



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

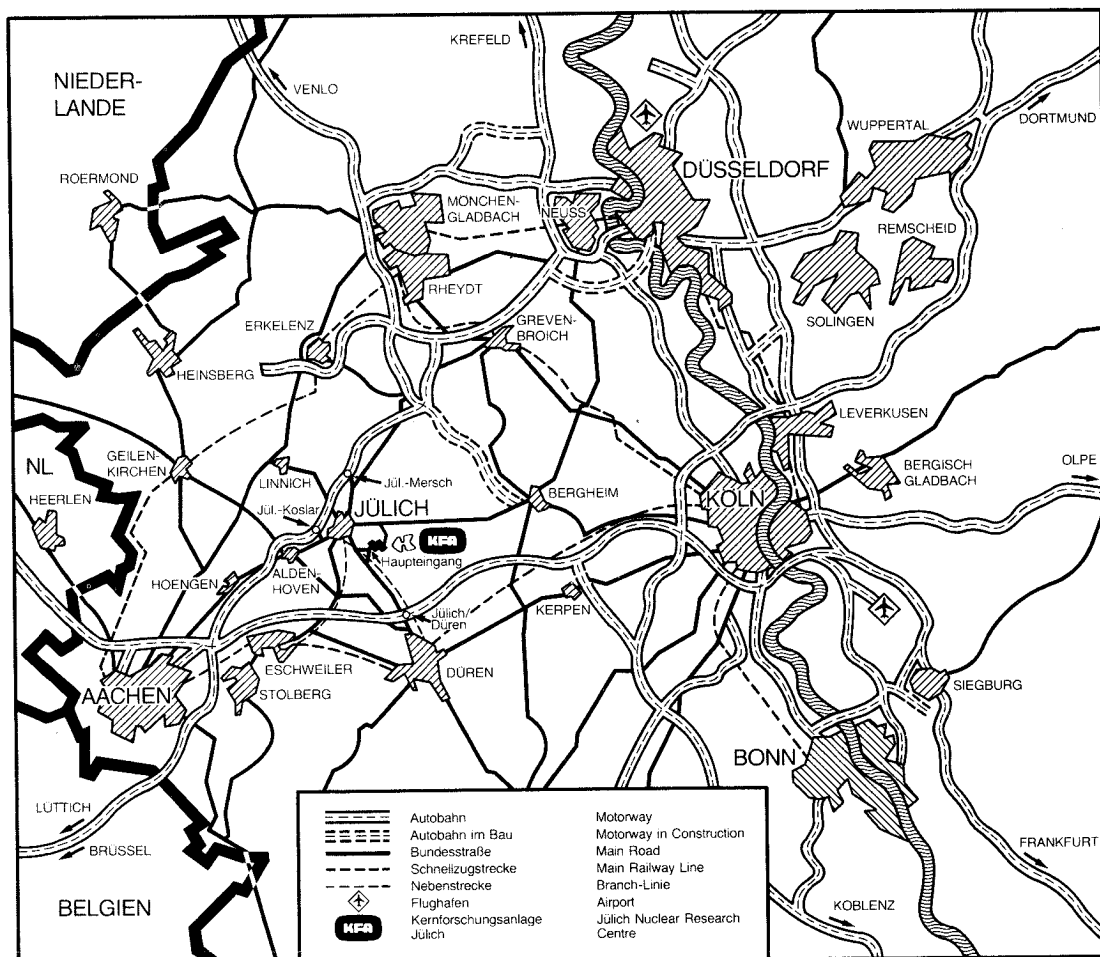
Institut für Biologische Informationsverarbeitung

**Antikörper gegen Membranproteine der
Cephalopoden-Sehzell-Membran als Mittel zur
Untersuchung des Transduktionsprozesses
der Evertibraten-Lichtsinnesezelle**

von

Herbert Conen

**Jül-2175
Januar 1988
ISSN 0366-0885**



Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2175
 Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-2175

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 19 13 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

**Antikörper gegen Membranproteine der
Cephalopoden-Sehzell-Membran als Mittel zur
Untersuchung des Transduktionsprozesses
der Evertibraten-Lichtsinneszelle**

von

Herbert Conen

D 82 (Diss. T.H. Aachen)

