmembranen + lösliche Proteine (n = 5).

Mittelwerte ± SEM, ↑ bezeichnet die Dunkelwerte.

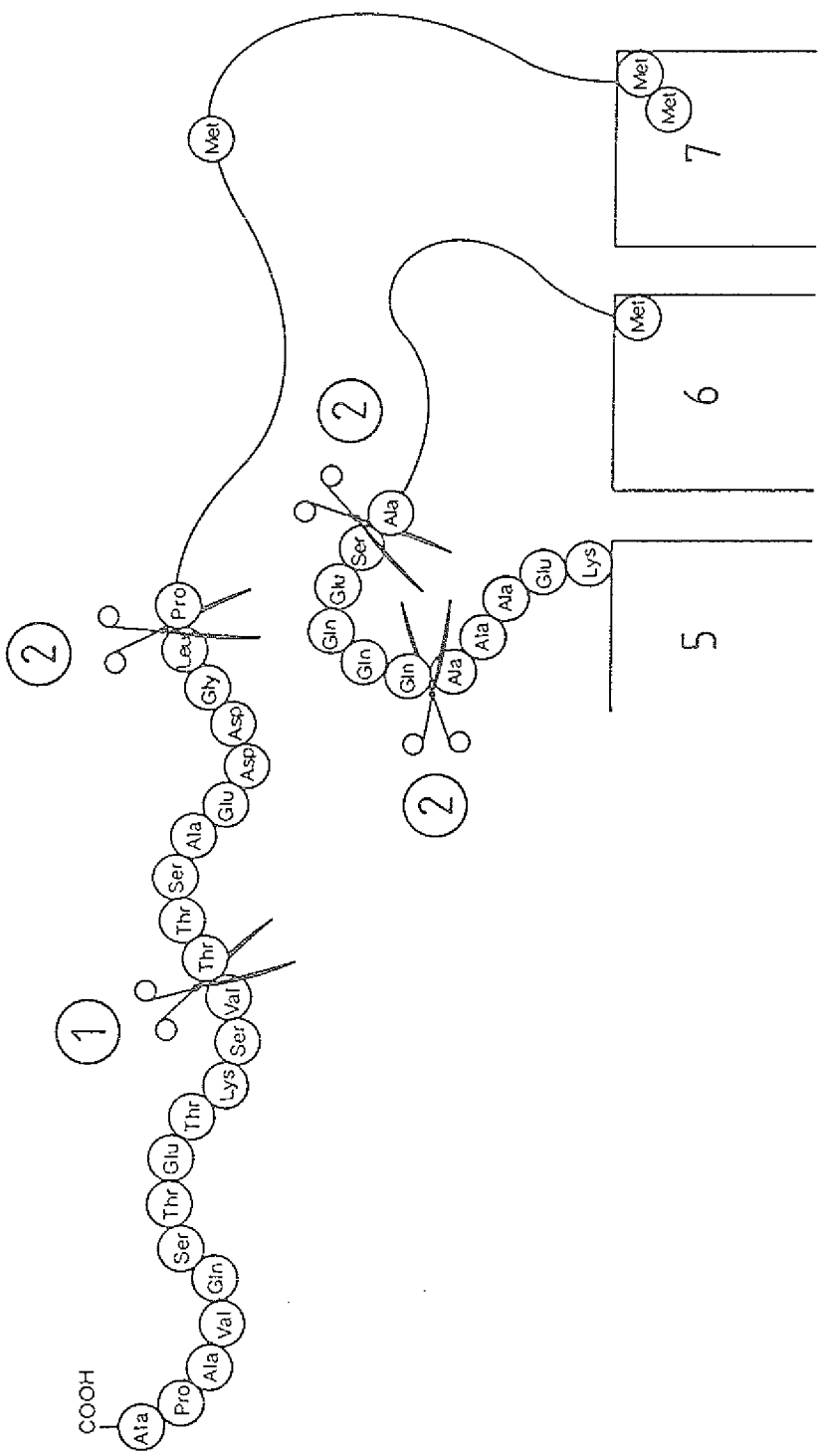


Abb. 8: Schematische Darstellung des C-terminalen Bereichs des Rhodopsinmoleküls, sowie des Bereichs zwischen Helix 5 und 6 (nach Hargrave, P.A. et al. 1983, verändert).
1 Angriffspunkt von Thermolysin unter short-term Bedingungen
2 unter long-term Bedingungen. Der Angriffspunkt 2 in den Loop wird an dieser Stelle vermutet (Hargrave, P.A., pers. Mitteilung).

3.4.2. Proteolyseergebnisse

Anhand von Rundgelen wurde der Proteolysegrad nach Thermolysin(short)- und Thermolysin(long)-Behandlung hinsichtlich des Proteolyseerfolges begutachtet (s. Abb. 9).

Dabei stellte sich heraus, daß die Th(short)-Präparation nicht zu einheitlichen Produkten führte. Bei vergleichsweise milden Bedingungen, Th : Rh = 1 : 400 und 30minütiger Inkubation wurden Reste unverdauten Rhodopsins (etwa 20 - 30 % des zur Proteolyse eingesetzten Rhodopsins blieb unverdaut) sichtbar. Bei einem Verhältnis Th : Rh = 1 : 200 und 60 Minuten Inkubation traten Proteolyseprodukte auf (zu etwa 20 - 30 %), wie sie nach einer Th(long)-Behandlung beobachtet wurden. Für die Thermolysin long-term Proteolyse wurden die erwarteten Ergebnisse erzielt. Die Spaltprodukte F_1 und F_2 ergaben sich in quantitativem Maße.

Das Enzym Carboxypeptidase Y sollte von den Th(short)-behandelten Rhodopsinen die Aminosäuren Thr 13′ bis Leu 21′ entfernen. Qualität und Quantität dieses Proteolyseschrittes waren schwer anhand von Gelen zu beurteilen. Im Bereich des Molekulargewichtes von Th(short) zeigte sich ein diffuser Bereich. Die Carboxypeptidase-Behandlung hat also nicht zur Entstehung eines einheitlichen Produktes geführt. Anderenfalls wäre eine deutliche Proteinbande auf dem Gel zu sehen gewesen. Spuren von Protein waren im Molekularbereich von F_1 zu sehen (s. Th(short)-Präparation). Ebenfalls schwierig zu

beurteilen sind die Ergebnisse aus der Aminosäureanalyse, da die Carboxypeptidase ein Proteingemisch vorfand, das sich aus unterschiedlichen Mengen der folgenden Produkte zusammensetzt (s. Tab. IV):

1) nicht proteolysiertes Rhodopsin
2) Th(short) des (1′ - 12′)
3) Th(long) des (12′ - 21′) und Th(long), wobei nur die Peptidbindung zwischen Ala 108′ und Ser 109′ hydrolysiert ist.

An allen C-Termini greift die Carboxypeptidase an. Das führt vor allem dazu, daß Aminosäuren aus der Loopregion entfernt werden. Daß Thermolysin zur Bildung der beiden Spaltprodukte F_1 und F_2 geführt hat, zeigt die Menge an vorkommendem Gln in der Aminosäureanalyse.

Auf Gelen konnte eine quantitative Wirkung von Staphylococcus aureus-Protease auf Rhodopsin nachgewiesen werden. Wurden nach Carboxypeptidase Y-Behandlung V8- und V8Cp-Rhodopsin zusammen auf Rundgele aufgetragen, traten Doppelbanden auf (s. Abb. 9).

Die Beurteilung der V8Cp-Präparation anhand der Aminosäureanalyse war schwierig (s. Tab. IV):

A) Unter der Voraussetzung, daß ausschließlich des (1′ - 7′) = V8-Rhodopsin zur anschließenden Carboxypeptidase-Proteolyse eingesetzt wurde, enthielte der C-Terminus noch ein Ala (Ala 16′). Entsprechend der zur Carboxypeptidase Y-Proteolyse eingesetzten Menge

an V8-Rhodopsin wären das 67 nMol. Hätte die Carboxypeptidase von Glu 8′ ausgehend bis einschließlich Ala 16′ alle Aminosäuren zu 100 % entfernt, so würden von den 136 nMol Ala, die in der Aminosäure-Analyse gefunden wurden, 67 nMol vom C-Terminus stammen. Es blieben noch 69 nMol Ala übrig, die entweder anteilig von Ala 114′ - 116′ stammen könnten oder möglicherweise dem vollständig aus der Loopregion freigesetzten Ala 114′ entsprechen.

B) Wäre Ala 16′ am C-Terminus durch die Carboxypeptidase Y lediglich zu etwa 75 % entfernt worden (Gly 20′ ist zu 53 % entfernt), so würden 50 nMol von der Gesamtmenge an in der Aminosäureanalyse gefundenem Ala vom C-Terminus stammen. Für die Ala 114′ - 116′ verblieben dann 86 nMol. Eine Entfernung aller 3 Ala aus dieser Region hätte in der Aminosäureanalyse zu 201 nMol Ala führen sollen. Im Durchschnitt wären demnach 43 % der Ala 114′ - 116′ entfernt. Wäre Ala 114′ zu 100 % entfernt (67 nMol), könnte Ala 115′ noch zu etwa 10 % abgespalten sein.

Nach Behandlung mit Staphylococcus aureus-Protease ist zu erwarten, daß der Rhodopsin-C-Terminus frei von Gln sein sollte. Das gesamte in der Aminosäureanalyse vorkommende Gln sollte demzufolge aus der Loopregion stammen. Hier befinden sich 3 Gln, und zwar Gln 111′ - 112′ - 113′; bei 67 nMol eingesetztem Rhodopsin sollten bei 100 %iger Entfernung dieser Gln 201 nMol Gln in der Aminosäureanalyse zu finden sein.

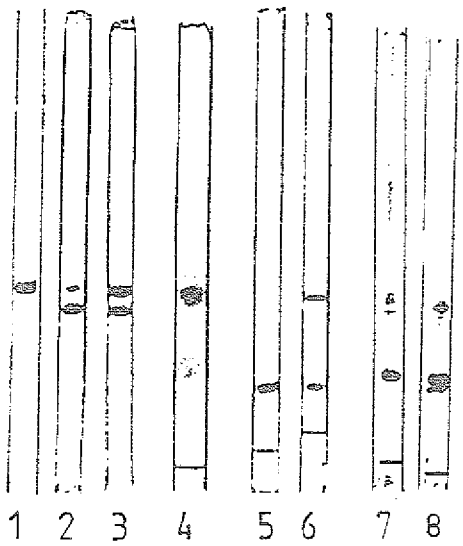


Abb. 9: Darstellung von Proteolyseergebnissen nach Behandlung mit Thermolysin, Carboxypeptidase Y und Staphylococcus aureus-Protease.
Gel 1: 5 µg Rh (Diskmembranen), Gel 2: Th(short), (das Verhältnis von Rh : Thermolysin betrug 1 : 400, bei 30minütiger Inkubation, 5 µg wurden auf das Gel aufgetragen), Gel 3: Rh + Th(short) (je 5 µg), Gel 4: Th(short)Cp (8 µg), Gel 5: Th(long) (6 µg), Gel 6: Th(long) + Rh (5 bzw. 3 µg), Gel 7: V8 (6 µg), Gel 8: V8 + V8Cp (je 6 µg).

Tatsächlich gefunden wurden 51 nMol. Da die Gln-Werte in Aminosäureanalysen aufgrund einer säurekatalysierten Cyclisierung unter den Versuchsbedingungen um 10 - 15 % zu niedrig ausfallen (Dr. Föhles, pers. Mitteilung), würde sich die Menge an Gln auf etwa 56 - 59 nMol erhöhen. Es wurden demnach knapp 30 % der erwarteten Gln-Menge gefunden, wovon der größte

Teil auf die Entfernung von Gln 111′ zurückzuführen sein dürfte.

3.5. Nukleotidaustausch-Experimente mit verschiedenen enzymatisch modifizierten Rhodopsinen

3.5.1. Versuche mit Thermolysin-modifiziertem Rhodopsin

In Tabelle III sind alle Ergebnisse aufgeführt, die mit den proteolysierten Präparationen in Nukleotidaustausch-Experimenten erzielt wurden. In Abb. 10 sind die entsprechenden Ergebnisse graphisch dargestellt.

Bei Th(short) hat sich die Lage des Maximums der Nukleotidaustausche gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Es liegt weiterhin bei 1 % belichtetem Rhodopsin; ein Th(short) katalysiert dabei 5,4 Nukleotidaustausch-Reaktionen. Anders nach Th(long)-Behandlung: hier tritt das Maximum der Nukleotidaustausch-Reaktion erst auf, wenn 10 % der Rhodopsine gebleicht wurden. Das heißt, 50 pMol gebleichtes Rhodopsin werden benötigt, um 33 pMol ^{3}H-GNP gegen GDP auszutauschen; der Dunkelwert beträgt 7,3 pMol ^{3}H-GNP. Im Maximum tauscht 1 pMol gebleichtes Rhodopsin demnach durchschnittlich 0,51 pMol ^{3}H-GNP aus. Daß überhaupt noch eine maximale Nukleotidaustausch-Reaktion erzielt wird, liegt wohl daran, daß die Th(long)-Präparation nicht ausschließlich aus katalytisch defektem Rhodopsin besteht, sondern noch einen Rest an funktionell intaktem Rhodopsin enthält. Zur Erzielung von Austausch-Maxima reicht es aus, wenn dieser Rest an funktionsfähigem Rhodopsin etwa 1 % beträgt.

Im Vergleich zu den Kontrollen mit 70 Austauschreaktionen pro gebleichtem Rhodopsin benötigt die Th(long)-Präparation mit 1,5 ^{3}H-GNP$_{b}$/ 1 Rh* etwa 47mal mehr belichtetes Rhodopsin, um die gleiche Menge an Nukleotidaustausch-Reaktionen zu katalysieren. Da aber zur Katalyse der 1/2maximalen Reaktion ein gebleichtes Rhodopsin ausreicht, wären in der Th(long)-Präparation 46 Rhodopsine katalytisch defekt, also etwa 98 %, allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die katalytische Aktivität der proteolysierten Rhodopsine Null ist. Sollten die modifizierten Rhodopsine jedoch noch Aktivitäten in geringem Maße besitzen, dann würde diese Annahme so nicht gelten. Die Th(short)-Präparation scheint im Bereich 1/2maximaler Austauschraten im Vergleich zur Kontrollpräparation eine um etwa 25 % erhöhte katalytische Aktivität zu besitzen: 1 gebleichtes, modifiziertes Rhodopsin katalysiert 94 Nukleotidaustausch-Reaktionen, gegenüber 70 Nukleotidaustauschen pro Rh* in der Kontrollpräparation.

Bei einem Bleichungsgrad von 0,001 % ergibt sich bei der Th(short)-Präparation ein Austauschwert über dem ´dark background´ von 180 ausgetauschten ^{3}H-GNP pro gebleichtem Rhodopsin. Für die Th(long)-Präparation kann dieser Wert nicht ermittelt werden, da erst bei einer Rhodopsinbleichung von 0,1 % Austauschwerte ermittelt werden, die über dem ´dark background´ liegen.

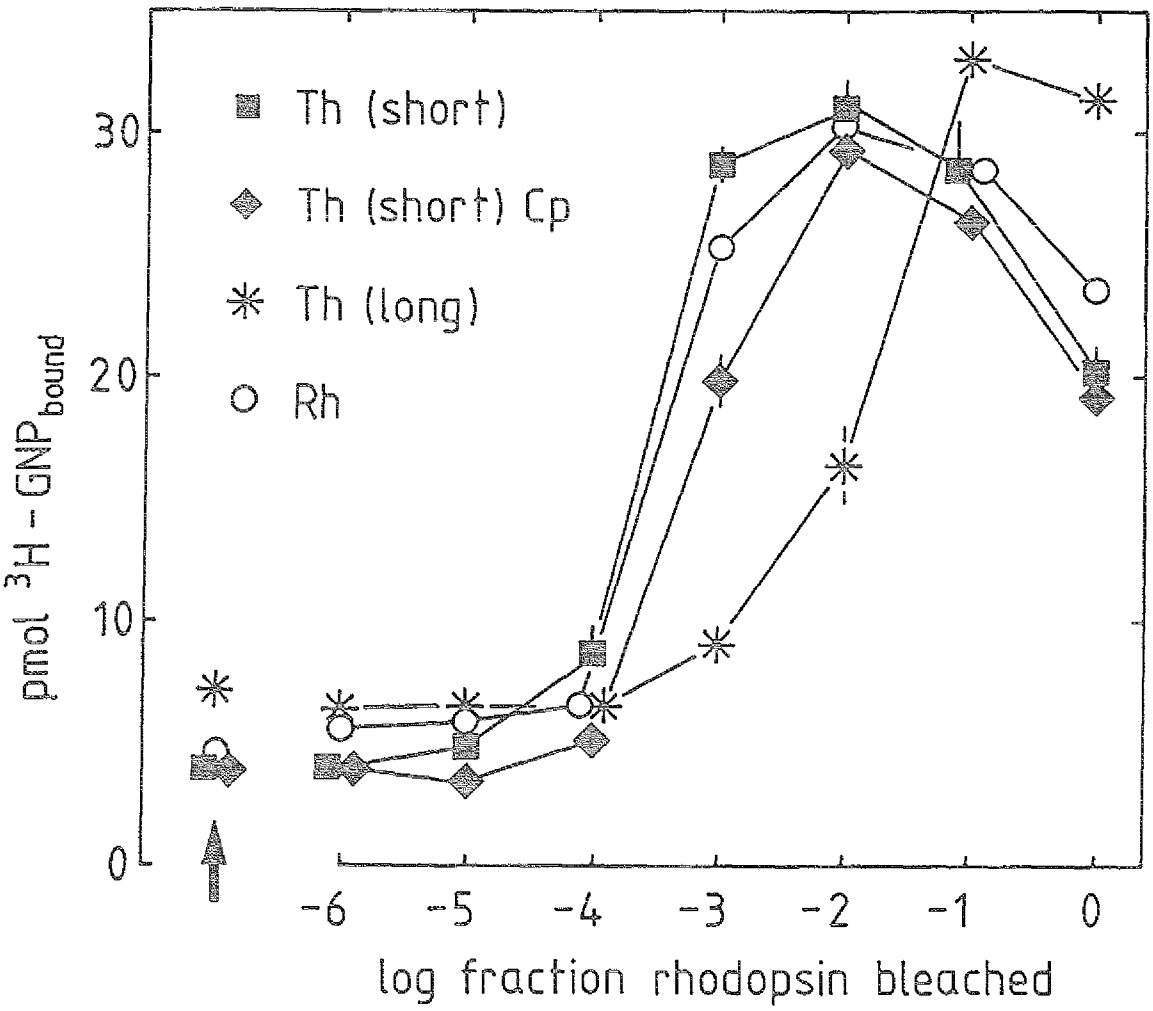


Abb. 10: Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin als Funktion des Rhodopsin-Bleichungsgrades in rekonstituierten Systemen nach verschiedenen Proteolysen bei einer 1 µMol/l Rhodopsinkonzentration, der korrespondierenden Menge an Transducin und 8 µMol/l ^{3}H-GNP.