INHALTSVERZEICHNIS

	Summary.....	1
1.	Einleitung.....	5
2.	Material und Methoden.....	8
2.1	Präparation der Augen.....	8
2.2	Photorezeptorpräparation.....	8
2.3	Lichtbedingungen.....	9
2.3.1	Präparation der Augen und der photosensorischen Membranen.....	9
2.3.2	Belichtung der photosensorischen Membranen.....	9
2.4.	Solubilisierung der Membranproteine aus den Mikrovilli der <i>Sepia</i> retina.....	10
2.4.1	Solubilisierung der Membranproteine mit organischen Lösungsmitteln.....	10
2.4.2	Solubilisierung der Membranproteine mit Detergenzien.....	10
2.5	Säulenchromatographische Auftrennung der Proteine.....	12
2.5.1	Gelpermeationschromatographie mit einer Niederdruckanlage.....	12
2.5.2	Ionenaustauscherchromatographie mit einem Hochdrucksystem.....	13
2.6	Lösen der Membranprotein-Zytoskelettprotein-Interaktion.....	14
2.6.1	Chaotrope Behandlung der Membranen.....	14
2.6.2	Behandlung der Membranen mit basischem pH.....	14
2.7	Behandlung der licht- und dunkeladaptierten Membranen mit Guaninnucleotid-haltigen Puffern.....	15
2.8	Antikörperherstellung.....	16
2.8.1	Herstellung von polyklonalen Seren gegen Gesamtprotein.....	16
2.8.2	Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen gelelektrophoretisch aufgereinigten Proteinen.....	17

2.8.3	Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen die mit pH 11 solubilisierten Proteine.....	18
2.8.4	Herstellung eines polyklonalen Serums gegen GTP-solubalisierte Proteine aus der <i>Sepia</i> retina.....	18
2.9	Gewinnung von IgG-Antikörpern aus den Antiseren..	18
2.10	Radioimmunoassay und ELISA.....	19
2.11	Test der Antiseren mit der Immunoblot-Technik....	21
2.11.1	Färben der Proteine auf Nitrocellulosefiltern....	23
2.12	Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony.....	23
2.13	Gelelektrophorese nach Laemmli.....	24
2.13.1	Anfärben der Proteinbanden in SDS-Gelen.....	25
2.14	Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
2.15	Adenylatcyclase Assay.....	26
2.16	[³² P] ADP-Ribosylierung.....	27
2.16.1	[³² P] ADP-Ribosylierung mit Cholera-Toxin.....	27
2.16.2	[³² P] ADP-Ribosylierung mit Pertussis-Toxin.....	28
3.	Ergebnisse.....	30
3.1	Test der Kreuzreaktivität von <i>Limulus</i> und <i>Sepia</i>	30
3.2	Antigenaufreinigung.....	35
3.2.1	Extraktion mit organischen Lösungsmitteln.....	35
3.2.2	Detergenzextraktion der Membranproteine.....	35
3.2.3	Proteintrennung mit Niederdruck-Säulen-chromatographie.....	37
3.2.4	Proteintrennung mit Ionenaustauscherchromatographie mit einer FPLC-Anlage.....	37
3.2.5	Chaotrope Behandlung der Membranen.....	41
3.2.6	Inkubation der Membran bei pH 11.....	42
3.3	Licht-und nucleotidabhängiges Binden der 36/44 kDa Peptide.....	43
3.4	Bindungsexperimente mit polyklonalen monospezifischen Antikörpern.....	47
3.4.1	Antikörperherstellung gegen elektrophoretisch aufgereinigte Proteine.....	47

3.4.2	Antiseren gegen die löslichen Proteine des pH 11 Extraktes.....	51
3.4.3	Kreuzreaktivität der 36/44 kDa Proteine mit Anti-G-Protein Antiseren.....	52
3.5	Identifizierung des Guanin-Nucleotid-abhängigen 44 kDa Peptids in der Membranfraktion von <i>Sepia</i> mit pharmakologischen Methoden.....	58
3.5.1	Aktivierung der Adenylatcyclase mit dem 44 kDa Protein im Adenylatcyclase Assay.....	58
3.5.2	ADP-Ribosylierung des 44 kDa Proteins mit Cholera- und Pertussis Toxin.....	60
4.	Diskussion.....	62
4.1	Kreuzreaktion zwischen <i>Limulus</i> und <i>Sepia</i>	62
4.2	Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen G-Protein Untereinheiten von Vertebraten mit dem 36 und 44 kDa Proteinen.....	64
4.3	ADP-Ribosylierungsexperimente.....	65
4.4	Solubilisierung der 36 und 44 kDa Proteine mit GTP- γ -S von belichteten Membranen.....	66
	Literaturverzeichnis.....	69

Summary

In invertebrate photoreceptors signal transduction is not as well investigated as in bovine rod outer segments (Stryer, 1981). The initial event in both vertebrate and invertebrate photoreceptors is the photoisomerisation of the chromophor of the photopigment rhodopsin. There is circumstantial evidence for a G-protein being the target enzyme for the active metarhodopsin: There is an intrinsic GTPase activity that is induced by blue and suppressed by red illumination in *musca* eyes (Blumenfeld et al, 1986) and also a light-dark difference in GTPase activity in squid photoreceptors (Saibil & Michel-Villaz, 1984). Blumenfeld et al. (1986) showed that the light activated GTPase activity in fly (*musca*) photoreceptors is associated with a long lasting excited state of metarhodopsin. This metarhodopsin seems also to be responsible for a prolonged depolarizing afterpotential in fly photoreceptors (Hamdorf & Razmjoo, 1977 and 1979 / Hamdorf, 1979). Injections of GDP- β -S, a poorly hydrolysable analogues of GDP into the ventral photoreceptor of *Limulus* depress the sensitivity of the cells to light (Bolsover & Brown, 1982). Also a light induced binding of a stable GTP analogue, GTP- γ -S, was shown in squid (*L. opalescens*, *L. pealei*) microvillar photoreceptor membranes (Vandenberg & Montal, 1984). Moreover photoexcited rhodopsin of squid and octopus photoreceptors can trigger the intrinsic GTPase activity of mammalian transducin in the absence of bovine rhodopsin (Vandenberg & Montal, 1984 / Saibil & Michel-Villaz). Furtheron a 46 kDa protein exhibits limited sequence homologies to transducin (Saibil & Michel-Villaz, 1984). These evidences indicate the involvement of a G-protein also in the invertebrate transduction process.

In this work I show the light induced binding of 44 and 36 kDa M_r proteins only to light adapted photosensoric membranes of *Sepia officinalis* and not to the same membranes in the dark adapted state. The bound proteins cosedimented with these membranes also under hypotonic conditions and were solubilized from membranes with GTP or GTP- γ -S containing buffers. Phosphorylation and by this way inactivation of photoexcited metarhodopsin takes not place in these preparations since the watersoluble proteins and thereby the metarhodopsinkinase were removed by centrifugation (Bentrop & Paulsen, 1986 / Paulsen et al., 1987). This is the first direct evidence for the light- and guanine-nucleotide dependent interaction of this protein with the photosensoric membranes.

For further characterization of the 44 kDa protein I made ADP-ribosylation experiments with cholera- and pertussis toxin to identify the above mentioned 44 kDa protein by this way as a α -subunit of a G-protein (Vandenberg & Montal, 1984 / Bentrop & Paulsen, 1986 / Paulsen & Bentrop, 1986 / Tsuda et al., 1986). In these experiment the 44 kDa protein of the photosensitive membranes of *Sepia* was radio-labelled by ADP-ribosylation only by cholera toxin but not by pertussis toxin (see also Paulsen & Bentrop, 1986). On account of the substrate-specificity of the ADP-ribosyltransferase cholera toxin (Ribeiro-Neto et al., 1985), the 44 kDa by this way is identified as a α -subunit of a G-protein in the photoreceptors of *Sepia*.

In reconstitution experiments with the 36 and 44 kDa proteins into the human hormone-receptor-stimulated adenylate cyclase system of cyc- lymphoma cells, I investigated whether these proteins are subunits of a adenylate cyclase associated G-protein in *Sepia* photoreceptors (Codina et al., 1985). This system was shown to be compatible with invertebrate G-proteins (*Limulus*) in reconstitution experiments (Brown et al., 1984). The results clearly show that these

proteins do not activate the adenylate cyclase and thereby indicate that in *Sepia* photoreceptors adenylate cyclase do not contribute to phototransduction process by mediating the intracellular cAMP level (see also Brown et al., 1984 / Corson et al., 1979).

Antibodies are a good tool to look for common determinants in different proteins, particular proteins of animals as different as invertebrates and vertebrates.