Th(short) = Thermolysin short-term behandeltes Rh (n = 4)

Th(short)Cp = Thermolysin short-term + Carboxypeptidase Y behandeltes Rh (n = 10)

Th(long) = Thermolysin long-term behandeltes Rh (n = 6)

Rh = unverdautes Rhodopsin, vgl. Abb. 6 (n = 8)

Mittelwerte ± SEM. Aus Gründen der Darstellung wurde SEM für Rh nicht eingezeichnet. ↑ bezeichnet die Dunkelwerte.

Die Ergebnisse, die mit Th(short) erhalten wurden, zeigten, daß eine Entfernung von 12 C-terminalen Aminosäuren keinen negativen Einfluß auf die katalytischen Eigenschaften von Rhodopsin hat (65, 75, 67). Proteolyse mit Thermolysin unter long-term-Bedingungen hingegen führt zu einer drastischen Reduzierung der katalytischen Aktivität der Präparation. Da Thermolysin hierbei das Rhodopsinmolekül an zwei verschiedenen Bereichen angreift (s. Abb. 8), gibt es vier Möglichkeiten für den Verlust der katalytischen Aktivität beim Übergang von Th(short) zu Th(long):

1) die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Ala 108′ und Ser 109′;
2) die zusätzliche Entfernung von Aminosäuren aus dieser Loopregion;
3) die C-terminale Entfernung der Aminosäuren Thr 13′ bis Leu 21′;
4) eine Kombination aus den drei ersten Möglichkeiten.

Mit Hilfe der Th(short)Cp-Präparation sollte die dritte Möglichkeit näher untersucht werden. Thermolysin-short-term-proteolysiertes Rhodopsin wurde dazu mit Carboxypeptidase Y einer weiteren Proteolyse unterzogen (Abschnitte 2.5. und 3.5.). In der Hauptsache entstand Th(short)Cp, aber in geringen Mengen traten auch andere Produkte auf, und zwar Th(short)Cp, das weiter bzw. weniger weit als des (13′ - 21′) verdaut war, und eine Art "Th(long)", wobei die Carboxypeptidase Y Aminosäuren aus der Loopregion entfernt hat, nachdem zuvor Thermoly-

sin unter short-term-Bedingungen bei einigen Molekülen die Peptidbindung Ala 108′ - Ser 109′ hydrolysiert hat.

Die Nukleotidaustausch-Experimente (n = 10) führten zu folgenden Ergebnissen:

Das Maximum der Austauschreaktion tritt bei Th(short)Cp wie bei Rhodopsin und Th(short) auf, wenn 1 % des in der Suspension vorhandenen Rhodopsins gebleicht wurde (Abb. 10), ein Rhodopsin katalysiert dabei den Austausch von 5,1 ^{3}H-GNP.

Der Verstärkungsgrad bei 0,001 % Bleichung kann nicht bestimmt werden, da erst ab 0,01 % Austauschwerte über dem ′dark background′ ermittelt wurden.

Bei Bleichungsgraden, die zu 1/2maximalem Nukleotidaustausch führen, katalysiert 1 Rh* der Th(short)Cp-Präparation nur 40 Austauschreaktionen, im Vergleich zu 94 bzw. 70 Austauschreaktionen pro Rh* bei Th(short) und Kontrolle.

Im Vergleich zu den Kontrollen benötigt die Th(short)Cp-Präparation 1,75mal mehr belichtetes Rhodopsin für den gleichen Nukleotidaustausch, das bedeutet, daß ein Teil der in der Präparation vorhandenen Rhodopsine katalytisch inaktiv ist.

Ein Versuch, die unterschiedlichen Anteile an proteolysiertem Rhodopsin in der Th(short)Cp-Präparation über Gel-scanning (λ = 580 nm) grob abzuschätzen, führte für

Loop-modifiziertes Rhodopsin zu einem Anteil von 30 %. Versuche, die Proteolysebedingungen abzuschwächen (Thermolysin : Rhodopsin = 1 : 400, 30 Min), um dadurch die Menge an Th(long) zu reduzieren, führte dazu, daß der Anteil an unverdautem Rhodopsin etwa 30 % betrug. Gleichzeitig trat Th(long) noch immer zu etwa 5 % in der Präparation auf. Diese Ergebnisse wurden durch Scannen von Rundgelen bei λ = 580 nm erhalten.

Es ist somit nicht möglich, durch die Th(short)Cp-Präparation eine Entscheidung über die Lokalisation des katalytisch aktiven Bereichs zu treffen, auch wenn dieser nach den bisherigen Befunden mit einiger Wahrscheinlichkeit in der Loopregion zwischen den Helices 5 und 6 zu vermuten ist.

3.5.2. Versuche mit Staphylococcus aureus-Protease-modifiziertem Rhodopsin

Welchen Einfluß die bloße Hydrolyse der Peptidbindung Ser 109′ - Glu 110′ hat, wurde mit dem Enzym Staphylococcus aureus-Protease untersucht (zur Proteolyse s. Kapitel 2.5.). Staphylococcus aureus-Protease entfernt zwar gleichzeitig die ersten 7 C-terminalen Aminosäuren vom Rhodopsin, daß dies aber keinen negativen Einfluß auf die Katalyseeigenschaften hat, zeigen die Ergebnisse mit Th(short).

Nukleotidaustausch-Experimente führten zu den in Tabelle III und Abbildung 11 aufgeführten Ergebnissen. Maximaler Nukleotidaustausch tritt für die mit Staphylococcus

aureus-Protease modifizierte Präparation sowohl bei 1 als auch bei 10 % gebleichtem Rhodopsin auf, die Austauschwerte sind mit 30,7 und 30,8 pMol ^{3}H-GNP nicht zu unterscheiden. Wurden die Suspensionen zu 1 % gebleicht, katalysiert ein gebleichtes Rhodopsin 5,2 Nukleotidaustausch-Reaktionen. Die entsprechenden Werte bei Rh, Th(short) und Th(short)Cp waren 5,2 : 5,4 und 5,1 Austausche pro Rh*.

Bei Bleichungsgraden, die zu 1/2maximalem Nukleotidaustausch führen, katalysiert 1 Rh* der V8-Präparation 71 Austauschreaktionen.

Die V8-Rhodopsine verhalten sich in den Nukleotidaustausch-Experimenten wie die Kontrollrhodopsine.

Bei einem Bleichungsgrad von 0,001 % ergibt sich eine Austauschrate über dem ´dark background´ von 440 ausgetauschten ^{3}H-GNP pro gebleichtem Rhodopsin. Es kann nunmehr die Aussage gemacht werden, daß die Hydrolyse der Peptidbindung Ser 109´ - Glu 110´ im Loop zwischen den Helices 5 und 6 keinen Einfluß auf die Katalyseeigenschaften von Rhodopsin hat.

Ob die Entfernung von Aminosäuren ausgehend von Glu 110´ zum Verlust der katalytischen Fähigkeiten des Rhodopsins führt, sollte mit der V8Cp-Präparation geklärt werden; mittels Carboxypeptidase Y wurden im Anschluß an die Staphylococcus aureus-Protease-Behandlung Aminosäuren aus der Loopregion entfernt.

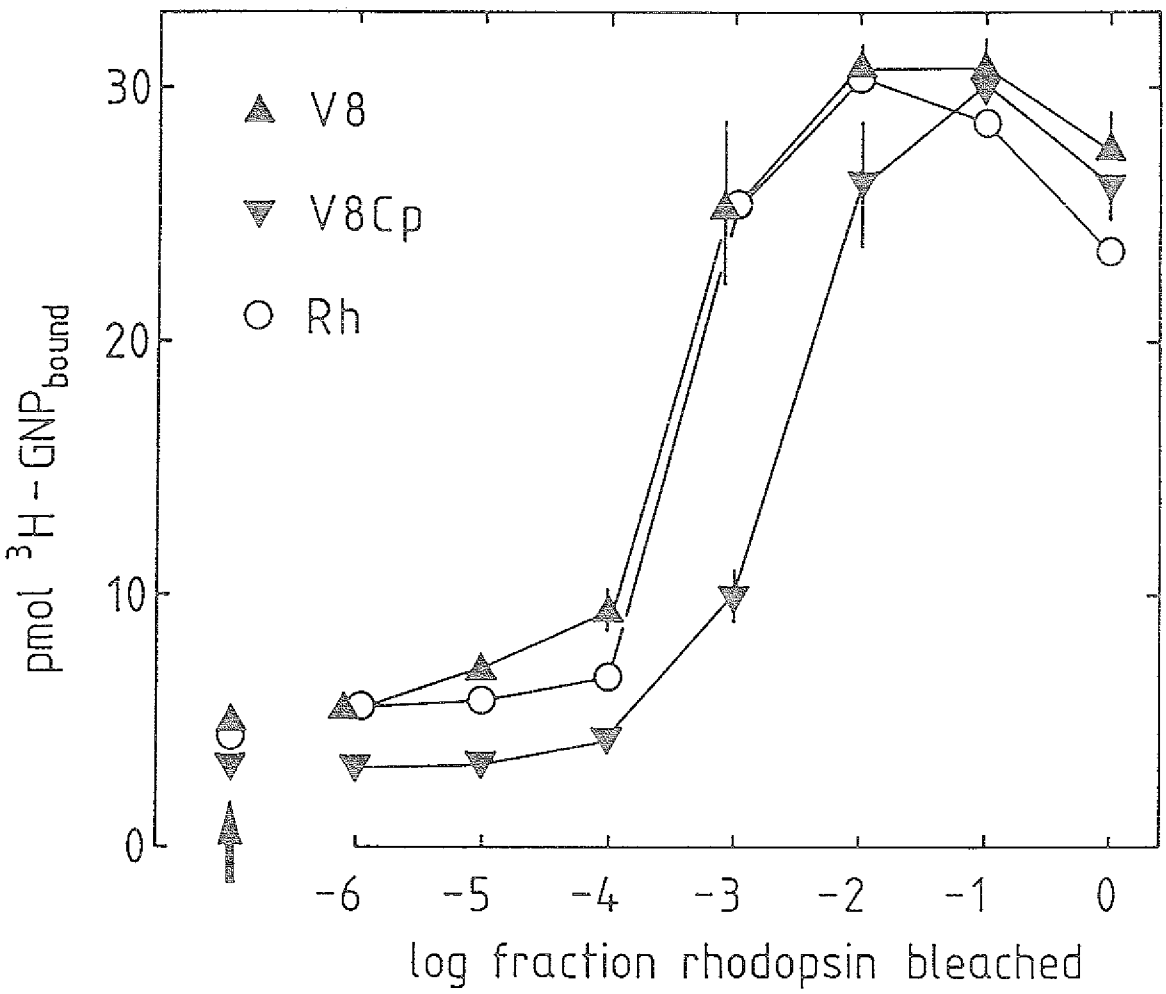


Abb. 11: Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin als Funktion des Rhodopsin-Bleichungsgrades in rekonstituierten Systemen nach verschiedenen Proteolysen bei einer 1 µMol/l Rhodopsinkonzentration, der korrespondierenden Menge an Transducin und 8 µMol/l ^{3}H-GNP.
V8 = Staphylococcus aureus-Protease behandeltes Rh (n = 7)
V8Cp = Staphylococcus aureus-Protease + Carboxypeptidase Y behandeltes Rh (n = 7)
Rh = unverdautes Rhodopsin, vgl. Abb. 6 (n = 8)
Mittelwerte ± SEM, aus Gründen der Darstellung wurde SEM für Rh nicht eingezeichnet. ↑ bezeichnet die Dunkelwerte.

Nukleotidaustausch-Experimente (n = 7) führten zu den folgenden Ergebnissen (Abb. 11):

Maximaler Nukleotidaustausch tritt in den Versuchen mit V8Cp erst bei 10 % Bleichung auf. Das Verhalten der Präparation in diesem Punkt ist vergleichbar mit dem der Th(long)-Präparation (s. Abb. 11, Tab. III). 50 pMol Rh* katalysieren bei 10 % Bleichung den Austausch von 30,1 pMol ^{3}H-GNP. Der Dunkelwert beträgt 3,3 pMol ^{3}H-GNP. Demnach katalysiert ein gebleichtes Rhodopsin etwa 0,54 Austauschreaktionen. Der Wert ist vergleichbar mit dem Ergebnis (0,51/Rh*), das aus den Versuchen mit Th(long) ermittelt wurde.

Bei Bleichungsgraden, die zu 1/2maximalem Nukleotidaustausch führen, katalysiert 1 Rh* der V8Cp-Präparation 10 Austauschreaktionen.

Für einen Bleichungsgrad von 0,001 % kann für die V8Cp-Präparation kein Verstärkungsfaktor über dem 'dark background' angegeben werden; erst ab 0,01 % gebleichtem Rhodopsin treten Werte auf, die höher sind als der Dunkelwert.

Tabelle III: Darstellung der Ergebnisse der Nukleotidaustausch-Experimente mit kompletten ROS und rekonstituierten - proteolysierten und nicht proteolysierten - Systemen. In Teil A der Tabelle sind die Mittelwerte (± SEM) von Nukleotidaustausch-Experimenten verschiedener Präparationen bei verschiedenen Bleichungen, bzw. im Dunkeln, dargestellt. Im Teil B der Tabelle sind aufgeführt:

1) die Werte der 1/2 maximalen Nukleotidaustausche (NA) im pMol ^{3}H-GNP$_{bound}$, ermittelt aus (maximalem NA - Dunkelaustausch)/2 bei den verschiedenen Präparationen;
2) der Logarithmus des Rhodopsinbleichungsgrades (log Rh*), bei dem 1/2 maximaler Nukleotidaustausch auftritt;
3) die Verstärkungsfaktoren, d.h. die von einem Rh* bei den verschiedenen Präparationen katalysierten ^{3}H-GNP-Bindungen bei Bleichungen, die zu 1/2 maximalem NA führen sowie bei 0,001 % Rh* (Beispiel: 0,0372 % Rh* katalysieren 13,1 NA-Reaktionen (in pMol); da in 1 Aliquot 500 pMol Rh enthalten sind, ergibt sich daraus, daß 0,186 pMol Rh* die Bindung von 13,1 pMol ^{3}H-GNP katalysieren, bzw. 1 Rh* führt zu 70 ^{3}H-GNP$_{bound}$);
4) die bei 1/2 maximalem NA ermittelten Verstärkungsfaktoren, normiert auf den Rh-Kontrollwert.

A)

log fraction rhodopsin bleached	$\bar{x}$ [pMol ^{3}H-GNP$_b$] /± SEM						
	ROS n = 6	Rh n = 8	Th(short) n = 4	Th(short)Cp n = 10	Th(long) n = 6	V8 n = 7	V8Cp n = 7
D	5,4/0,38	4,3/0,29	4,0/0,45	3,9/0,16	7,3/0,42	4,9/0,42	3,3/0,23
- 6	7,2/0,75	5,6/1,07	4,0/0,25	3,8/0,41	6,4/0,71	5,6/0,62	3,2/0,27
- 5	6,5/0,92	5,9/0,86	4,9/0,95	3,5/0,28	6,6/0,75	7,1/0,77	3,3/0,35
- 4	11,9/0,58	6,8/0,64	8,7/1,05	5,2/0,38	6,6/0,85	9,4/0,85	4,3/0,54
- 3	32,8/1,29	25,3/1,46	28,7/0,65	19,7/1,09	9,2/0,71	25,5/3,2	10,0/1,0
- 2	33,4/2,54	30,5/1,68	31,0/1,2	29,2/0,5	16,4/1,63	30,7/1,08	26,2/2,46
- 1	29,3/2,08	28,7/1,36	28,4/2,05	26,3/0,66	33,0/0,88	30,8/1,15	30,1/0,88
0	21,6/1,46	23,6/0,82	20,3/1,0	19,4/0,59	31,4/0,63	27,7/1,35	26,1/1,31

B)

Präparation	NA (pMol ^{3}H-GNP$_b$)	log Rh*	Bleichung bei 1/2 max. NA % Rh*	normiert auf Rh	Verstärkungsfaktor (^{3}H-GNP$_b$/1 Rh*) bei 1/2 max. NA	bei 0,001 % Rh*
ROS	14,0	- 3,64	0,0229	0,57	122	220
Rh	13,1	- 3,43	0,0372	1,0	70	320
Th(short)	13,5	- 3,54	0,0288	0,74	94	180
Th(short)Cp	12,65	- 3,20	0,0631	1,75	40	-
Th(long)	12,85	- 1,76	1,74	46,7	1,5	-
V8	12,95	- 3,44	0,0363	0,99	71	440
V8Cp	13,4	- 2,58	0,263	7,0	10	-

Tabelle IV: Aminosäureanalyse der Proteolyseüberstände nach Carboxypeptidase Y-Behandlung, ausgehend von Th(short) und V8. Angegeben sind die Aminosäuren in den Überständen 1, 2 und 3 der 3-stufigen Hydrolyse.

	100 nMol Th(short) eingesetzt zur Proteolyse Aminosäuren in nMol			67 nMol V8 eingesetzt zur Proteolyse Aminosäuren in nMol		
	$Ü_1$	$Ü_2$	$Ü_3$	$Ü_1$	$Ü_2$	$Ü_3$
Lys	6,1	-	4,9	4,2	9,4	2,5
Asp	14,4	-	10,7	5,8	13,4	1,2
Thr	56,9	42,6	26,8	16,4	28,5	7,6
Ser	42,8	39,4	20,5	16,8	24,4	5,6
Glu	31,0	24,4	21,0	41,6	28,6	4,6
Pro	9,9	-	-	9,7	17,3	-
Gly	15,1	18,6	12,0	10,5	16,7	7,9
Ala	58,6	82,4	26,0	60,5	63,1	12,7
Val	11,1	30,0	16,5	11,7	17,2	5,7
Met	3,2	11,0	7,2	2,5	2,5	0,7
Ile	9,2	-	-	5,0	6,5	2,2
Leu	19,3	31,6	19,7	12,8	22,7	8,1
Tyr	7,8	-	-	3,6	3,5	-
Phe	10,2	-	-	6,3	8,3	4,4
Gln	3,4	14,8	10,2	33,4	17,2	-
Nor-Leu	44,5	46	45,5	44,8	44,4	43,6

Es wurden jeweils 50 nMol Nor-Leu als Standard eingesetzt.

Im Vergleich zur Kontrolle benötigt die V8Cp-Präparation 7mal mehr Licht für den gleichen Austausch. Daraus ergibt sich für die Präparation ein Proteolysegrad von 86 %, unter der Voraussetzung, daß proteolysiertes Rhodopsin keine katalytische Restaktivität mehr besitzt. V8Cp verhält sich in der Dosis-Wirkungs-Beziehung also ähnlich wie Th(long). Die V8Cp-Präparation erhärtet den Verdacht, daß das katalytisch aktive Zentrum des Rhodopsins in der Loopregion zwischen den Helices 5 und 6 zu suchen ist. Ein eindeutiger Schluß ist aus den Ergebnissen mit dieser Präparation jedoch nicht möglich, da die Carboxypeptidase Y ja nicht nur aus der Loopregion Aminosäuren entfernt hat, sondern auch vom C-Terminus. Eine Entfernung von Glu 8′ bis Val 12′ ist ohne negative Bedeutung für die Katalyseeigenschaften (s. Ergebnis Th(short)). Die Carboxypeptidase hat aber weitere Aminosäuren vom C-Terminus entfernt: Gly 20′ findet sich zu etwa 50 % in der Aminosäureanalyse. Erst Pro 22′ "stoppt" die Carboxypeptidase Y. Es besteht also die Möglichkeit, daß

1. die Entfernung von Aminosäuren aus dem Loop
2. die Entfernung der C-terminalen Aminosäuren Thr 13′ - Leu 21′,
3. 1 und 2 zusammen verantwortlich sind für den Verlust der Katalyseeigenschaften.