With antisera raised against synthetic peptides, 16 and 17 amino-acids residues long and a sequence corresponding either to α - or to β -subunits of sequenced G-proteins of vertebrates (Mumby et al., 1985), I investigate the crossreactivity with the 36 and 44 kDa proteins of the photosensitive membranes of *Sepia* with the immunoblotting technique (Towbin et al., 1979 / Rosenthal, W., 1986). These antisera recognize highly specific the 36 kDa and the 44 kDa proteins of *Sepia* photoreceptors, either in the whole membrane fraction and also the GTP extracted proteins. These results show, that the 36 and 44 kDa proteins exhibits sequence homologies with their corresponding $G\alpha$ and $G\beta$ subunits of transducin and the non retinal G-proteins G_o and G_i of vertebrates. These results support strongly the above described identification of the two proteins as subunits of a G-protein in *Sepia* photoreceptors.

This is the first shown immunological crossreactivity of antibodies against vertebrate G-proteins with invertebrate photoreceptor proteins. Only a very weak label of a 36 kDa protein in *octopus* microvillar membranes occurs using a anti-transducin (β - subunit) antiserum (Tsuda et al., 1986).

Together the presented results are strong evidences that the 36 and 44 kDa proteins of the photoreceptor membranes of *Sepia* are subunits of a G-protein. Furthermore, the

light and guanine nucleotide dependent interaction of these proteins with the microvillar membranes suggest that this G-protein is involved in phototransduction process in invertebrate photoreceptors. The target enzyme of this light receptor activated G-protein seems not to be an adenylate cyclase but the phospholipase C (see for review Payne, R., 1986).

1. Einleitung

Photorezeptorzellen sind die spezialisierten zur Lichtabsorption befähigten Zellen in den Lichtsinnesorganen. Sie absorbieren Photonen, verarbeiten das Signal und leiten es an das Nervensystem weiter. Damit ermöglichen sie dem Organismus die Aufnahme von Information aus der Umwelt, die in Form von Licht an ihn herangetragen wird (Stieve, 1985 / Stieve, 1986).

Auf molekularer Ebene ist das Chromoprotein Rhodopsin für die Reizaufnahme, d.h. die Absorption von Lichtquanten verantwortlich. Die nachfolgende Weiterleitung des Signals, die Transduktion, erfolgt über eine Enzymkaskade innerhalb der Rezeptorzelle, wobei das Signal verarbeitet wird (Verstärkung, Adaptation). Durch diese biochemischen Prozesse werden die Leitfähigkeiten der Zellmembran verändert, Ionen fließen über die Membran und ein elektrisches Signal entsteht. Damit ist das Signal in die Sprache des Nervensystems übersetzt und wird diesem somit zugänglich (Dahlem Konferenzen, Stieve, 1984).

Diese Transduktion und deren Kopplung an die Reizaufnahme durch Rhodopsin ist bei den Vertebraten gut untersucht. Das Transducermolekül, Transducin, gehört zu einer Familie von Guaninnucleotid-bindenden Proteinen (G-Proteine), die universell zwischen membranständigem Rezeptor und intrazellulären "Messenger-produzierenden Effektoren" vermitteln (Stryer et al., 1981 / Gilman, 1984). Diese Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β , γ). In der nicht aktivierten Form hat die $G\alpha$ -Untereinheit ein GDP gebunden. Die Bindung an lichtaktiviertes Rhodopsin (Metarhodopsin) führt zu einem Nucleotidaustausch von GDP gegen GTP. Das G-Protein löst sich vom Rhodopsin und dissoziiert in die α -GTP-Untereinheit und die β - γ -Untereinheit. In der GTP gebundenen Form ist die α -Untereinheit aktiv und interagiert mit dem Effektorenzym, einer cGMP-spezifischen

Phosphodiesterase. Dieses Enzym senkt die cGMP-Konzentration in der Zelle, die Ionenkanäle in der Membran werden geschlossen und die Leitfähigkeit für Kationen sinkt (Koch & Kaupp, 1985 / Kaupp, 1986). Diese G α -Untereinheit, die spezifisch für das individuelle G-Protein ist, bindet und hydrolysiert GTP und ist Substrat für die ADP-Ribosylierung mit den Bakterientoxinen Cholera und Pertussis Toxin (Ribeiro-Neto et al., 1985). Die Hydrolyse des gebundenen GTP durch die intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit ist ein Mechanismus zur Inaktivierung des G-Proteins.