Es besteht keine Möglichkeit, mit den bisher benutzten Enzymen die Frage zugunsten eines Punktes eindeutig zu klären. Es war also notwendig, nach weiteren Enzymen und Proteolysekombinationen zu suchen; vor allem für Thermo-

lysin mußte ein alternatives Enzym gefunden werden, das nur zu exakt kontrollierbaren Proteolysen am C-Terminus des Rhodopsinmoleküls führen würde.

3.6. Fraktionierte Proteolyse von Rhodopsin in 4 Schritten mit Hilfe verschiedener Enzyme

Proteolysen mit Thermolysin, Staphylococcus aureus-Protease und Carboxypeptidase Y führten zu der Vermutung, den katalytisch aktiven Bereich des Rhodopsinmoleküls zur Aktivierung von Transducin in der Loopregion zwischen den Helices 5 und 6 zu suchen. Eine eindeutige Lokalisation konnte mit Hilfe dieser Enzyme jedoch nicht erzielt werden (vergl. Abschnitt 3.5.). Dies sollte jedoch durch die Herstellung der im folgenden beschriebenen 4 Präparationen möglich sein (s. Abb. 12):

1) Trypsin entfernt die ersten 9 C-terminalen Aminosäuren vom Rhodopsin, es entsteht des (1′ - 9′) Rhodopsin, im folgenden I genannt (55, 72, 67);
2) Carboxypeptidase Y entfernt von Lys 10′ bis maximal Pro 22′ weitere Aminosäuren vom C-Terminus (72), das entstandene Rhodopsin wurde TCp genannt;
3) des (1′ - 21′) Rhodopsin (TCp) wird erst jetzt einer Loopmodifikation unterzogen, Staphylococcus aureus-Protease hydrolysiert die Peptidbindung Ser 109′ - Glu 110′ (73, 71), das entstandene Rhodopsin erhielt die Bezeichnung TCpV8;
4) aus der Loopregion von TCpV8 zwischen den Helices 5 und 6 werden mit Hilfe von Carboxypeptidase Y Aminosäuren entfernt. Das nach dem vierten und letzten

Proteolyseschritt entstandene Rhodopsin erhielt die Bezeichnung TCpV8Cp.

Ausgehend von einer ROS-Präparation wurden Diskmembranen und Proteinextrakte präpariert, die die Kontrollen für die im Anschluß durchgeführten fraktionierten Proteolysen darstellten. Die mit den Kontrollen ermittelten Dosis-Wirkungs-Beziehungen sind in Abb. 13 graphisch dargestellt. In Tabelle V sind die Ergebnisse aus den Kontrollexperimenten denen der fraktionierten Proteolyse gegenübergestellt.

3.6.1. Darstellung der Proteolyseprodukte auf Gelen

Anhand von 10 %igen SDS-Rundgelen und 10 bis 15 %igen SDS-Plattengelen nach Laemmli wurden die Proteolyseerfolge der einzelnen Schritte überprüft.

A) Rundgele (s. Abb. 14)

1) Trypsin:
wurde T auf Rundgele aufgetragen, so trat eine einzige Bande deutlich unterhalb des Rhodopsinbereichs auf dem Gel auf. Wurden Rh und T gemeinsam auf ein Gel aufgetragen, so ergaben sie saubere Doppelbanden.

2) Carboxypeptidase Y:
die TCp-Präparation führte zu einer Bande auf dem Gel, deutlich unterhalb von T; T und TCp auf einem Gel ergab Doppelbanden, die jedoch enger zusammenlagen als Rh und T.

3) Staphylococcus aureus-Protease:
Von den entstandenen Fragmenten F_1 und F_2 sind bei dem benutzten System nur die F_1-Anteile auf dem Gel zu sehen, F_2 läuft mit der Front. Im Molekulargewichtsbereich von T bzw. TCp sind bei den aufgetragenen Mengen keine Proteinspuren mehr zu sehen, was auf eine völlige Proteolyse von T bzw. TCp durch die Staphylococcus aureus-Protease schließen läßt.

4) Carboxypeptidase Y:
die TCpV8Cp-Präparation führt zu einer diffuseren Bande im Bereich des Molekulargewichtes von F_1 als es zuvor bei TCpV8 der Fall war. Wurden TCpV8 und TCpV8Cp zusammen auf ein Gel aufgetragen, zeigte sich zum Einen im Molekulargewichtsbereich von TCpV8 eine Konzentrierung der Bande, zum Anderen eine wesentlich schwächere Anfärbung unterhalb dieser Bande. Die Carboxypeptidase Y hat die TCpV8-Präparation nur in geringem Maße proteolysiert (s. 3.6.2.). Eine zweite 3-stufige Proteolyse mit Carboxypeptidase Y mußte durchgeführt werden.

Der Molekulargewichtsbereich, in dem nicht-Loop-modifizierte Rhodopsine laufen würden (T, TCp), blieb auch bei diesen aufgetragenen Mengen, 8 µg TCpV8 und 11 µg TCpV8Cp, frei von Protein.

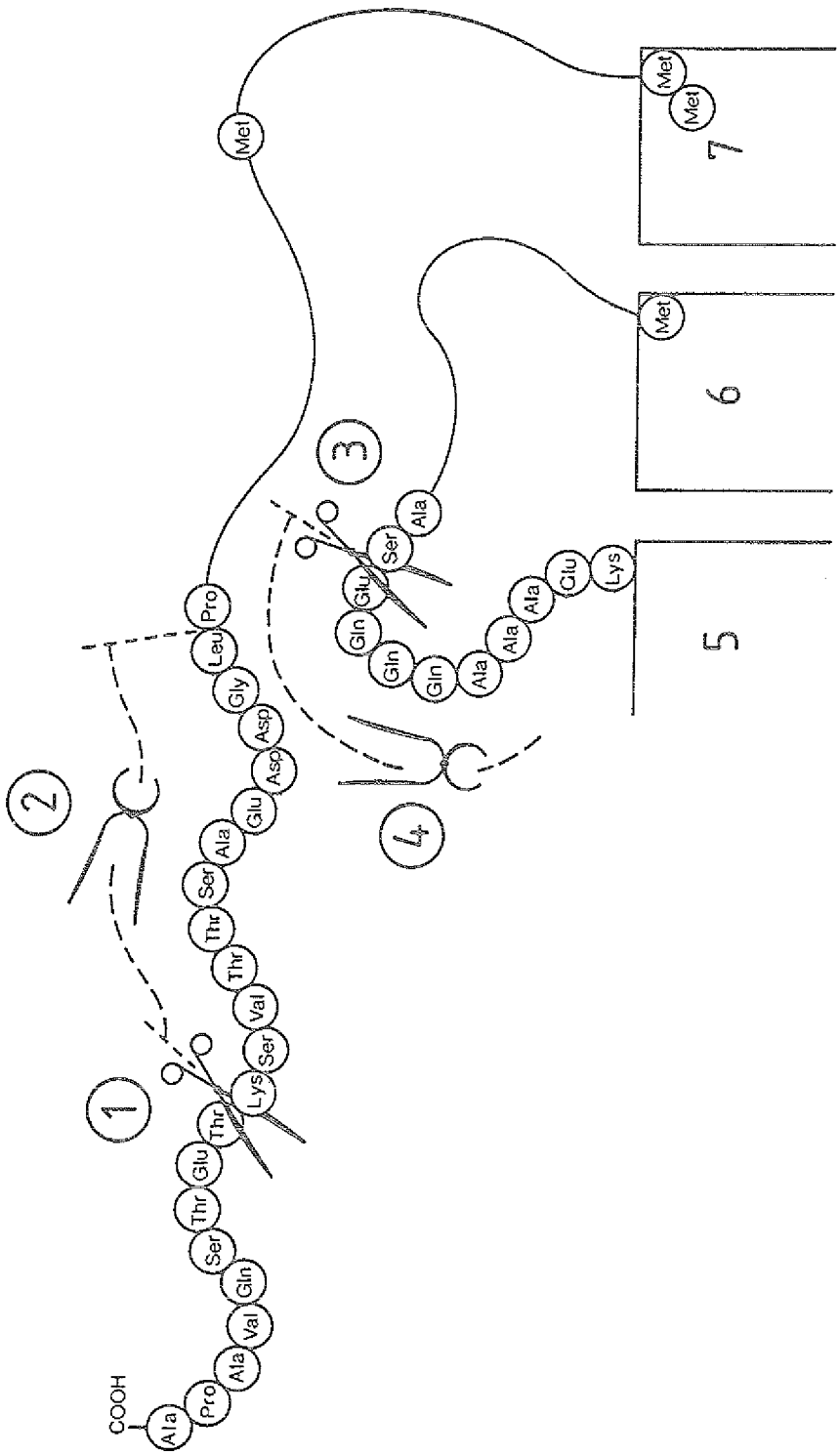


Abb. 12: Schematische Darstellung des C-terminalen Bereiches des Rhodopsinmoleküls, sowie des Bereiches zwischen Helices 5 und 6 (nach Hargrave, P.A. et al. (1983), verändert).

1 Angriffspunkt von Trypsin
2 Proteolysebereich der Carboxypeptidase Y nach Trypsin-Behandlung
3 Angriffspunkt von Staphylococcus aureus-Protease
4 Proteolysebereich der Carboxypeptidase Y nach Staphylococcus aureus-Protease-Behandlung
1 - 4 Ablauf der fraktionierten Proteolyse

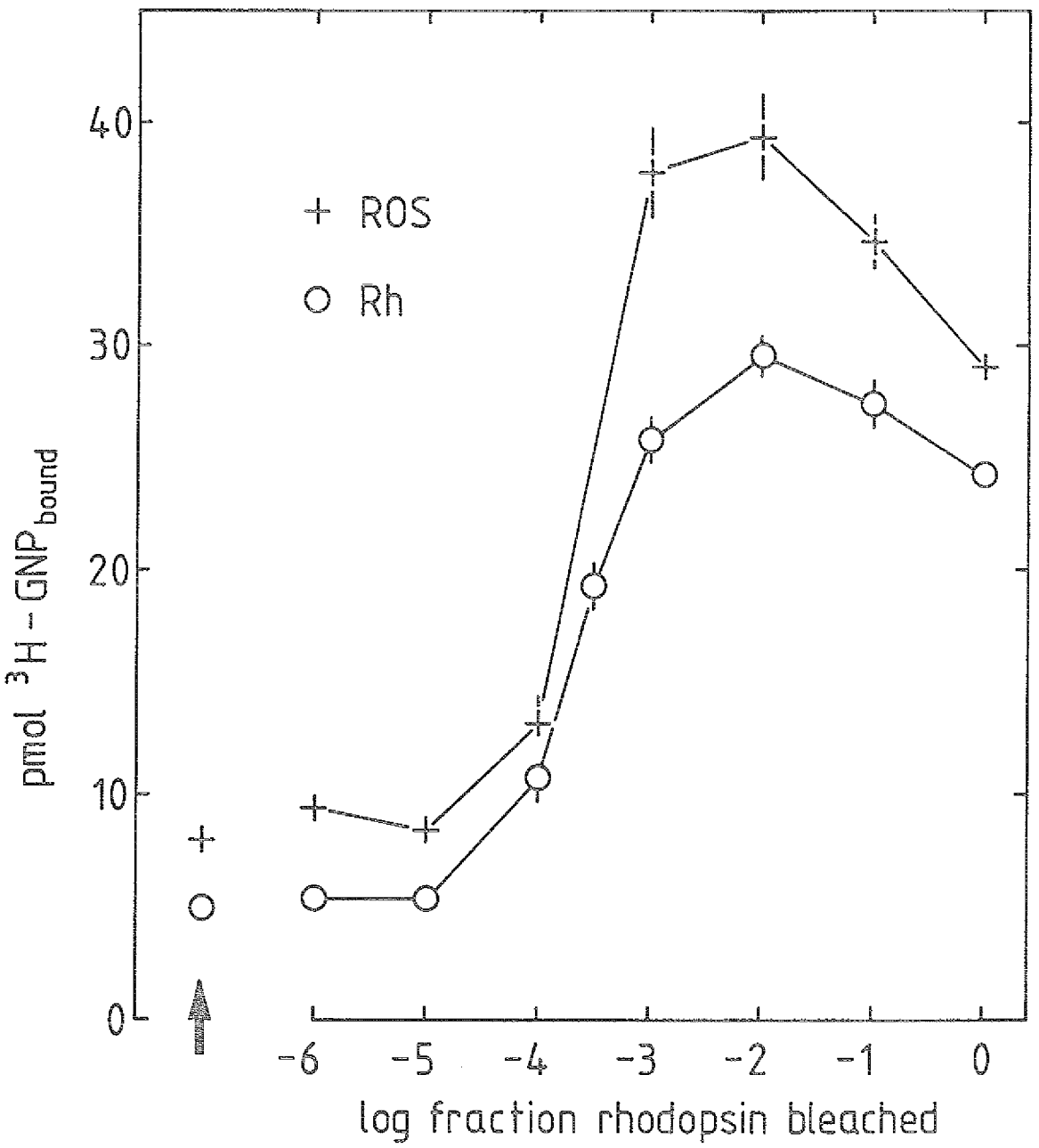


Abb. 13: Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin als Funktion des Rhodopsin-Bleichungsgrades in ROS (n = 5) und im rekonstituierten System (Rh, n = 7). Die Rhodopsinkonzentration betrug jeweils 1 µMol/l bei korrespondierender Menge an Transducin und 8 µMol/l ^{3}H-GNP. Mittelwerte ± SEM. ↑ bezeichnet die Dunkelwerte.

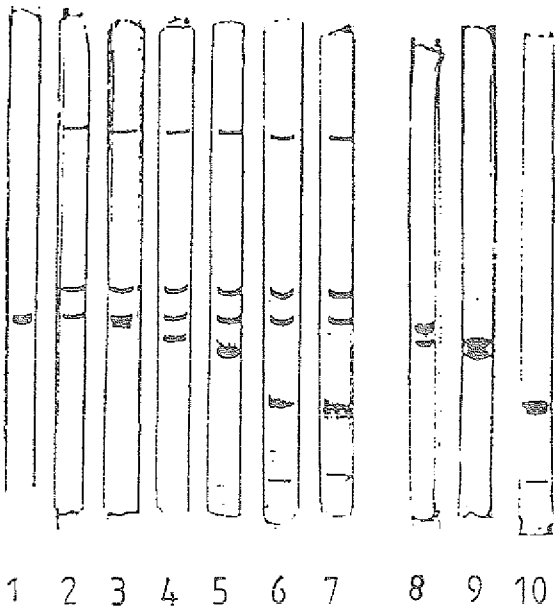


Abb. 14: Darstellung der Ergebnisse der fraktionierten Proteolyse.
Gel 1: 5 µg Rh (Diskmembranen), Gel 2: E_2 (Transducin und PDE), Gel 3: E_2 + Rh, Gel 4: T (6 µg) + E_2, Gel 5: TCp (10 µg) + E_2, Gel 6: TCpV8 (6,5 µg) + E_2, Gel 7: TCpV8Cp (11 µg) + E_2, Gel 8: Rh + T (je 5 µg), Gel 9: T + TCp (je 8 µg), Gel 10: TCpV8 + TCpV8Cp (8 bzw. 11 µg).

Tabelle V: Darstellung der Ergebnisse der Nukleotidaustausch-Experimente mit kompletten ROS und rekonstituierten - fraktioniert proteolysierten und nicht proteolysierten - Systemen. In Teil A der Tabelle sind die Mittelwerte (± SEM) von Nukleotidaustausch-Experimenten verschiedener Präparationen bei verschiedenen Bleichungen, bzw. im Dunkeln, dargestellt. In Teil B der Tabelle sind aufgeführt:

1) die Werte der 1/2 maximalen Nukleotidaustausche (NA) im pMol ^{3}H-GNP$_{bound}$, ermittelt aus (maximalem NA - Dunkelaustausch)/2 bei den verschiedenen Präparationen;
2) der Logarithmus des Rhodopsinbleichungsgrades (log Rh*), bei dem 1/2 maximaler Nukleotidaustausch auftritt;
3) die Verstärkungsfaktoren, d.h. die von einem Rh* bei den verschiedenen Präparationen katalysierten ^{3}H-GNP-Bindungen bei Bleichungen, die zu 1/2 maximalem NA führen sowie bei 0,001 % Rh* (Beispiel: 0,0234 % Rh* katalysieren 12,3 NA-Reaktionen (in pMol); da in 1 Aliquot 460 pMol Rh enthalten sind, ergibt sich daraus, daß 0,1076 pMol Rh* die Bindung von 12,3 pMol ^{3}H-GNP katalysieren, bzw. 1 Rh* führt zu 114 ^{3}H-GNP$_{bound}$);
4) die bei 1/2 maximalem NA ermittelten Verstärkungsfaktoren, normiert auf den Rh-Kontrollwert.

A)

log fraction rhodopsin bleached	$\bar{x}$ [pMol ^{3}H-GNP$_{b}$] /± SEM						
	ROS n = 5	Rh n = 7	T n = 5	TCp n = 7	TCpV8 n = 6	TCpV8Cp n = 6	TCpV8Cp + Rh n = 2
0	7,9/0,59	4,9/0,42	4,6/0,85	5,7/0,34	4,4/0,13	3,8/0,70	5,4 ; 6,3
- 6	9,4/0,68	5,4/0,31	5,7/0,96	6,1/0,69	5,0/0,50	4.5/0,54	7,4 ; 7,2
- 5	8,3/0,68	5,4/0,50	6,7/0,57	6,5/0,59	6,1/0,58	4,6/0,50	7,8 ; 6,4
- 4	13,1/1,30	10,8/1,08	8,7/1,12	10,0/1,50	13,5/1,00	4,3/0,38	12,7 ; 10,6
- 3,5		19,3/1,05	18,3/0,82	21,4/1,20	26,5/1,21		
- 3	37,7/2,00	25,9/0,88	20,5/1,00	24,5/1,65	30,5/0,79	9,3/0,92	26,9 ; 28,4
- 2	39,2/2,00	29,5/0,92	25,9/1,81	28,9/0,43	28,9/0,33	15,7/1,00	30,4 ; 29,1
- 1	34,5/1,20	27,4/1,08	21,3/1,23	27,9/0,78	27,7/0,83	27,9/1,79	- ; 28,9
0	29,0/0,41	24,2/0,46	16,3/0,10	23,0/1,35	25,7/1,04	33,5/2,00	27,1 ; 30,0

B)

Präparation	NA (pMol ^{3}H-GNP$_{b}$)	log Rh*	Bleichung bei 1/2 max. NA % Rh*	normiert auf Rh	Verstärkungsfaktor (^{3}H-GNP$_{b}$/1 Rh*) bei 1/2 max. NA	bei 0,001 % Rh*
ROS	15,65	- 3,58	0,0263	0,88	129	87
Rh	12,30	- 3,63	0,0234	1,0	114	109
T	12,45	- 3,58	0,0263	1,1	103	457
TCp	11,60	- 3,68	0,0209	0,94	121	174
TCpV8	13,05	- 3,88	0,0132	0,53	215	370
TCpV8Cp	14,85	- 1,76	1,74	60,0	1,9	174

B) Plattengele (s. Abb. 15)

Die 10 bis 15 %igen Plattengele sollten vor allem Aufschluß darüber geben, ob die TCp-, TCpV8- und die TCpV8Cp-Präparationen neben den zu erwartenden Fragmenten evtl. noch weitere niedermolekulare Bruchstücke enthalten. Es sollte und konnte ausgeschlossen werden, daß zusätzlich zu den Fragmenten F_1 und F_2 noch weitere endogene Spaltprodukte entstanden sind. Selbst für den Fall, daß 50 µg TCpV8Cp aufgetragen wurden, konnten zwischen den Fragmenten F_1 und F_2 und unterhalb von F_2 bis zu einem Molekulargewicht von etwa 6000 keine weiteren Spaltprodukte identifiziert werden.

Die TCpV8Cp-Rhodopsine liefen nach der zweiten 3-stufigen Carboxypeptidase Y-Behandlung vor den TCpV8-Produkten. Es trat jedoch keine saubere Bande, sondern ein diffuser Bereich auf. Die Carboxypeptidase Y hat somit die TCpV8-Präparation weiter modifiziert. Über den Grad der Reaktion ist jedoch keine Aussage zu treffen.

Zusätzlich zu den Produkten der fraktionierten Proteolyse wurden eine weitere V8- und V8Cp-Präparation auf die Plattengele aufgetragen. Wie bei den V8/V8Cp-Präparationen, die auf Rundgelen gezeigt wurden, zeigten auch die Rhodopsine dieser Präparationen Unterschiede im Molekulargewicht der Fragmente.

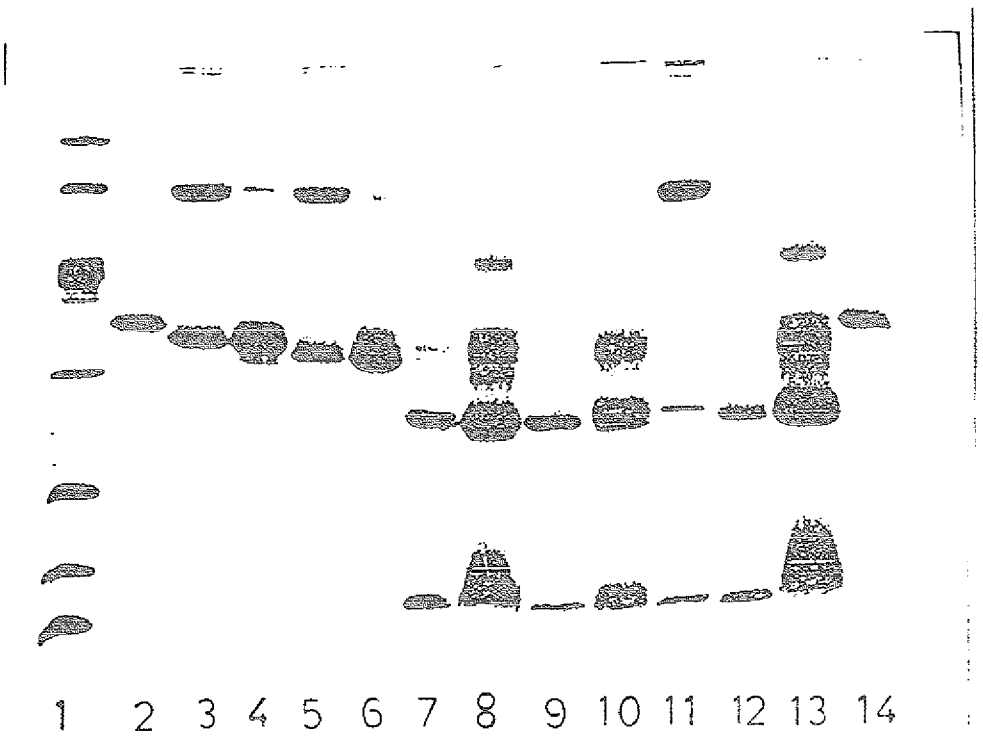


Abb. 15: Darstellung der Ergebnisse der fraktionierten Proteolyse und einer zweiten V8/V8Cp-Präparation.
Spalte 1: Molekulargewichtstandard (94 K - 6,5 K), Spalte 2 und 14: Rh (10 µg), Spalte 3 und 4: T (10 und 30 µg), Spalte 5 und 6: TCp (10 und 30 µg), Spalte 7 und 8: TCpV8 (15 und 50 µg), Spalte 9 und 10: TCpV8Cp (15 und 50 µg), Spalte 11: V8 (10 µg), Spalte 12 und 13: V8Cp (15 und 50 µg). (In den Spalten 3, 5 und 11 wurde zusätzlich BSA aufgetragen).

3.6.2. Aminosäureanalysen

Die Ergebnisse der Proteolyseschritte 2 und 4 (s. 3.6.) wurden zusätzlich zu den Gelen durch Aminosäureanalysen der löslichen Überstände untersucht (s. 2.5.3. und Tab. VI).

I) Aminosäureanalyse der Überstände der TCp-Präparation

Von den 12 C-terminalen Aminosäuren, Lys 10′ bis Leu 21′, die die Carboxypeptidase Y entfernen soll, wurden die ersten 7, d.h. Lys 10′ bis Ala 16′ nahezu vollständig entfernt.

700 nMol Rhodopsin wurden zur Proteolyse eingesetzt. Über den Nor-Leu-Standard wurden die folgenden Mengen für die aufgeführten Aminosäuren errechnet:

Lys 10′	701 nMol
Ser 11′ + Ser 15′	1415 nMol
Val 12′	806 nMol
Thr 13′ + Thr 14′	1375 nMol
Ala 16′	877 nMol

Im Folgenden findet die Carboxypeptidase Y am Rhodopsin einen Bereich negativer Ladungen vor: Glu-Asp-Asp folgen direkt aufeinander. Eine solche Kombination führt zu einer verminderten Hydrolyse durch die Carboxypeptidase. Glu 17′ befindet sich mit 300 nMol nur zu 43 % in der Aminosäureanalyse, Asp 18′ + 19′ treten nur noch zu 17 % (209 nMol) auf. Von den auf diese Region folgenden Aminosäuren Gly 20′ und Leu 21′ werden jedoch wieder

Tabelle VI: Aminosäureanalyse der Proteolyseüberstände nach Carboxypeptidase Y-Behandlung ausgehend von T und TCpV8 der fraktionierten Proteolyse. Angegeben sind die Aminosäuren in den Überständen 1, 2 und 3 der 3-stufigen Hydrolyse

	700 nMol T eingesetzt Aminosäuren in nMol			150 nMol TCpV8 eingesetzt Aminosäuren in nMol		
	Ü1	Ü2	Ü3	Ü1	Ü2	Ü3
Lys	490,4	89,7	19,2	6,4	4,6	3,5
His	30,0	13,4	12,9	3,8	4,0	3,7
Arg	24,4	12,4	10,5	3,9	3,7	1,9
Asp	55,7	45,0	78,1	21,6	20,9	11,2
Thr	985,5	136,4	52,4	8,6	10,0	6,6
Ser	1008,5	147,7	53,4	13,8	12,4	5,9
Glu	125,8	57,3	72,9	68,9	49,9	19,5
Pro	65,4	36,4	45,5	5,0	12,6	8,2
Gly	75,7	50,6	73,9	22,4	21,9	10,3
Ala	486,7	159,3	103,5	36,4	55,9	25,7
Val	544,2	91,1	54,1	15,0	14,4	8,3
Met	22,2	8,5	13,2	-	-	-
Ile	40,0	29,3	35,2	8,9	9,8	5,9
Leu	116,4	63,4	89,7	23,2	21,2	12,6
Phe	51,3	44,9	50,5	14,8	14,5	9,1
Gln	34,8	19,3	23,1	28,9	43,6	17,8
Nor-Leu	632	679	685	198	216	168
	Es wurden jeweils 800 nMol Nor-Leu eingesetzt.			Es wurden jeweils 240 nMol Nor-Leu eingesetzt.		

234 nMol (33 %) bzw. 315 nMol (45 %) in der Analyse identifiziert. Zu einem gewissen Teil enthält die Carboxypeptidase-Präparation wohl Endopeptidaseaktivitäten, die dafür verantwortlich sein könnten, daß der Bereich Glu-Asp-Asp z.T. als Peptid entfernt wurde (Dr. Föhles, pers. Mitteilung). Im Anschluß daran hydrolysiert die Carboxypeptidase Y die nächsten für sie zugänglichen Peptidbindungen, was dazu führt, daß Gly 20′ und Leu 21′ wieder in größeren Mengen in der Analyse auftreten. Da die Proteolyseüberstände keiner sauren Hydrolyse unterzogen wurden, wurden die evtl. entstandenen Peptide nicht in einzelne Aminosäuren gespalten, was dazu geführt haben könnte, daß in der Aminosäureanalyse weniger Glu und Asp gefunden wurden als tatsächlich vorhanden waren. Der Bereich Glu 17′ - Asp 18′ - Asp 19′ - Gly 20′ - Leu 21′ wäre unter dieser Annahme zu etwa 45 % vom Rhodopsinmolekül entfernt worden.

II) Aminosäureanalyse der TCpV8Cp-Präparation:

Die Präparation TCpV8Cp wurde zweimal einer 3-stufigen Carboxypeptidase Y-Proteolyse unterzogen, da der erste Schritt weder auf Gelen noch im Nukleotidaustausch-Experiment zu eindeutigen Proteolyseergebnissen geführt hatte.

A) Analyse der ersten Hydrolysestufen:
Es wurden in etwa 150 nMol TCpV8 zur Proteolyse eingesetzt, über den Nor-Leu-Standard wurden die im Folgenden aufgeführten Mengen (in nMol) für die entsprechenden Aminosäuren ermittelt:

Glu 161
Asp 63
Gly 64
Leu 67
Pro 31
Gln 118
Ala 138
Lys 17

Die 150 nMol eingesetztes TCpV8 setzten sich zusammen aus etwa 68 nMol des (1′ - 21′) und 82 nMol des (1′ - 17′) (s. Analyse von TCp), d.h., am C-Terminus befanden sich demnach vor Pro 22′ noch ca. 82 nMol Glu, 164 nMol Asp und je 82 nMol Gly und Leu. Die Mengen an Gly und Leu wurden in der Aminosäureanalyse mit 64 bzw. 67 nMol ermittelt, der Prozentsatz an des (1′ - 21′) Rhodopsin hat sich demnach jetzt von ca. 45 % auf 80 % erhöht. An Asp wurden weitere 63 nMol ermittelt (s. TCp-Analyse).

Die Herkunft der 161 nMol Glu ist schwierig zu interpretieren. Glu 17′ befindet sich noch in ca. 82 nMol der eingesetzten Rhodopsine, die Menge an Glu 110′ entspricht der Menge an eingesetztem TCpV8, also 150 nMol. Außerdem enthält der Loop mit Glu 117′ noch eine weitere Glutaminsäure.

Aus der Aminosäureanalyse wurde eine Lys-Menge von 17 nMol (11 %) berechnet. Da Asn 23′ jedoch nicht in der Aminosäureanalyse erscheint, ist es unwahrscheinlich, daß die Lysine aus der Aminosäureanalyse von Lys 24′ stammen, es wäre somit möglich, die 17 nMol Lys als Lys

118′ zu interpretieren. Für die Glu-Identifizierungen würde das bedeuten, daß Glu 17′ zu 11 % (17 nMol) im Proteolysat vorhanden ist. Es ergibt sich also folgendes Bild:

Insgesamt wurden 161 nMol Glu identifiziert, davon entfallen 17 nMol auf Glu 117′ (s.o.). Der C-Terminus wurde weiter hydrolysiert; nimmt man an, daß Glu 17′ in gleichem Maße wie Glu 20′ und Leu 21′ (64 bzw. 67 nMol) entfernt wurde, entfallen etwa 65 nMol auf Glu 17′; demnach wären von Glu 110′ 79 nMol im Proteolysat, 53 % der an dieser Stelle vorhandenen Glu.

Unter Berücksichtigung der oben gemachten Annahmen wären die folgenden Aminosäuren aus der Loop-Region entfernt (Angaben in %) worden:

Glu 110′:	53
Gln 111′ - 113′:	26
Ala 114′ - 116′:	31
Glu 117′:	11
Lys 118′:	11

Für die angestellten Überlegungen ist zu beachten, daß die Anwesenheit sogenannter "Fremdaminosäuren", die in allen Proteolysen auftraten, d.h. Aminosäuren, deren Herkunft nicht bestimmt werden kann, vernachlässigt wurde. Zu durchschnittlich 25 % wurden in dieser Analyse Thr, Ser, Val, Ile und Phe gefunden. In anderen Aminosäureanlaysen waren die Werte für Ala und Val häufig zu hoch. In geringen Mengen (5 - 10 %) wurden Met, His, Phe und manchmal Tyr gefunden. Die Diskmembranen enthalten

nicht ausschließlich Rhodopsin als intrinsisches Membranprotein, zu 5 - 15 % kommen noch andere Proteine vor (76), von denen das Material stammen könnte. Die Möglichkeit einer Autoproteolyse der Carboxypeptidase Y kann weitgehend ausgeschlossen werden, da in zwei Kontrollversuchen keine meßbare Autoproteolyse festgestellt wurde. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, daß die Aminosäuremengen, die ausschließlich TCpV8Cp zugeschrieben wurden, zu variablen Anteilen aus anderen Quellen stammen und TCpV8Cp in geringerem Maße proteolysiert wurde.

B) Analyse der zweiten 3-stufigen Hydrolyse:
Eingesetzt wurden 115 nMol modifiziertes Rhodopsin. Die Menge an Nor-Leu betrug ebenfalls 115 nMol. In den Aminosäureanalysen wurden 94, 101, bzw. 114 nMol Nor-Leu gefunden. Da größtenteils des (1′ - 21′)-Rhodopsin (s. 3.6.2. IIA) zur Carboxypeptidase-Verdauung eingesetzt wurde, sollten hauptsächlich Glu, Gln und Ala aus dem 3. extradiscalen Loop in den Aminosäureanalysen erscheinen. Dies war nicht der Fall. Es wurden lediglich - ausgehend vom Nor-Leu-Standard - etwa 5 - 15 % an sogenannten "Fremdaminosäuren" gefunden.

3.7. Nukleotidaustausch-Experimente mit den Produkten der fraktionierten Proteolyse

Experimente mit Kontrollmembranen und den 4 proteolytisch modifizierten Rhodopsinen T, Tcp, TCpV8 und TCpV8Cp führten zu den in Tabellen V und VII dargestellten Ergebnissen (s. auch Abb. 16 und 17). Zum Vergleich mit den Ergebnissen aus den nicht fraktionierten Proteolysen s. S. 50, Kapitel 3.4.

Tabelle VII: Nukleotidaustausch-Reaktionen (NA) bei Bleichungen von 0,1 - 100 %

Präparation	% Rh*	pMol Rh*	pMol ^{3}H-GNP$_b$	pMol 3H-GNP$_b$ dark	NA/1Rh*
Rh	1	4,6	29,5	4,9	5,3
T	0,1	0,46	29,5	4,6	54,0
	1	4,6	25,9	4,6	4,6
TCp	1	4,6	28,9	5,7	5,0
TCpV8	0,1	0,46	30,5	4,4	56,7
	1	4,6	28,9	4,4	5,3
TCpV8Cp	100	460,0	33,5	3,8	0,06
	10	46,0	27,9	3,8	0,52
	1	4,6	15,7	3,8	2,5

Die Lage der maximalen Nukleotidaustausch-Reaktionen bei den verschieden modifizierten Rhodopsinen im Vergleich zu unproteolysiertem Rhodopsin sind in Tabelle VII dargestellt. Angegeben sind der prozentuale Bleichungsgrad (%Rh*), die zugehörigen Mengen an Rh* (in pMol) und an gebundenem ^{3}H-GNP (pMol ^{3}H-GNP$_b$), sowie die Bindung im Dunkeln (pMol ^{3}H-GNP$_b$ dark). Als NA/1Rh* ist der Verstärkungsfaktor bei den verschiedenen Bleichungen angegeben.

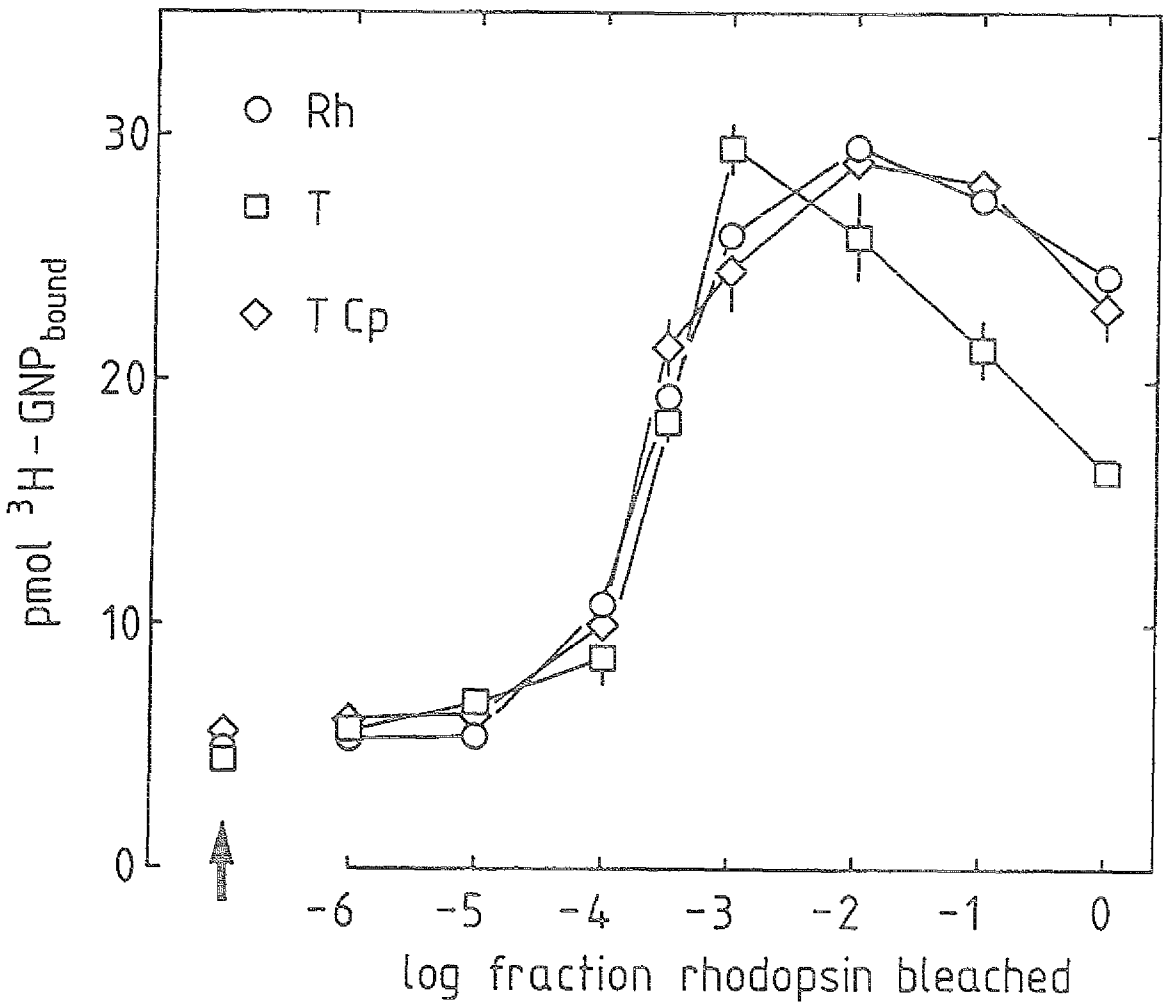


Abb. 16: Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin als Funktion des Rhodopsin-Bleichungsgrades im rekonstituierten System nach verschiedenen Proteolysen bei einer 1 µMol/l Rhodopsinkonzentration, der korrespondierenden Menge an Transducin und 8 µMol/l ^{3}H-GNP.
Rh = unverdautes Rhodopsin, vergl. Abb. 10 (n = 7)
T = Trypsin behandeltes Rh (n = 5)
TCp = Trypsin und Carboxypeptidase Y behandeltes Rh (n = 7)
Mittelwerte ± SEM, aus Gründen der Darstellung wurde SEM für Rh nicht eingezeichnet. ↑ bezeichnet die Dunkelwerte.