Bei den mikrovillären Photorezeptoren der Evertebraten ist der erste Schritt bei der Lichtaktivierung sehr ähnlich (Stieve, 1984 / Stieve, 1977 / Stieve 1977a). Rhodopsin absorbiert Licht und durch Photoisomerisation des Chromophors entsteht das stabile Metarhodopsin (Hamdorf, 1973). Durch Interaktion mit diesem kurzzeitig aktiven Photoprodukt wird auch hier ein G-Protein (Blumenfeld et al., 1985 / Calhoon et al., 1980 / Vandenberg & Montal, 1984a / Paulsen & Bentrup, 1986), und durch dieses vermutlich eine Enzymkaskade aktiviert. Auf diese Weise wird wahrscheinlich ein intrazellulärer Transmitter freigesetzt, der die lichtsensitiven Kanäle in der Mikrovillismembran öffnet und so die physiologische Antwort der Zelle einleitet. Die Information gelangt also auch hier über einen membranständigen Rezeptor (Rhodopsin) in die Rezeptorzelle. Hier wird die Information verarbeitet, in elektrische Impulse übersetzt und dem Zentralnervensystem zugeleitet (Stieve, 1985).

Im Gegensatz zu dem beschriebenen Transduktionsmechanismus bei Vertebraten wird bei Evertebraten jedoch keine cGMP-spezifische Phosphodiesterase, sondern zumindest eine Polyphosphoinositoldiesterase, die Phospholipase C, aktiviert. Diese Phospholipase C katalysiert die Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat. Es ent-

stehen zwei intrazelluläre Messenger: das hydrophobe Diacylglycerol und das wasserlösliche Inositol 1,4,5-triphosphat (IP_3) (Brown & Rubin, 1986 / Fein et al., 1984 / Fein, 1986 / Payne, 1986). Das gebildete IP_3 erhöht in diesem System die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration (Brown & Rubin, 1984 / Payne et al., 1986 / Payne & Fain, 1987). Das freigesetzte Calcium stammt vermutlich aus dem Endoplasmatischen Reticulum (Levy & Fein, 1985 / Brown & Blinks, 1974).

Zwischen den rezeptiven Strukturen der Evertebraten und Vertebraten bestehen neben Analogien ebenfalls Unterschiede: Die Stäbchenaußensegmente der Vertebraten bestehen aus dichtgepackten Diskmembranstapeln, die von der Außenmembran umhüllt werden. Diese Diskmembranen enthalten das Rhodopsin.

Bei *Sepia* ist die Membran der Außensegmente sehr stark fingerförmig ausgestülpt. Diese Mikrovillimembranen tragen die Rhodopsinmoleküle und sind damit die rezeptive Struktur der Evertebraten.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Photorezeptorzellen der Retina von *Sepia officinalis* nach einem entsprechenden Vermittler zwischen Reizaufnahme durch Rhodopsin und den intrazellulär ablaufenden biochemischen Vorgängen gesucht. Die Verwandtschaft mit bekannten G-Proteinen von Vertebraten (Transducin, G_s , G_o und G_i) wurde untersucht. Mit polyklonalen Antikörpern gegen gereinigte Membranproteine aus der *Sepia* retina und Antikörpern gegen synthetische Peptide wurde versucht homologe Determinanten in den verschiedenen G-Proteinen zu finden. In ADP-Ribosylierungsexperimenten mit Cholera- und Pertussistoxin sollten vorhandene α -Untereinheiten von G-Proteinen auch bei *Sepia* markierbar sein.

Durch funktionelle Tests mit GTP und dem hydrolysenstabilen Analogon GTP- γ -S wurde versucht, ein nucleotidreguliertes Protein aus der Retinamembran zu identifizieren, dessen

Bindungsverhalten zu belichteten und unbelichteten Membranen in diesen Versuchen Aussagen über eine mögliche Funktion im Phototransduktionsprozess zulässt.