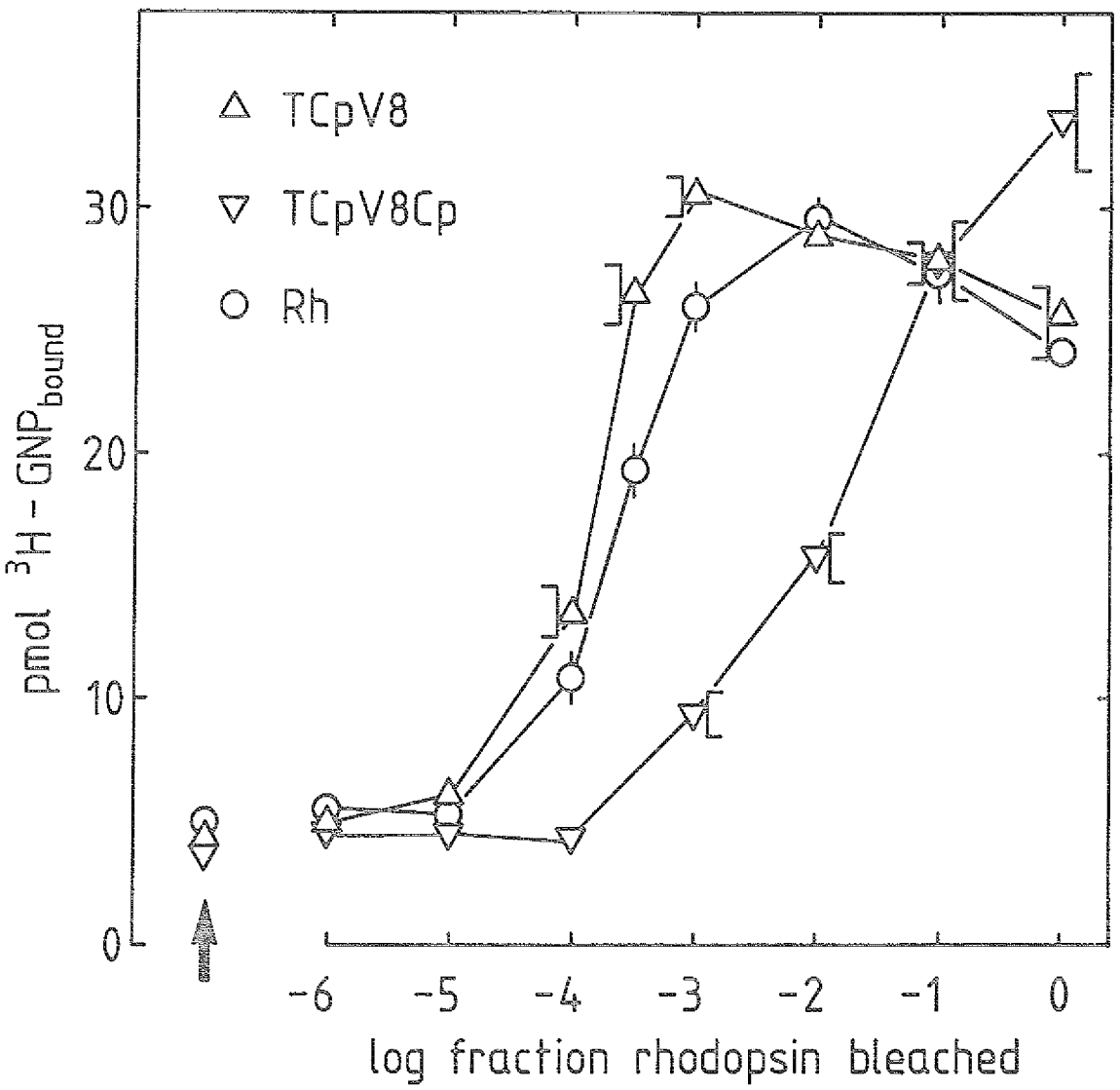


Abb. 17: Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin als Funktion des Rhodopsin-Bleichungsgrades in rekonstituierten Systemen nach verschiedenen Proteolysen bei einer 1 µMol/l Rhodopsinkonzentration, der korrespondierenden Menge an Transducin und 8 µMol/l ^{3}H-GNP.
TCpV8 = Trypsin, Carboxypeptidase Y und Staphylococcus aureus-Protease behandeltes Rh (n = 6)
TCpV8Cp = Trypsin, Carboxypeptidase Y, Staphylococcus aureus-Protease und Carboxypeptidase Y behandeltes Rh (n = 6)
Rh = unverdautes Rhodopsin, vergl. Abb. 13 (n = 7)
Mittelwerte ± SEM. ↑ bezeichnet die Dunkelwerte.

Wie für die Th(long)- und die V8Cp-Präparationen (s. 3.5.), zeigt sich auch hier für das loopmodifizierte TCpV8Cp eine eindeutige Verschiebung des Maximums zu höheren Lichtintensitäten. Bei 1/2maximalen Bleichungen (s. Tab. V) zeigt die Präparation TCpV8Cp, der Aminosäuren im Loop zwischen den Helices 5 und 6 fehlen, deutlich verminderte katalytische Eigenschaften im Vergleich zu den Kontrollrhodopsinen.

60 bzw. 1 gebleichtes Rhodopsin katalysieren die gleiche Menge an Nukleotidaustausch-Reaktionen.

In den Präparationen Th(long) und V8Cp wurden bei 1/2 maximalen Bleichintensitäten 47 bzw. 7 belichtete Rhodopsinmoleküle benötigt, um gleiche Austausche wie bei den Kontrollrhodopsinen zu erzielen (s. Tab. III).

Bei 1/2 maximalen Bleichintensitäten reicht in den Kontrollversuchen ein gebleichtes Rhodopsinmolekül zur Katalyse der entsprechenden Nukleotidaustauschreaktionen aus; in den Experimenten mit TCpV8Cp werden für die gleiche Menge an Nukleotidaustauschen jedoch 60 gebleichte Moleküle benötigt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß 59 Moleküle (TCpV8Cp) katalytisch völlig inaktiv sind. Dies entspräche dann einem erzielten Proteolysegrad von ca. 98 %. Erst Proteolysegrade über 99 % führen dazu, daß die maximale Austauschrate nicht mehr erreicht werden kann.

Versuche zur Aufzeichnung von Dosis-Wirkungs-Kurven, in denen die Ansätze neben TCpV8Cp gleichzeitig äquimolare

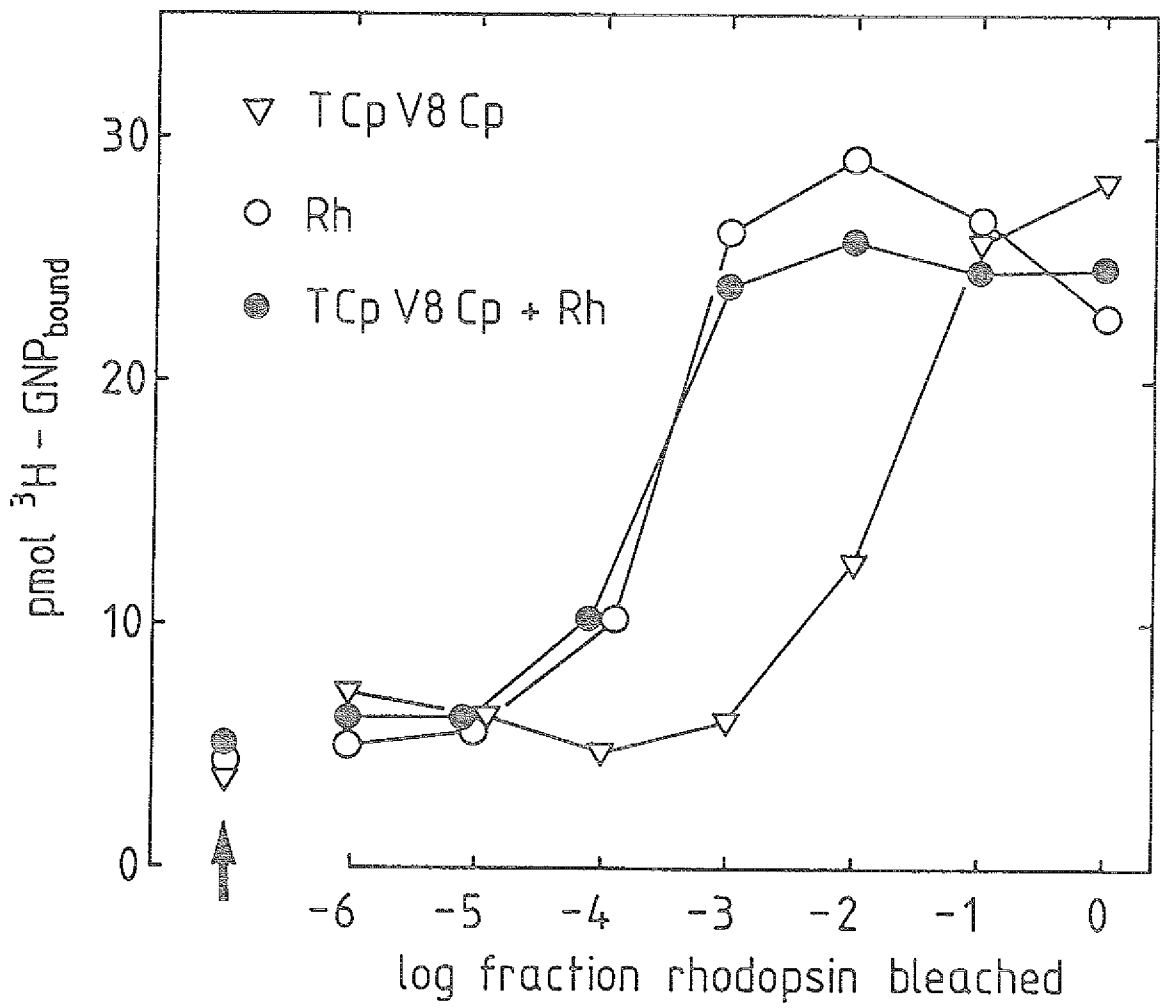


Abb. 18: Einzelversuch zur Bindung von ^{3}H-GNP an Transducin als Funktion des Rhodopsin-Bleichungsgrades in einem "regenerierten", rekonstituierten System. Die Rhodopsinkonzentrationen in den Experimenten war für TCpV8Cp und Rh jeweils 1 µMol/l bei korrespondierender Menge an Transducin und 8 µMol/l ^{3}H-GNP.

TCpV8Cp = Trypsin, Carboxypeptidase Y, Staphylococcus aureus-Protease und Carboxypeptidase Y behandeltes Rh

Rh = unverdautes Rhodopsin

TCpV8Cp + Rh = proteolysiertes + unverdautes Rhodopsin

↑ bezeichnet die Dunkelwerte.

Mengen an Kontrollrhodopsin enthielten, führten zu ähnlichen Ergebnissen wie Versuche, in denen nur Kontrollrhodopsin enthalten war (s. Abb. 18 und Tab. V A). Dies zeigt, daß der Aktivitätsverlust in den Nukleotidaustausch-Experimenten mit TCpV8Cp nicht auf einen inaktiven Extrakt E_2 zurückzuführen ist. Rekonstituiert mit katalytisch aktiven Membranen ist das Transducin in der Lage, an seiner T_α-Untereinheit Nukleotide auszutauschen.

In Experimenten, in denen T, TCp bzw. TCpV8 als Katalysatoren für den Nukleotidaustausch eingesetzt wurden, zeigten die modifizierten Rhodopsine die Tendenz, katalytisch aktiver als die Kontrollrhodopsine zu sein (vgl. auch Th(short), Kap. 3.5.1.). Ähnliche Beobachtungen mit Papain-short-term-, Thermolysin-short-term- und Trypsin-Carboxypeptidase-modifiziertem Rhodopsin machten Litman et al. (75), Aton et al. (67) und Miller et al. (72).

Diese Beobachtung sollte statistisch abgesichert werden. Dazu wurden zunächst die Nukleotidaustausch-Maxima auf gleiche Höhen normiert. Dieses Verfahren ist deshalb anwendbar, weil Unterschiede in der Höhe der Nukleotidaustausche sehr wahrscheinlich nur auf unterschiedliche Mengen an Transducin zurückzuführen sind (s. Kapitel 3.1.2.). Normiert wurden alle mit T durchgeführten Experimente, 3 von 7 Versuchen mit TCp und 4 von 6 mit TCpV8Cp. (Zur Normierung sollte beachtet werden, daß für eine Dosis-Wirkungs-Kurve, bestehend aus 8 Versuchspunkten, ein gemeinsamer Sammelansatz hergestellt wurde.)

Aus den einzelnen Experimenten wurden die 1/2maximalen Nukleotidaustausche errechnet und der Wert der zugehörigen Bleichungsintensität als dekadischer Logarhithmus bestimmt. Die folgenden, in Tabelle VIII dargestellten, Werte wurden ermittelt:

Tabelle VIII: Dargestellt sind die aus Einzelversuchen bei den verschiedenen Präparationen ermittelten Bleichintensitäten als dekadische Logarithmen bzw. Numeri, bei denen 1/2 maximaler Nukleotidaustausch (NA in pMol ^{3}H-GNP_b) erreicht wird

ROS

log	Num.	NA
- 3,65	0,000224	15,45
- 3,6	0,000251	16,1
- 3,65	0,000224	15,7
- 3,3	0,000501	17,3
- 3,55	0,000282	16,0

Rh

log	Num.	NA
- 3,7	0,0002	13,15
- 3,65	0,000224	12,35
- 3,6	0,000251	12,0
- 3,7	0,0002	10,25
- 3,55	0,000282	13,95
- 3,6	0,000251	11,2
- 3,5	0,000316	13,3

TRh

log	Num.	NA
- 3,35	0,000447	12,1
- 3,6	0,000251	13,55
- 3,55	0,000282	12,85
- 3,55	0,000282	14,8
- 3,55	0,000282	14,25

TCp

log	Num.	NA
- 3,5	0,000316	11,55
- 3,6	0,000251	11,35
- 3,7	0,0002	11,9
- 3,75	0,000178	12,1
- 3,1	0,000794	12,75
- 3,2	0,000631	12,8
- 3,65	0,000224	11,95

TCpV8

log	Num.	NA
- 3,85	0,000141	13,3
- 3,9	0,000126	12,0
- 3,7	0,0002	14,6
- 4,0	0,0001	12,85
- 3,75	0,000178	13,1
- 3,7	0,0002	13,2

TCpV8Cp

log	Num.	NA
- 1,65	0,0224	13,9
- 1,75	0,0178	12,15
- 1,7	0,02	13,85
- 1,0	0,1	13,95
- 1,8	0,0141	12,85
- 2,55	0,0028	12,1

Die derart ermittelten Bleichungsintensitäten, die zu 1/2 maximalen Austrauschreaktionen führten, wurden im t-Test miteinander verglichen. Es wurden der paired und unpaired t-Test durchgeführt. Es wurde getestet, ob signifikante Unterschiede zwischen ROS und Rh, Rh und T, Rh und TCp, Rh und TCpV8, sowie Rh und TCpV8Cp bestehen oder nicht:

Tabelle IX: Ergebnisse des paired t-Tests der jeweils miteinander verglichenen Präparationen. Bei Werten für p, die $\leq$ 0,05 sind, bestehen signifikante Unterschiede zwischen den verglichenen Präparationen

Präparationen	p
ROS/Rh	< 0,2
Rh/T	< 0,1
Rh/TCp	< 0,2
Rh/TCpV8	< 0,005
Rh/TCpV8Cp	< 0,001

Wie zu erwarten war, bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen, die mit Rh und TCpV8Cp erzielt wurden.

Ebenfalls signifikant sind die Unterschiede zwischen Rh und TCpV8. Die Beobachtung, daß die Präparation TCpV8 "lichtempfindlicher" zu sein scheint, als die Kontrolle, läßt sich also mit P < 0,5 % absichern. Bei Verwendung

des paired t-Tests waren die anderen Präparationen nicht signifikant von Rh verschieden.

Anhand der Ergebnisse, die mit den fraktioniert proteolysierten Rhodopsinen erzielt wurden, läßt sich eindeutig sagen, daß die Entfernung C-terminaler Aminosäuren (zu 100 % bis des (1′ - 16′), zu etwa 45 % bis des (1′ - 21′)) und der Schnitt in die Loopregion zwischen den Helices 5 und 6 (TCpV8) für das Rhodopsinmolekül zu keinem Verlust an katalytischer Aktivität führt. Erst die Entfernung von Aminosäuren aus dieser Loopregion (TCpV8Cp) bewirkt, daß das Molekül seine Eigenschaft als Katalysator der Nukleotidaustausch-Reaktion verliert.

Die mit Carboxypeptidase Y erfolgte weitere C-terminale Entfernung von des (17′ - 21′) dürfte vernachlässigbar sein aufgrund der Tatsache, daß die TCp-Präparation zu etwa 100 % aus des (1′ - 16′) und zu etwa 45 % aus des (1′ - 21′) besteht. Bei einer Beteiligung der Aminosäuren 17′ - 21′ an der katalytischen Aktivität, hätten sich Dosis-Wirkungs-Kurven mit dieser Präparation um einen Faktor von etwa 1,8 in Richtung auf höhere Lichtintensitäten von den Kontrolldaten unterscheiden sollen. Dies ist nicht der Fall, es treten keine signifikanten Unterschiede zwischen Rh und TCp auf. Die C-terminale Entfernung der Aminosäuren (s.o.) und der Schnitt in die Loopregion erhöht statistisch belegbar die katalytischen Eigenschaften des Rhodopsinmoleküls, wohingegen die bloße Entfernung von C-terminalen Aminosäuren nur Tendenzen in diese Richtung zeigt, die statistisch nicht belegbar sind.