2. Material und Methoden

2.1 Präparation der Augen

Die Augen von *Sepia officinalis* stammen zur Hälfte von Tieren, die in unserem Labor aus Laich von Herrn Overath aufgezogen wurden. Die andere Hälfte stammt aus dem Laboratoire Arago in Banyuls sur Mer, wo die Sepien vor dem Töten 6 Stunden dunkeladaptiert wurden. Die Augen wurden bei schwachem Rotlicht von Herrn Prof. Boletzky präpariert und nach kurzem Schwenken in EGTA-haltigem Puffer (0,4 M Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM EGTA) sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt. Der Transport nach Aachen erfolgte auf Trockeneis und die Augen wurden bis zur weiteren Präparation bei -80°C in der Tiefkühltruhe gelagert.

2.2 Photorezeptorpräparation

Die Augen wurden für die weitere Aufarbeitung in eiskühlem Puffer (400 mM KCl, 25 mM MgCl, 50 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 50 mM Hepes, pH 7,5) aufgetaut. Nach Entfernen der Linse wurden die Augen umgestülpt. Die Außensegmente wurden durch vorsichtiges leichtes Schütteln der einzelnen Augen in diesem Puffer von der Retina entfernt. Diese Suspension wurde in 1,5 ml Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 3 min. zentrifugiert. Hierdurch wurden große Mengen des Schirmpigments entfernt. Die Pellets dieser Zentrifugation wurden im gleichen Puffer vorsichtig mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Etwa 0,5 ml dieser Suspension wurden

auf einen Zuckergradienten (kontinuierlich von $d = 1$ bis $d = 1,12$ g/ml) von 9 ml Volumen in obigem Puffer aufgetragen. Nach Zentrifugation der Gradienten (1,5 Stunden, $100.000 \times g$) wurde die rhodopsinhaltigen Membranen als Bande abgesaugt und in je 4 ml Puffer (s.o.) aufgenommen. Die Banden, die jeweils die Außensegmente eines Auges enthielten, wurden zweimal in 4 ml Puffer (s.o.) gewaschen (30 min., 21.000 rpm, Beckman JA 21). Die Zuckerrückstände aus dem Gradienten wurden so weitgehend entfernt. Das Pellet der zweiten Zentrifugation wurde bei -80°C eingefroren und diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Arbeiten. ("Membranen")

2.3 Lichtbedingungen

2.3.1 Präparation der Augen und der photosensorischen Membranen

Die Präparation der Augen und der photosensorischen Membranen erfolgte bei schwachem Rotlicht ($\geq 690 \text{ nm}$). Bei der Augenpräparation (s. 2.1) wurde nur mit einer Taschenlampe (3 mW Leistung) mit Kantenfilter RG 712 gearbeitet. Bei der Präparation der photosensorischen Membranen (s. 2.2) wurden zwei Tischlampen mit Rotlichtbirnen (Phillips Pf 712 E) verwandt.

2.3.2. Belichtung der photosensorischen Membranen

Für die Solubilisierungsversuche mit Guaninnucleotiden wurden die photosensorischen Membranen zur Helladaptation mit Weißlicht 3 min. bei 22°C belichtet ($1,5 - 1,7 \cdot 10^{17}$ Photonen / $\text{cm}^2 \cdot \text{s.}$) Auf diese Weise wurde ein 1:1 Gleichgewicht zwischen Rhodopsin und dem thermisch stabilen Photoprodukt Metarhodopsin eingestellt (Brown & Brown, 1958; Hamdorf et al., 1973). Für diese Belichtung der Mem-

bran wurde eine Schott Kaltlichtquelle mit Lichtleiter benutzt.

2.4 Solubilisierung der Membranproteine aus den Mikrovilli der Sepiaretina

2.4.1 Solubilisierung der Membranproteine mit organischen Lösungsmitteln

Zur gezielten Extraktion extrem hydrophober Membranproteine, den sog. Proteolipiden wurde die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ausprobiert. Die photosensorischen Membranen (5 mg) wurden gefriergetrocknet und in 7,5 ml Chloroform : Methanol, (2:1, V:V) aufgenommen und über Nacht bei 4°C extrahiert (Taylor, 1978a) Diese Suspension wurde zentrifugiert (8.000 x g, 30 min., 0 ° C), der Überstand dekantiert und die darin befindlichen Proteolipide mit vier Volumenteilen kaltem Diethylether gefällt (Boyan & Clement-Cormier, 1984). Nach 2 Stunden Inkubation bei -20°C wurde das Präzipitat abzentrifugiert (s. oben), das Pellet in Probenpuffer (s. 2.12) aufgenommen und SDS gelelektrophoretisch analysiert.