Somit läßt sich der eindeutige Schluß ziehen: Eine Entfernung von Aminosäuren aus der Loopregion zwischen den Helices 5 und 6 ist verantwortlich für den Verlust der katalytischen Wirkung des Rhodopsinmoleküls auf den Nukleotidaustausch am Transducin.

4. Diskussion

Bleichung von Rhodopsin in den Diskmembranen löst eine Kaskade enzymatischer Reaktionen aus, die letztlich zur Hydrolyse von cGMP führen (60, 7, 8, 14). cGMP wird neben Ca^{2+} eine Transmitter-Rolle im ROS zugesprochen (1, 3 - 8). Ein solcher Transmitter ist notwendig, um das Lichtsignal vom Rezeptor (Rhodopsin) in den Diskmembranen zu den Ionenkanälen in der Plasmamembran weiterzuleiten (s. Einleitung). Dazu muß das physikalische Signal transduziert werden in eine biochemische Botensubstanz. Weiterhin muß das Signal eine Verstärkung erfahren, da ein gebleichtes Rhodopsin ausreicht, um den Dunkelstrom über die Plasmamembran um 3 % zu reduzieren; das entspricht einer Schließung von größenordnungsmäßig 100 lichtsensitiven Ionenkanälen (1, 9).

Der erste Schritt der Enzymkaskade, die zur cGMP-Hydrolyse führt, besteht in der Interaktion des gebleichten Rhodopsins mit Transducin. Die Interaktionen zwischen beiden Proteinen führen zur Übersetzung und einer ersten Verstärkung des Lichtsignals (44, 13, 14, 15, 42). Ziel dieser Arbeit war es, den Ort am Rezeptormolekül näher kennenzulernen, der für Transduktion und Verstärkung verantwortlich ist. Dazu wurde Rhodopsin gezielten proteolytischen Modifikationen unterworfen.

Es konnte gezeigt werden, daß Rhodopsin dann seine katalytischen Fähigkeiten zur Aktivierung von Transducin verliert, wenn aus dem Loop zwischen den Helices 5 und 6 einige wenige Aminosäuren entfernt wurden. Weiterhin

wurde gezeigt, daß der Verstärkungsschritt, der von der Interaktion Rhodopsin - Transducin ausgeht, bei niedrigen Bleichungen (d.h. bei 0,001 %) zwischen 100 und 500 liegt, das heißt, daß bei diesem Bleichungsgrad 1 gebleichtes Rhodopsinmolekül 100 bis 500 Nukleotidaustausch-Reaktionen katalysiert.

4.1. Modifikationen am Transducin

Bezogen auf die Komponente Transducin ist das System Rhodopsin/Transducin bereits durch verschiedene Modifikationen charakterisiert worden:

- Fung et al. (16) und Halliday et al. (46) proteolysierten Transducin mit Hilfe von Trypsin. Beide Arbeitsgruppen fanden, daß die Bindung zwischen T_α und gebleichtem Rhodopsin nach einer Reduzierung des Molekulargewichts von T_α von 39 K auf 38 K nicht mehr stattfindet. Sie konnten ebenfalls zeigen, daß Rhodopsin-Bindung und Nukleotid-Bindung an verschiedenen Stellen am Molekül stattfinden.

- SH-Gruppen-Modifikationen am T_α mit N-ethylmaleimid (NEM) führten ebenfalls zur Beeinflussung der Bindung zwischen gebleichtem Rhodopsin und Transducin. Die Rh*-T_α-Bindung tritt nicht mehr auf, wenn durchschnittlich eine von 3 zugänglichen SH-Gruppen am T_α durch NEM substituiert wurde (48, 47, 45).

- Wird T_α mit Hilfe von Pertussis-Toxin (islet-activating-protein, PT) ADP-ribosyliert, führt dies eben-

falls zu einer herabgesetzten Bindung zwischen Rh* und T_α (49, 33, 25). Als Substrat für die Pertussis-Toxin-ADP-Ribosylierung dient Asp 350 am T_α-GDP (29). Eine ADP-Ribosylierung von T_α-GDP führt zur Stabilisierung des Transducins in der GDP-Form.

Diese drei Modifikationen am T_α (Trypsin-Spaltung, SH-Gruppen-Modifizierung und ADP-Ribosylierung mit Pertussis-Toxin) charakterisieren den Bereich des Moleküls der mit Rh* in Kontakt tritt. Es handelt sich dabei um eine terminale Region von etwa 100 Aminosäuren, die wahrscheinlich die Aminosäuren Cys und Asp enthält, die auf SH- bzw. PT-Modifikation mit einer reduzierten Bindung an Rh* reagieren.

4.2. Modifikationen am Rhodopsin

Die vorliegende Arbeit sollte Aufschluß darüber geben, an welcher Stelle im Rhodopsin-Molekül sich der katalytische Bereich befindet, der mit T_α in Kontakt tritt. Die im folgenden beschriebenen Beeinflussungen der Bindung zwischen Rhodopsin und Transducin sind bekannt.

4.2.1. SH-Gruppensubstitution

SH-Gruppensubstitution mit NEM an C-terminalen Cys und an Cys im Loop zwischen den Helices 3 und 4 führt zu keiner Beeinflussung der Rh*-T_α-GDP-Interaktion (47), was den Schluß zulassen könnte, daß sich diese Bereiche nicht in enger Nachbarschaft zur Bindungsstelle zwischen Rh* und T_α-GNP befinden.

4.2.2. Phosphorylierung

Phosphorylierung der C-terminalen Ser und Thr führen zu reduzierten PDE-Aktivitäten (67, 72, 77). Da die PDE durch T_α-NTP aktiviert wird, bedeutet das, daß zuvor eine verminderte Aktivierung des Transducins durch phosphoryliertes Rhodopsin stattgefunden hat. Miller und Dratz (72) modifizierten Rhodopsin am C-Terminus mit Trypsin, Carboxypeptidase Y oder beiden Enzymen, was dazu führte, daß Ser und Thr in unterschiedlichen Mengen entfernt wurden. Anschließende Phosphorylierung führten demzufolge zur Inkorporation von unterschiedlichen Mengen an Phosphat; die Phosphorylierungsreaktion wurde durch gleichzeitige Anwesenheit von GTP und Transducin um etwa 70 % reduziert. Die Entfernung der C-terminalen P-Bindungsstellen durch die Enzyme hat mehr oder weniger keinen Effekt auf die PDE-Aktivierung, solange kein ATP zur Phosphorylierung vorhanden ist. In Gegenwart von ATP steigt die Reduzierung der PDE-Aktivität mit steigender Anzahl an vorhandenen Phosphorylierungsstellen. Durch Phosphat-Inkorporation wird die Lebenszeit von Rh* und damit der PDE reduziert. Miller und Dratz ziehen aus den erzielten Ergebnissen die Schlußfolgerung, daß die Phosphorylierungsstellen am Rhodopsin so nahe an der T_α-Bindungsstelle liegen, daß sie die Interaktion zwischen Rhodopsin und T_α stören können. Das katalytisch aktive Zentrum, das die Nukleotidaustausch-Reaktionen steuert, befindet sich jedoch nicht in dem C-terminalen Bereich, der phosphoryliert wird.

Phosphorylierung von Rhodopsin inhibiert aber nicht nur die Bindung von T_α an das Molekül. Ebenfalls wird die Bindung von 3 C-Terminus-spezifischen Anti-Rhodopsin-Antikörpern und die Spaltung mit Trypsin (des (1′ - 9′)) und von Staphylococcus aureus-Protease (des (1′ - 7′)) in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad reduziert (78).

4.2.3. Entfernung C-terminaler Aminosäuren

Daß der Zustand des C-Terminus des Rhodopsinmoleküls einen Einfluß auf die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum für T_α zu haben scheint, lassen auch die folgenden Experimente vermuten:

Mehrere Arbeitsgruppen stellten bei Entfernung von C-terminalen Aminosäuren mit Trypsin, Carboxypeptidase Y, Papain oder Thermolysin z. T. Erhöhungen der gemessenen PDE-Aktivitäten fest (TCp: 10 - 15 %, (72); Papain-(short-term): 20 - 30 %, (75); T, Th(short-term); Papain(short-term): 30 - 40 %, (67). Miller und Dratz (72) sahen im Gegensatz zu Aton und Litman (67) bei Trypsin-modifiziertem Rhodopsin keinen Unterschied zu den Kontroll-Rhodopsinen. Sie führten ihre Beobachtung, daß TCp-Rhodopsin die PDE-Aktivität erhöht, darauf zurück, daß C-terminale Proteolyse die Reassoziation zwischen extrinsischen Proteinen und Diskmembranen erhöht (72).

In den eigenen Experimenten mit Trypsin-Rhodopsin wurden kaum Tendenzen zu höherer katalytischer Aktivität der Präparation im Vergleich zu Rhodopsin festgestellt (s.

Abb. 16). Statistisch gesehen läßt sich zwischen den beiden Präparationen kein Unterschied feststellen.

Die TCp-Präparation zeigt bei kleinen Bleichungen die Tendenz zu höherer katalytischer Aktivität (s. Abb. 16). Statistisch gesehen verhalten sich Kontrolle und TCp-Präparation gleich.

Die Präparationen Th(short) und V8 aus der nicht fraktionierten Proteolyse zeigen ebenfalls die Tendenz zu höherer katalytischer Aktivität, Th(short) deutlicher als V8 (s. Abb. 10 und 11). Eine zweite V8-Präparation (in der Arbeit nicht weiter aufgeführt) zeigte ein ähnliches Verhalten.

4.2.4. Modifikationen am Loop zwischen den Helices 5 und 6

In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollrhodopsinen und der TCpV8-Präparation hinsichtlich erhöhter katalytischer Aktivität der modifizierten Präparation festgestellt. Die vorher nicht signifikant unterschiedliche Präparation TCp wurde durch anschließende Staphylococcus aureus-Protease-Behandlung aktiver (s. Abb. 16 und 17, Tab. V). Der Schnitt in den 3. extradiscalen Loop hätte demnach die Katalyseeigenschaften von Rhodopsin gegenüber Transducin eindeutig erhöht. Wird C-terminal intaktes Rhodopsin mit Staphylococcus aureus-Protease modifiziert, sind lediglich Tendenzen in dieser Richtung

zu sehen, die ebenso auf der C-terminalen Entfernung der Aminosäuren 1′ - 7′ beruhen könnten.

Entfernung von C-terminalen Aminosäuren führt tendenziell - statistisch nicht absicherbar - zu höheren katalytischen Aktvitäten. Ein Grund könnte sein, daß der C-Terminus in enger Nachbarschaft zur Bindungsstelle zwischen T_α und Rhodopsin liegt (s. auch Miller und Dratz, (72)) und aufgrund räumlicher Ausdehnung die Interaktionen zwischen beiden Proteinen beeinflußt.

Die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Ser 109′ und Glu 110′ mittels Staphylococcus aureus-Protease führt zu einer Erhöhung der Ladungen an dieser Stelle, Ser 109′ besitzt nun eine NH_3^+-Gruppe und Glu 110′ eine COO^--Gruppe. Um diese geladenen Gruppen werden sich Hydrathüllen ausbilden, was insgesamt zu einer Ausdehnung des Loops in dieser Region führen wird. Diese Exponierung des Loops könnte, wenn der C-Terminus vorher weitgehend entfernt wurde, zu einer erhöhten Zugänglichkeit zwischen T_α und Rhodopsin führen.

Im Experiment erschien die TCpV8-Präparation im Vergleich zu Rhodopsin um einen Faktor 1,9 aktiver. Dieser Faktor verschwand, nachdem TCpV8 mit Carboxypeptidase Y nachbehandelt wurde. Die erste durchgeführte 3-stufige Hydrolyse von TCpV8 führte nicht zu einem deutlichen Verlust der katalytischen Aktivität der Präparation (Ergebnisse nicht gezeigt), die Präparation verlor jedoch die im Vergleich zu Rhodopsin zuvor aufgetretene erhöhte Aktivität und zeigte nun die Tendenz, kataly-

tisch inaktiver als die Kontrolle zu sein. Aus den Aminosäureanalysen wurde berechnet (s. 3.6.2.), daß Glu 110′ bei etwa 50 % der zur Carboxypeptidase Y-Proteolyse eingesetzten TCpV8-Rhodopsine aus der Loopregion entfernt wurde. Die nachfolgenden Gln 111′ - 112′ - 113′ wurden zu etwa 26 % entfernt. Über eine Verteilung der 26 % auf die 3 Gln kann kaum eine Aussage gemacht werden. Zum überwiegenden Teil ist wohl Gln 111′ entfernt worden und in geringerem Maße Gln 113′.

Die nachfolgende 3-stufige Carboxypeptidase-Behandlung führte - beurteilt nach den Gelergebnissen - zu einer weiteren Proteolyse des Loops. Warum in der Aminosäureanalyse außer dem Nor-Leu-Standard und den sogenannten "Fremdaminosäuren" keine deutlichen Mengen an Loopaminosäuren auftraten (vor allem Gln und Ala wurde erwartet), ist schwer zu sagen.

Im Nukleotidaustausch-Experiment führte die Präparation zu hoch signifikanten Unterschieden ($p < 0{,}1$ %) im Vergleich zu Rhodopsin. Die TCpV8Cp-Präparation braucht zur Erzielung gleicher Nukleotidaustausch-Reaktionen wie bei den Kontrollen eine um einen Faktor 60 höhere Bleichung. Die dargelegten Ergebnisse zeigen, daß Rhodopsin immer dann seine katalytischen Fähigkeiten zur Induktion des Nukleotidaustausches verliert, wenn mit Enzymen Aminosäuren aus der Loopregion zwischen den Helices 5 und 6 entfernt werden (s. V8Cp-, Th(long)-, TCpV8Cp-Präparationen , Kap. 3.4. und 3.7.).

Litman et al. (75) finden nach Papain long-term-Behandlung von Rhodopsin (entspricht in etwa Th(long); (64, 54, 79)) eine Reduzierung der PDE-Aktivität um etwa 30 %. Wie hoch der erzielte Proteolysegrad ist, wird nicht angegeben. Die Bleichintensitäten, die benutzt wurden, sind mit 10 % recht hoch. In Nukleotidaustausch-Experimenten zeigten die Präparationen mit Loop-modifizierten Rhodopsinen - aufgrund geringer Mengen an unverdautem Rhodopsin in der Präparation - bereits ähnliches Austauschverhalten wie die Kontrollen. Die beobachteten Unterschiede im katalytischen Verhalten treten in der Hauptsache bei Bleichungen zwischen 0,01 und 10 % auf.

Aton und Litman (67) finden nach Th(long)-Behandlung sowohl Erhöhung wie Reduzierung der PDE-Aktivität. Ein genauer Proteolysegrad ist nicht angegeben, die gezeigten Gele zeigen deutliche Mengen an nicht Loop-modifiziertem Rhodopsin, die Rhodopsinbleichung in ihren Proben betrug normalerweise 10 %. Wurden die Lichtintensitäten reduziert, so daß Bleichungsgrade erzielt wurden, die unterhalb der maximalen Stimulierung der PDE-Aktivität lagen (< 0,2 %), stellten sie fest, daß die erzielten PDE-Aktivitäten in den modifizierten Proben stets geringer waren als in den Kontrollen. Die gemachten Beobachtungen hinsichtlich der PDE-Aktivierung stimmen somit weitgehend überein mit den Ergebnissen aus den Nukleotidaustausch-Versuchen.

4.2.5. Bindung von Transducin an modifiziertes Rhodopsin

Kühn und Hargrave (65) führten Versuche zur Bindung von Transducin an Rhodopsin durch und stellten dabei fest, daß sich die Dunkelbindungen bei Th(short)-, Th(long)- und Kontrollrhodopsin nicht unterscheiden. Anders bei Bleichung der Proben: Th(long) führte im Vergleich zu Rhodopsin und Th(short) zu einer reduzierten Lichtbindung von Transducin (T_α-GDP). Diese Studie ist ein Hinweis darauf, daß der Grund der reduzierten Nukleotidaustausch-Reaktionen bei Verwendung von Loop-modifiziertem Rhodopsin als Katalysator der Reaktion darin zu suchen ist, daß keine lichtinduzierte Bindung zwischen T_α-GDP und Rh* mehr stattfinden kann. Die Katalysatoreigenschaften des Rhodopsins würden darauf beruhen, daß durch die Bindung zwischen T_α-GDP und Rh* die Konfiguration von T_α derart verändert wird, daß seine Affinität zum gebundenen Nukleotid reduziert wird. Dadurch wird die "Schwelle" zum Nukleotidaustausch herabgesetzt und GDP wird - unter normalen Bedingungen - ausgetauscht gegen GTP (GNP). Dadurch verändert sich erneut die T_α-Konfiguration, T_α-GTP (GNP) verliert seine Affinität zum Rhodopsin und dissoziiert ab, Rh* ist frei zur Katalyse einer weiteren Austauschreaktion.

Daß die zerstörte Bindungsreaktion zwischen Rh* und T_α-GDP für das Verschwinden der Transducin - und damit der PDE-Aktivierung - verantwortlich sein könnte, zeigen auch Versuche von Pellicone et al. (58, 57). Sie untersuchten Konformationsänderungen am Rhodopsin nach Belichtung, die ja Voraussetzung dafür sind, daß T_α zwi-

schen Rh und Rh* unterscheiden kann, und stellten fest, daß die Met-Peptidbindung 253-254 in erhöhtem Maße einer CNBr-Spaltung zugänglich wird und die in ungebleichtem Rhodopsin unzugängliche Met-Peptidbindung 155-156 einer Spaltung zugänglich wird (insgesamt entstehen unter den gewählten Bedingungen für die CNBr-Spaltung bei ungebleichtem Rhodopsin 5 und bei gebleichtem Rhodopsin 6 Spaltprodukte). In Abb. 8 (12) sind neben Met 253 in der 6. Helix die übrigen Met eingezeichnet, die sich im F_2-Fragment befinden und lichtunabhängig einer CNBr-Spaltung unterliegen. Die Met-Peptid 155-156 in der 4. Helix ist in dieser Graphik nicht zu sehen. Wurde Opsin einer CNBr-Spaltung unterworfen, so kam es zu keiner Bindung mit T_α und demnach auch zu keiner PDE-Aktivierung. Anders nach CNBr-Behandlung von ungebleichtem Rhodopsin. Hier führte CNBr-Spaltung je nach Versuchsbedingungen zu einer Reduzierung der PDE-Aktivität um 30 - 50 %. Die Peptidbindung Met 253-254 ist auch im ungebleichten Rhodopsin teilweise einer CNBr-Spaltung zugänglich. Bindung zwischen T_α und CNBr-Rhodopsin wurde, wenn auch stark reduziert, beobachtet, ebenso die nachfolgende Solubilisierung von T_α mittels GTP-γS. Daß die PDE-Aktivität im Vergleich zur T_α-Bindung recht hoch ist, ist wohl darauf zurückzuführen, daß zwar ein aktiviertes Transducin nur eine PDE aktiviert, aber ein aktiviertes PDE-Molekül größenordnungsmäßig 10^3 c-GMP-Hydrolysen katalysiert; diese wurden als Maß für die PDE-Aktivität aufgezeichnet.

Die Konformationsänderungen am Rhodopsin, die nach Bleichung dazu führen, daß die im Dunkeln teilweise

maskierte Peptidbindung Met 253-254 in der Helix 6 nahe dem 3. extradiscalen Loop einer vollständigen CNBr-Spaltung unterliegt (evtl. zusammen mit den Konformationsänderungen am 2. extradiscalen Loop), wären dafür verantwortlich, daß die Bindung zwischen T_α und Rhodopsin und die nachfolgenden Schritte zur PDE-Aktivierung unterbleiben.

Die CNBr-Spaltungen, die zu reduzierten Bindungen zwischen T_α und Rhodopsin führen, zerstören jedoch nicht den Loop zwischen den Helices 5 und 6, der in der vorliegenden Arbeit als katalytisch aktives Zentrum für die Induktion der Nukleotidaustausch-Reaktion angesehen wird. Daß trotzdem die Bindung zwischen T_α und Rhodopsin und nachfolgende Nukleotidaustausch-Reaktionen reduziert werden, könnte folgende Ursache haben: zum Einen wird das gesamte Rhodopsinmolekül durch die CNBr-Spaltung einer starken Modifikation unterworfen. Die Entstehung der 5 bzw. 6 Peptide könnte eine veränderte Lage des gesamten Rhodopsinkomplexes in der Membran zur Folge haben, woraus sich eine Konformationsänderung für die Loopregion ergeben könnte. Zum Anderen ist T_α zur Bindung an Rh* auf das Vorhandensein der $T_{\beta\gamma}$-Untereinheit angewiesen, die in Nachbarschaft zum Rhodopsin an der Membran sitzt (11, 19). Trifft die T_α-Untereinheit - assoziiert an $T_{\beta\gamma}$ - ein gebleichtes Rhodopsin, so kommt es zur Bindung zwischen T_α-Rh*, wobei die Bindung zwischen T_α und $T_{\beta\gamma}$ bestehen bleiben müßte, damit es zu einer Nukleotidaustausch-Reaktion kommen kann. Es wäre also wichtig, daß der Loop, T_α und $T_{\beta\gamma}$ in einer bestimmten räumlichen Anordnung vorliegen. Wird die Peptidbin-

dung Met 253-254 gespalten, so verliert der Loop zwischen den Helices 5 und 6 aller Wahrscheinlichkeit nach seine Membranverankerung an der Seite zur Helix 6; aus dem vormals geordneten Loop entsteht eine nur noch an einer Seite mit der Diskmembran verankerte Peptidkette, an die T_α evtl. nicht mehr, oder nur noch vermindert, heranreichen kann. Bei dem mit Staphylococcus aureus-Protease durchgeführten Schnitt in den Loop, der zu keiner Reduzierung der katalytischen Aktivität führte, blieben die beiden durch Staphylococcus aureus-Protease-Spaltung entstandenen extradiscalen Peptidketten des Loops in der Membran verankert.

4.2.6. Resumée

Aus den gewonnenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und dem Bezug zur Literatur läßt sich also sagen, daß sich das katalytisch aktive Zentrum des Rhodopsins zur Induktion der Nukleotidaustausch-Reaktionen in der Loopregion zwischen den Helices 5 und 6 befindet. Die C-terminal mit Carboxypeptidase Y im 4. Proteolyseschritt entfernten Aminosäuren (ausgehend von TCpV8) Glu 17′ - Leu 21′ könnten gemeinsam mit der zerstörten Loopregion verantwortlich sein für den Verlust an katalytischer Aktivität. Allein haben sie keinen Einfluß auf die Transducinaktivierung, da TCp und TCpV8, denen diese Aminosäuren zu etwa 45 % fehlen, katalytisch gleich bzw. aktiver als die Kontrollrhodopsine waren. Die Carboxypeptidase Y-Behandlung von TCpV8 führte zur Entfernung weiterer Aminosäuren am C-Terminus, so daß insgesamt zu etwa 80 % des (1′ - 21′) Rhodopsin entstand. Wären der

C-Terminus 17′ - 21′ und der Loop zwischen den Helices 5 und 6 gemeinsam verantwortlich für den Katalyseverlust, so wären 20 % an katalytisch aktivem Rhodopsin in der Präparation enthalten, die Menge an katalytisch aktivem Rhodopsin in der TCpV8Cp-Präparation betrug jedoch unter der Voraussetzung, daß modifiziertes Rhodopsin keine Restaktivität mehr besitzt, nur etwa 1 - 2 % (ermittelt aus dem zur 1/2 maximalen Aktivierung benötigten Bleichungsgrad).

4.3. "Nukleotidrückaustausch-Reaktionen"

Fast alle Dosis-Wirkungs-Beziehungen der benutzten Präparationen zeigten nach Erreichen eines maximalen Nukleotidaustausches kein einfaches Sättigungsverhalten, sondern eine Abnahme an gebundenem ^{3}H-GNP zu steigenden Lichtintensitäten hin (Abb. 7, 10, 11, 13, 16, 17). In Zentrifugationsversuchen (s. 2.6., 3.1.5., Abb. 6) wurde gezeigt, daß der Abnahme an gebundenem ^{3}H-GNP im Tracerexperiment eine Abnahme der GNP-induzierten Solubilisierung von T_α entspricht. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, daß mit steigenden Bleichungen die Katalysatormenge für die Nukleotidaustausch-Reaktion erhöht wird. Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für T_α, mit einem Katalysator zusammenzutreffen. Findet T_α-GDP ein gebleichtes Rhodopsin, führt das zum beschriebenen Austausch von GDP gegen GNP. Trifft ein T_α-GNP auf ein gebleichtes Rhodopsin, so liegt das Gleichgewicht für die Affinität zwischen T_α-GNP an Rh* zwar eindeutig auf der Seite der Dissoziation, trotzdem

ist eine Assoziation nicht ausgeschlossen. Ist diese erst einmal erfolgt, reduziert T_α seine Affinität zum gebundenen Nukleotid und eine neue Austauschreaktion kann stattfinden. Damit im Tracer bzw. im Zentrifugationsexperiment keine Abnahme an ^{3}H-GNP bzw. T_α-GNP gesehen wird, muß dieser Austausch wieder mit ^{3}H-GNP bzw. GNP stattfinden; wird in einem zweiten Fall ein GDP gegen ein ^{3}H-GNP (GNP) ausgetauscht, erscheint die Austauschrate reduziert. Mit steigenden Katalysatormengen steigt die Wahrscheinlichkeit für solche GNP ⇒ GDP Austausche. Erhöhung der Nukleotidkonzentrationen von 8 auf 50 µMol/l GNP reduziert den Effekt um einen entscheidenden Anteil, aber nicht vollständig (s. Abb. 6b). Bleichungen von 1 % führten selbst bei 500 µMol/l GNP fast immer zu höheren Austauschwerten als es bei 100 % der Fall war. Für die Interpretation dieser Beobachtung als "Nukleotidrückaustausch" spricht auch der Versuch in Kapitel 3.1.2. Bei konstanter Transducinkonzentration wurde die Rhodopsinkonzentration variiert (vergl. Abb. 2). Nach Erreichen eines optimalen Verhältnisses zwischen Rh* und Transducin nimmt die Menge an gebundenem ^{3}H-GNP mit steigender Rhodopsinkonzentration ab.

Weiterhin sprechen für die Interpretation des "Rückaustausches" die Versuche zur Verdrängung von T_α-gebundenem ^{3}H-GNP (s. 3.1.4., Abb. 5). Wurde ein Reaktionsansatz, der Rh*, $T_{\alpha\beta\gamma}$ und ^{3}H-GNP enthielt, nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten mit der doppelten Menge an nicht radioaktivem GNP versetzt, so nahm die Menge an gebundenem ^{3}H-GNP ab, und zwar bei 1 % Bleichung weniger als bei 100 %. Wurde ein Reaktionsansatz zuerst mit nicht

radioaktivem GNP und dann mit der doppelten Menge an ^{3}H-GNP inkubiert, so waren die Werte an gebundenem ^{3}H-GNP deutlich geringer; außerdem zeigte sich hinsichtlich des Bleichungsgrades das umgekehrte Verhältnis: bei 100 % gebleichtem Rhodopsin sind jetzt mehr ^{3}H-GNP gebunden worden als bei 1 %, d.h. aber, daß in der 100 %-Probe mehr "Rückaustausche" (GNP gegen ^{3}H-GNP) stattgefunden haben, als in den Proben, in denen Rhodopsin zu 1 % gebleicht wurde.

Zu der aufgestellten Hypothese paßt eine von Kühn et al. (42) gemachte Beobachtung in light-scattering Experimenten. Sie stellen eine "spontaneous recovery from saturation" ihrer Präparationen fest. Eine Zeit nach sättigenden Lichtblitzen (> 0,8 %) löste ein neuer Lichtblitz ein weiteres Bindungs- und Dissoziationssignal aus, ermöglicht durch eine zuvor abgelaufene "Nukleotidrückaustausch-Reaktion".

Eine Ausnahme hinsichtlich des Ausbleibens eines Plateaus macht die V8-Präparation (s. Abb. 11). Hier sind die Mengen an gebundenem ^{3}H-GNP bei 1 und 10 % Bleichung gleich. Zwei Experimente mit einer zweiten V8-Präparation (nicht gezeigt) führten für Bleichungen von 0,1 bis 100 % zu gleichen Höhen in der Bindung von ^{3}H-GNP.

Wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen getestet (zweimal), in denen TCpV8Cp und Rhodopsin zusammen in einem Reaktionsansatz waren, so bildete sich ab Bleichungen von 0,1 % ebenfalls ein Plateau aus (s. Abb. 18). In den zuletzt genannten Experimenten ist die Menge an Rhodopsinen im

Vergleich zur vorhandenen Rhodopsinkonzentration doppelt so hoch wie in den übrigen Experimenten. Dies hätte eigentlich im Vergleich zu den Kontrollen zu einer weiteren Abnahme an gebundenem ^{3}H-GNP bei höheren Bleichungen führen sollen. Es wurde im TCpV8Cp + Rh-Experiment aber nur die Menge an Diskmembranen und nicht an katalytisch aktivem Rhodopsin verdoppelt. Bei Rekonstituieren des Ansatzes im Dunkeln sollte Transducin über seine $T_{\beta\gamma}$-Untereinheit an die vorhandenen Diskmembranen binden (11, 19), und das unabhängig davon, ob die vorhandenen Rhodopsine nach Belichtung als Katalysator fungieren können oder nicht. Nach Rhodopsinbleichung befindet sich ein Teil der Transducine an "Ausschußmembranen". An diesen Transducinen wird kein Nukleotidaustausch induziert. Somit ist in dem beschriebenen Reaktionsansatz die Menge an katalytisch aktivem Rhodopsin im Vergleich zur Menge an Transducin reduziert. Im TCpV8Cp + Rh-Experiment ist deswegen die Wahrscheinlichkeit für "Nukleotidrückaustausche" reduziert. Die Beobachtung, daß im TCpV8Cp + Rh-Versuch die Mengen an gebundenem ^{3}H-GNP niedriger sind als in den Kontrollen, läßt sich ebenfalls durch die Verdopplung der Menge an Diskmembranen bei nahezu gleichbleibender Menge an katalytisch aktivierbarem Rhodopsin erklären. Ein Teil der im Reaktionsansatz vorhandenen Transducine steht durch die Bindung an TCpV8Cp-Membranen dem intakten System nicht zur Verfügung.

Das Auftreten des Plateaus bei den V8-Präparationen kann dadurch jedoch nicht erklärt werden. Diese Präparationen geben einen Hinweis darauf, daß sich das Bindungsverhal-

ten zwischen Rh* und T_α-GNP verändert haben könnte. Ausbleiben eines Plateaus in den Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurde so interpretiert, daß GNP ⇒ GDP "Rückaustausche" stattgefunden haben. Das Ausbleiben der Rückaustausche würde bedeuten, daß weniger T_α-GNP mit Rh* in Bindungskontakt getreten ist; die ohnehin geringe Affinität zwischen beiden Molekülen wäre durch den Schnitt in den Loop möglicherweise weiter reduziert. Gegen diese Interpretation spricht jedoch das Ausbleiben des Plateaus bei TCpV8: die Präparation verhält sich in diesem Punkt wie die Kontrolle (Abb. 17). Stryer et al. (13) führten ähnliche Versuche zur Dosis-Wirkungs-Beziehung durch. Zu einem rekonstituierten Membransystem (chromatographisch gereinigtes Rhodopsin + Phosphatidylcholin) gaben sie Transducin hinzu. Sie stellten keine Abnahme hinsichtlich der Nukleotidbindung zu höheren Bleichungen hin fest. Das Verhältnis Transducin zu Rhodopsin betrug in ihren Versuchen 1 : 17 bei 10 µMol/l GNP. Bei der Rekonstitution der Membranen lagert sich Rhodopsin zu einem gewissen Teil "inside-out" in die Membran ein. Stryer et al. geben dafür einen Prozentsatz von 50 an, was bedeuten würde, daß das Verhältnis von Transducin zu aktivierbarem Rhodopsin in dem System lediglich 1 : 8,5 betragen würde. Somit liegt das Verhältnis unter dem, welches in den eigenen Versuchen (1 : 10) gewählt wurde. Außerdem wurde unter anderen Versuchsbedingungen gemessen, die die Bindung von T_α-GNP an Rh* beeinflußt haben könnten.

4.4. Verstärkungsfaktoren nicht proteolysierter Rhodopsine im Vergleich zur Literatur

Die Resultate der Dosis-Wirkungs-Beziehungen wie sie von Stryer et al. (13) dargestellt wurden, entsprechen ansonsten recht gut den eigenen Ergebnissen. 1/2 maximale Mengen an gebundenem GNP wurden bei einer Rhodopsinbleichung von 0,027 % beobachtet (in eigenen Experimenten lagen die Werte bei 0,037 % (Tab. III) bzw. 0,023 % (Tab. V)), ein gebleichtes Rhodopsin katalysierte dabei die Aufnahme von 71 GNP-Molekülen an Transducin (in eigenen Experimenten waren die entsprechenden Werte 70 (s. Tab. III) bzw. 114 gebundene GNP/Rh* (s. Tab. V)). Im nicht rekonstituierten ROS-System fanden Stryer et al. bei 0,0011 % Bleichung (bei 10 µMol/l GNP) eine 1/2 maximale Bindung von GNP über dem ´dark background´; ein gebleichtes Rhodopsin katalysierte hier 500 GNP-Bindungen an Transducin. In eigenen Experimenten wurden für ROS bei 0,001 % Bleichung Verstärkungsfaktoren von 220 und 87 ermittelt (vergl. Tab. III und V).

In den von Stryer et al. beschriebenen Versuchen sind die angeführten Licht-Dunkel-Unterschiede in der Dosis-Wirkungs-Beziehung deutlich geringer (32 bzw. 17,2 mMol GNP/Mol Rhodopsin) als in den eigenen Experimenten. Es wurden auch bei Bleichungen von 0,001 % nicht in allen untersuchten Dosis-Wirkungs-Beziehungen deutliche Unterschiede zum ´dark background´ festgestellt. Die in diesem Punkt ermittelten Verstärkungsfaktoren unterliegen sehr starken Schwankungen (vergl. auch Verstärkungsfaktoren bei rekonstituierten Systemen).

4.5. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse führen zu der Annahme, daß sich der für die Nukleotid-austausch-Reaktion am Transducin katalytisch aktive Bereich des Rhodopsins im Loop zwischen den Helices 5 und 6, und dort in der Region zwischen den Aminosäuren Glu 110′ bis etwa Gln 113′ befindet.

Der Rhodopsin-katalysierte Austausch von Nukleotiden am Transducin ist wahrscheinlich eine Folge von zuvor erfolgter Bindung zwischen T_α und Rh* und daraus resultierender Konformationsänderung des T_α.

Dieser vermutlich erste Schritt in der Rhodopsin - Transducin-Interaktion sollte in weiteren Versuchen durch proteolysiertes Rhodopsin näher charakterisiert werden und könnte evtl. Aufschluß über generelle Rezeptor-Effektor-Beziehungen geben.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

1) Die lichtinduzierte, Rhodopsin-katalysierte Bindung von ^{3}H-GTP und verschiedener seiner Analoga im Austausch gegen GDP (Nukleotidaustausch) an die α-Untereinheit von Transducin ($T\alpha$) wurde in Tracerexperimenten untersucht.

Rhodopsinbleichungen von 1 % führten zu maximaler Bindung der Nukleotide an $T\alpha$.

Bei Rhodopsinbleichungen von 0,001 % wurden folgende Verstärkungsfaktoren über dem ´dark background´ ermittelt: In Experimenten mit kompletten ROS (n = 5) wurden bei diesem Bleichungsgrad Bindungen von 87 ^{3}H-GNP-Molekülen an $T\alpha$ pro gebleichtem Rhodopsin (Rh*) ermittelt. (In einer zweiten Präparation (n = 6) wurden 220 Moleküle ^{3}H-GNP/Rh* gebunden).

Im rekonstituierten System wurden 109 Moleküle (n = 7) ^{3}H-GNP/Rh* gebunden (2. Präparation: 320 Moleküle ^{3}H-GNP$_{bound}$/Rh*, (n = 8)). Halbmaximale ^{3}H-GNP-Bindungen an $T\alpha$ wurden für das komplette ROS-System bei 0,0263 % gebleichtem Rhodopsin ermittelt (bzw. bei 0,0229 % Rh*). Die entsprechenden Werte für das rekonstituierte System waren 0,0234 % (bzw. 0,0372 %) Rh*.

Pro Rh* ergab sich daraus für das komplette ROS-System ein Verstärkungsfaktor von 129 Molekülen

^{3}H-GNP$_{bound}$ (122 Moleküle ^{3}H-GNP$_{bound}$ in der 2. Präparation); beim rekonstituierten System betrugen die Verstärkungsfaktoren 114 Moleküle 3H-GNP$_{bound}$ (bzw. 70 Moleküle ^{3}H-GNP$_{bound}$).

2) Verschiedene proteolytisch modifizierte Rhodopsine wurden hinsichtlich ihrer Katalyseeigenschaften bei der Bindung von ^{3}H-GNP an Tα untersucht. Zur Proteolyse wurden Experimente mit den Enzymen Thermolysin, Trypsin, Carboxypeptidase Y und Staphylococcus aureus-Protease V8 gemacht. Die erzielten Ausmaße der Proteolyse wurden auf Rund- und Plattengelen und nach Carboxypeptidase Y-Verdauung zusätzlich über Aminosäureanalysen untersucht. Es wurde festgestellt, daß Rhodopsinproteolysen mit Thermolysin immer zu einem Gemisch aus unterschiedlich modifizierten Rhodopsinen führte. Es kam somit für die Klärung der Fragestellung nach einem katalytisch aktiven Zentrum am Rhodopsin nicht in Betracht.

Bei den Rhodopsinmodifikationen sind zwei Typen zu unterscheiden: C-terminale Modifikationen und Modifikationen am Loop zwischen den Helices 5 und 6.

a) Entfernung von C-terminalen Aminosäuren (vollständig bis Ala 16′ und zu etwa 50 % bis Pro 22′) führt zu keiner statistisch absicherbaren Veränderung der katalytischen Eigenschaften des Rhodopsins beim Nukleotidaustausch. Es wurde in mehreren

Fällen die Tendenz zu höheren Katalyseeigenschaften beobachtet.

Ein derart modifiziertes Rhodopsin (TCp) katalysiert bei 0,001 % Bleichung 174 Bindungen von ^{3}H-GNP an T_{α}. Halbmaximale Nukleotidbindung wurde bei einer Bleichung von 0,0209 % ermittelt, der zugehörige Verstärkungsfaktor (^{3}H-GNP$_{bound}$/Rh*) betrug 121. Maximale Nukleotidbindung tritt bei 1 % Bleichung auf.

b) Ein Schnitt in die Loopregion zwischen den Helices 5 und 6 ohne Entfernung von Aminosäuren führt ebenfalls zu keinem Verlust der katalytischen Eigenschaften. Wurde C-terminal modifiziertes Rhodopsin (TCp) einer anschließenden derartigen Loopmodifikation unterzogen (TCpV8, 1 Präparation, n = 6), führte das sogar zu einer statistisch absicherbaren Erhöhung der Katalyseeigenschaften. Für diese Präparation wurde bei 0,001 % Bleichung ein Verstärkungsfaktor von 370 ^{3}H-GNP$_{bound}$/Rh* ermittelt. Halbmaximale Nukleotidbindung erfolgt bereits, wenn 0,0132 % Rhodopsin gebleicht wurde. Daraus ergibt sich ein Verstärkungsfaktor von 215 ^{3}H-GNP$_{bound}$ pro Rh* bei diesem Bleichungsgrad. Maximale Nukleotidbindung tritt bereits bei 0,1 % gebleichtem Nukleotid auf.

c) Entfernung von Aminosäuren aus dem Loop zwischen den Helices 5 und 6 (TCpV8Cp) führt bei Bleichungen von 0,001 % über dem ´dark background´ zu einem

Verstärkungsfaktor (174 ^{3}H-GNP$_{bound}$/Rh*), der ähnlich hoch ist, wie die Faktoren bei unproteolysiertem oder C-terminal modifiziertem Rhodopsin. Bei Bleichungsgraden, die deutlich über dem ´dark background´ liegen, treten eindeutig reduzierte Eigenschaften hinsichtlich der Katalyse der Nukleotidaustausch-Reaktion am T_{α} auf. Maximale Nukleotidbindung wird erst bei 100 % Bleichung erreicht. Halbmaximale Nukleotidbindung mit 1,9 ^{3}H-GNP$_{bound}$/ Rh* wurde bei 1,74 % Rh* ermittelt.

3) Die Lage des katalytisch aktiven Zentrums am Rhodopsin für die Katalyse der Nukleotidaustausch-Reaktion am T_{α} im Bereich des Loops zwischen den Helices 5 und 6 und hier im Bereich der Aminosäuren Glu 110´ bis etwa Gln 113´ wurde diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

(1) Yoshikami, S., Hagins, W.A. (1973)
Control of the dark current in vertebrate rods and cones.
Biochemistry and Physiology of Visual Pigments.
Langer, H. (Herausg.), Springer Verlag, Berlin,
S. 245 - 255

(2) Altman, J. (1985)
Sensory transduction. New visions in photoreception.
Nature, 313, 264 - 265

(3) Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S., Lynbarsky, A.L. (1985)
Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment.
Nature, 313, 310 - 313

(4) Matthews, H.R., Torre, V., Lamb, T.D. (1985)
Effects on the photoresponse of calcium buffers and cyclic GMP incorporated into the cytoplasm of retinal rods.
Nature, 313, 582 - 585

(5) Yau, K.-W., Nakatani, K. (1985)
Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment.
Nature, 313, 579 - 582

(6) Lewin, R. (1985)
Unexpected progress in photoreception.
Science, 227, 500 - 503

(7) Miller, W.H. (1983)
Physiological effects of cyclic GMP in the vertebrate retinal rod outer segment.
Adv. Cycl. Nucl. Res., 15, 495 - 511

(8) Miller, W.H., Nicol, G.D. (1979)
Evidence that cyclic GMP regulates membrane potential in rod photoreceptors.
Nature, 280, 64 - 66

(9) Penn, R.D., Hagins, W.A. (1972)
Kinetics of the photocurrent in retinal rods.
Biophys. J., 12, 1073 - 1094

(10) Yau, K.-W., Nakatani, K. (1984)
Electrogenic Na-Ca exchange in retinal rod outer segment.
Nature, 311, 661 - 663

(11) Kühn, H. (1981)
Interactions of rod cell proteins with the disk membrane: Influence of light, ionic strenght, and nucleotides.
Curr. Top. Membr. Transp., 15, 171 - 201

(12) Wheeler, G.L., Bitensky, M.W. (1977)
A light-activated GTPase in vertebrate photoreceptors: Regulation of light-activated cyclic GMP phosphodiesterase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (10), 4238 - 4242

(13) Stryer, L., Hurley, J.B., Fung, B.K.-K. (1981)
First stage of amplification in the cyclic-nucleotide cascade of vision.
Curr. Top. Membr. Transp., 15, 93 - 108

(14) Stryer, L., Hurley, J.B., Fung, B.K.-K. (1981)
Transducin: an amplifier protein in vision.
TIBS, September 1981, 245 - 247

(15) Fung, B.K.-K., Hurley, J.B., Stryer, L. (1981)
Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1), 152 - 156

(16) Fung, B.K.-K., Nash, C.R. (1983)
Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. II. Evidence for distinct binding sites and conformational changes revealed by limited proteolysis with trypsin.
J. Biol. Chem., 258 (17), 10503 - 10510

(17) Kühn, H. (1980)
Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes.
Nature, 283 (57471), 587 - 589

(18) Baehr, W., Morita, E.A., Swanson, R.J., Applebury, M.L. (1982)
Characterization of bovine rod outer segment G-protein.
J. Biol. Chem., 257 (11), 6452 - 6460

(19) Fung, B.K.-K. (1983)
Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits.
J. Biol. Chem., 258 (17), 10495 - 10502

(20) Leberman, R., Egner, U. (1984)
Homologies in the primary structure of GTP-binding proteins: the nucleotide-binding site of EF-Tu and p21.
EMBO J., 3 (2), 339 - 341

(21) Vandenberg, C.A., Montal, M. (1984)
Light-regulated biochemical events in invertebrate photoreceptors. 1. Light-activated guanosinetriphosphatase, guanine nucleotide binding, and Cholera toxin catalyzed labeling of squid photoreceptor membranes.
Biochem., 23, 2339 - 2347

(22) Rodbell, M. (1980)
The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction.
Nature, 284, 17 - 22

(23) Hurley, J.B., Simon, M.I., Teplow, D.B. (1984)
Homologies between signal transducing G-proteins and ras gene products.
Science, 226, 860 - 862

(24) Allende, J.E. (1982)
The binding, hydrolysis and release of GTP and GDP as a mechanism that regulates the reversible association of macromolecules. A comparison of four different systems.
Arch. Biol. Med. Exp., 15, 347 - 355

(25) Kanaho, Y., Tsai, S.-C., Adamik, R., Hewlett, G.L., Moss, J., Vaughan, M. (1984)
Rhodopsin-enhanced GTPase activity of the inhibitory GTP-binding protein of adenylate cyclase.
J. Biol. Chem., 259 (12), 7378 - 7381

(26) Manne, V., Yamazaki, S, Kung, H.-F. (1984)
Guanosine nucleotide binding by highly purified Ha-ras-encoded p21 protein produced in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6953 - 6957

(27) Tamanoi, F., Walsh, M., Kataoka, T., Wigler, M. (1984)
A product of yeast RAS2 gene is a guanine nucleotide binding protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6924 - 6928

(28) Temeles, G.L., Gibbs, J.B., D'Alonzo, J.S., Sigal, J.S., Scolnick, E.M. (1985)
Yeast and mammalian ras proteins have conserved biochemical properties.
Nature, 313, 700 - 703

(29) Lochrie, M.A., Hurley, J.B., Simon, M.I. (1985)
Sequence of the alpha subunit of photoreceptor G-protein: Homologies between transducin, ras, and elongation factors.
Science, 228, 96 - 99

(30) Gillman, A.G. (1984)
G-proteins and dual control of adenylate cyclase.
Cell, 36 (3), 577 - 579

(31) Wheeler, G.L., Matuo, Y., Bitensky, M.W. (1977)
Light-activated GTPase in vertebrate photoreceptors.
Nature, 269, 822 - 823

(32) Navon, S.E., Fung, B.K.-K. (1984)
Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments.
J. Biol. Chem., 259 (10), 6686 - 6693

(33) Tsai, S.-C., Adamik, R., Kanaho, Y., Hewlett, E.L., Moss, J. (1984)
Effects of guanyl nucleotides and rhodopsin on ADP-ribosylation of the inhibitory GTP-binding component of adenylate cyclase by pertussis toxin.
J. Biol. Chem., 259 (24), 15320 - 15323

(34) Hubbell, W.L., Bownds, M.D. (1979)
Visual transduction in vertebrate photoreceptors.
Ann. Rev. Neurosci., 2, 17 - 34

(35) Hurley, J.B., Fong, H.K.W., Teplow, D.B., Dreyer, W.J., Simon, M.J. (1984)
Isolation and characterization of a cDNA clone for the subunit of bovine retinal transduction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6948 - 6952

(36) Bitensky, M.W., Wheeler, M.A., Rasenick, M.M., Yamazaki, A., Stein, P.J., Halliday, K.R., Wheeler, G.L. (1982)
Functional exchange of components between light-activated photoreceptor phosphodiesterase and hormone-activated adenylate cyclase systems.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3408 - 3412

(37) Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1984)
Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.
Nature, 312, 315 - 321

(38) Cockcroft, S., Gomperts, B.D. (1985)
Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase.
Nature, 314 (6001), 534 - 536

(39) Joseph, S.K. (1984)
Inositol triphosphate: an intracellular messenger produced by Ca^{2+} mobilizing hormones.
TIBS, 9 (10), 420 - 421

(40) Ghalayini, A., Anderson, R.E. (1984)
Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate: Light-mediated breakdown in the vertebrate retina.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 124 (2), 503 - 506

(41) Brown, J.E., Rubin, L.J., Ghalayini, A.J., Tarver, A.P., Irvine, R.F., Berridge, M.J., Anderson, R.E. (1984)
Myo-inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in Limulus photoreceptors.
Nature, 311 (5982), 160 - 163

(42) Kühn, H., Bennett, N., Michel-Villaz, M., Chabre, M. (1981)
Interactions between photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein: Kinetic and stoichometric analyses from light-scattering changes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (11), 6873 - 6877

(43) Godchaux, W. III, Zimmermann, W.F. (1979)
Membrane-dependent guanine nucleotide binding and GTPase activities of soluble protein from bovine rod cell outer segments.
J. Biol. Chem., 254 (16), 7874 - 7884

(44) Fung. B.K.-K., Stryer, L. (1980)
Proteolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (5), 2500 - 2504

(45) Ho, Y.-K., Fung, B.K.-K. (1984)
Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments.
J. Biol. Chem., 259 (10), 6694 - 6699

(46) Halliday, K.R., Stein, P.J., Chernoff, N., Wheeler, G.L., Bitensky, M.W. (1984)
Limited trypsin proteolysis of photoreceptor GTP-binding protein.
J. Biol. Chem., 259 (1), 516 - 525

(47) Hofmann, K.P., Reichert, J. (1985)
Chemical probing of the light-induced interaction between rhodopsin and G-protein. - Near infrared light-scattering and sulfhydryl modifications.
J. Biol. Chem. (in press)

(48) Reichert, J., Hofmann, K.P. (1984)
Sulfhydryl group modification of photoreceptor G-protein prevents its light-induced binding to rhodopsin.
FEBS, 168 (1), 121 - 124

(49) Van Dop, C., Yamanaka, G., Steinberg, F., Sekura, R.D., Mandark, C.R., Stryer, L., Bourne, H.R. (1984)
ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin blocks the light-stimulated hydrolysis of GTP and cGMP in retinal photoreceptors.
J. Biol. Chem., 259 (1), 23 - 26

(50) Dratz, E.A., Hargrave, P.A. (1983)
The structure of rhodopsin and the rod outer segment disk membrane.
TIBS, 8 (4), 128 - 131

(51) O'Brien, D.F. (1982)
The chemistry of vision.
Science, 218 (4576), 961 - 966

(52) Wald, G. (1968)
Molecular basis of visual excitation.
Science, 162, October 1968, 230 - 239

(53) Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Fong, S.-L., Rao, J.K.M., Argos, P. (1983)
The structure of bovine rhodopsin.
Biophys. Struct. Mech., 9, 235 - 244

(54) Mullen, E., Akhtar, M. (1981)
Topographic and active-site studies on bovine rhodopsin.
FEBS Letters, 132 (2), 261 - 264

(55) Hargrave, P.A., Fong, S.-L., McDowell, J.H., Mas, M.T., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Smith, D.P. (1980)
The partial primary structure of bovine rhodopsin and its topography in the retinal rod cell disc membrane.
Neurochem., 1, 231 - 244

(56) Wilden, U., Kühn, H. (1982)
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites.
Biochem. USA, 21 (12), 3014 - 3021

(57) Pellicone, C., Nullans, G., Virmaux, N. (1985)
Localization of light-induced conformational changes in bovine rhodopsin.
FEBS, 181 (1), 179 - 183

(58) Pellicone, C., Cook, N.J., Nullans, G., Virmaux, N. (1985)
Light-induced conformational change in rhodopsin detected by modification of G-protein binding, GTP- S binding and cGMP phosphodiesterase activation.
FEBS, 181 (1), 184 - 188

(59) Kühn, H., Mommertz, O., Hargrave, P.A. (1982)
Light-dependent conformational change at rhodopsin's cytoplasmic surface detected by increased susceptibility to proteolysis.
Biochim. Biophys. Act., 679 (1), 95

(60) Wheeler, G.L., Bitensky, M.W. (1977)
A light-activated GTPase in vertebrate photoreceptors: Regulation of light-activated cyclic GMP phosphodiesterase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (10), 4238 - 4242

(61) Kühn, H. (1978)
Light-regulated binding von rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes.
Biochem., 17 (21), 4389 - 4395

(62) Kühn, H. (1982)
Light-regulated binding of proteins to photoreceptor membranes and its use for the purification of several rod cell proteins.
Methods in Enzymology, 81, 556 - 564

(63) Godchaux III, W., Zimmermann, W.F. (1982)
The ambiquitous GTPase of bovine rod cell outer segments.
Methods in Enzymology, 81, 564

(64) Sale, G.J., Towner, P., Akhtar, M. (1977)
Functional rhodopsin complex consisting of three noncovalently linked fragments.
Biochem., 16, 5641 - 5649

(65) Kühn, H., Hargrave, P.A. (1981)
Light-induced binding of guanosinetriphosphatase to bovine photoreceptor membranes: Effect of limited proteolysis of the membranes.
Biochem., 20 (9), 2410 - 2417

(66) Hargrave, P.A., Fong, S.-L. (1977)
The amino- and carboxyl-terminal sequence of bovine rhodopsin.
J. Supramol. Struct., 6, 559 - 570

(67) Aton, B., Litman, B.J. (1984)
Activation of rod outer segment phosphodiesterase by enzymatically altered rhodopsin: A regulatory role for the carboxyl terminus of rhodopsin.
Exp. Eye Res., 38, 547 - 559

(68) Prober, J.S., Stryer, L. (1975)
Light dissociates enzymatically-cleaved rhodopsin into two different fragments.
J. Mol. Biol., 95, 477 - 481

(69) Wehner, M., Hargrave, P.A., Kühn, H. (1983)
Proteolytic modifications of rhodopsin and its influence on GDP-GDP exchange.
BPS-ARVO, Bristol-England (Poster)

(70) Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Siemiatkowski-Juszczak, E.C., Fong, S.-L., Kühn, H., Wang, J.K., Curtis, D.R., Rao, J.K.M., Argos, P., Feldmann, R.J. (1982)
The carboxyl-terminal one-third of bovine rhodopsin: Its structure and function.
Vis. Res., 22, 1429 - 1438

(71) Hargrave, P.A. (1982)
Rhodopsin chemistry, structure and topography.
Progr. in Retinal Res., 1, 1 - 51

(72) Miller, J.L., Dratz, E.A. (1984)
Phosphorylation at sites near rhodopsin's carboxyl-terminus regulates light initiated cGMP hydrolysis.
Vis. Res., 24 (11), 1509 - 1521

(73) Findlay, J.B.C., Brett, M., Pappin, D.J.C. (1981)
Primary structure of C-terminal functional sites in bovine rhodopsin.
Nature, 293, 314 - 316

(74) Bennett, N., Dupont, Y. (1985)
The G-protein of retinal ROS (transducin).
J. Biol. Chem., 260 (7), 4156 - 4168

(75) Litman, B.J., Aton, B., Hartley, J.B. (1982)
Functional domains of rhodopsin.
Vis. Res., 22, 1439 - 1442

(76) Papermaster, D.S., Dreyer, W.J. (1974)
Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods.
Biochem., 13 (11), 2438 - 2444

(77) Arshavsky, V.Yu., Dizhoor, A.M., Shestakova, J.K., Philippoo, P.P. (1985)
The effect of rhodopsin phosphorylation on the light-dependent activation of phosphodiesterase from bovine rod outer segments.
FEBS, 181 (2), 264 - 266

(78) Molday, R.S., MacKenzie, D. (1985)
Inhibition of monoclonal antibody binding and proteolysis by light-induced phosphorylation of rhodopsin.
Biochem., 24 (3), 776 - 781

(79) Abdulev, N.G., Artamanov, I.D., Bogachuk, A.S., Feigina, M.Yu., Kostina, M.B., Kudelin, A.B., Martynov, V.I., Miroshnikov, A.I., Zolotarev, A.S., Ovchinnikov, Yu.A. (1982)
Biochem. Int., 5 (6), 693 - 703

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die durch stete Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik das Zustandekommen dieser Arbeit gefördert haben:

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Kühn, Herrn Prof. Dr. H. Stieve und allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Neurobiologie, sowie Herrn Dr. P.A. Hargrave.

Herrn R. Esser danke ich für die Beschaffung der Rinderaugen vom Schlachthof und Herrn E. Wüst für die Herstellung des größten Teils der Rinder-ROS-Präparationen.

Herrn Dr. J. Föhles gilt mein Dank für die Durchführung der Aminosäureanalysen und Herrn Dipl. Biol. J. Weyand für seine Hilfe bei der Anfertigung der Plattengele.

Meinem Mann, Herrn Dr. F. Wehner, danke ich für seine Hilfe bei der Anfertigung der graphischen Darstellungen, sowie Frau D. Schröder für das Tippen des Manuskriptes.