2.4.2 Solubilisierung der Membranproteine mit Detergentien

Für die säulenchromatographische Auftrennung der Membranproteine wurden diese in verschiedenen Detergentien gelöst. Hierzu wurde die Proteinsuspension verdünnt, um die Konzentration auf 100 µg Protein/ 1ml Pufferlösung (Puffer entsprechend der vorgesehenen Trennmethode) einzustellen. Diese Suspension wurde dann mit Detergenz aus einer 20 %-igen Stammlösung auf die gewünschte Detergenzkonzentration eingestellt. Die Ansätze wurden bei verschiedenen Temperaturen verschieden lange inkubiert (s. Tab.1). Die gekennzeichneten Ansätze wurden zusätzlich 1 Stunde geschüttelt.

Zur Unterstützung wurden die Ansätze beschallt. Die Beschallung wurde mit einem Beschallungsbad (Branson Sonic B 12, Output Controll Level 7) durchgeführt, wobei der gesamte Ansatz auf ca. 11 ° C gekühlt wurde.

Tab. 1: Bedingungen der Detergenzextraktionen

Detergentien	Extraktionstemperatur				Inkubationszeit			
	[°C]				[h]			
Triton X-100	4	-	21	-	0,5	1	3*	-
Triton X-114**	4	-	21	-	0,5	1	3*	-
Emulphogen	4	12	21	37	0,5	1	3*	5*
Octylglycosid	4	12	21	37	0,5	1	3*	-
Octyl./Emulph.	4	12	21	37	0,5	1	3*	-

* Ansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Vortex geschüttelt

** Methode siehe Clement Bordier (1980)

Bei den Solubilisierungsversuchen wurde das Detergenz im ausreichenden molaren Überschuß (Detergenz:Protein $\geq$ 20:1) zugegeben. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Ansätze abzentrifugiert (100.000 x g, 30 min.). Auf diese Weise wurden nicht detergenzlösliche Proteine pelletiert, und von den löslichen Proteinen getrennt. Überstände und Pellets wurden gelelektrophoretisch analysiert.

Liste der benutzten Detergentien:

- Triton X-100, Octylphenol - Polyethylenglykol, p.A., Serva
- Triton X-114, Octylphenol - Polyethylenglykoether, p.A. Serva

- c. Emulphogen, Polyoxyethylene-10-Tridecylether, Sigma
- d. Octylglycosid, Octyl β -D Glycopyranosid, reinst, Serva

2.5 Säulenchromatographische Auftrennung der Proteine

Für die Auftrennung der Membranproteine mit säulenchromatographischen Methoden wurden die Proteine mit Emulphogen extrahiert. Nach einstündiger Inkubation wurde die Suspension durch ein Membranfilter (N 11307, Porenweite 0,2 μ m, Sartorius) gepreßt, um vorhandene Aggregate zu entfernen.

2.5.1 Gelpermeationchromatographie mit einer Niederdruckanlage

Für die Gelpermeationschromatographie wurde eine Niederdruckanlage von der Firma LKB verwendet. Die Proben wurden mit einem Probengeber aufgetragen, so daß das System ständig geschlossen blieb. Die einzelnen Komponenten der Anlage wurden in folgender Reihenfolge geschaltet: Vorratsgefäß für Puffer - Säule - Pumpe - UV Monitor - Fraktionssammler. Der UV Monitor steuerte einen Schreiber an. Die Probe wurde unten aufgetragen und nach oben "gesaugt". Hierdurch wurden die Laufeigenschaften der Säule länger erhalten, da eine zu dichte Packung des Gelmaterials nicht entstehen konnte.

Das Gelbett der verwendeten Säule war 100 cm lang und 1 cm im Durchmesser. Das Probenvolumen betrug nicht mehr als 3 ml, d.h. die Proteinmenge betrug 300 μ g/ Lauf. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 10 ml - 15 ml / Stunde. Folgende Gelmaterialien wurden verwendet:

- a. Sephacryl S-300 Superfine, Pharmacia
- b. Sepharose CL 6B, Pharmacia

Die Proben wurden in "physiologischem" Puffer (s. 2.2) aufgetragen, der 3 %ig an Emulphogen war und mit dem gleichen Puffer eluiert. Dabei wurde die Emulphogenkonzentration auf 0,5 % reduziert.

Die Proteine in den Fraktionen wurden mit 6,6 %-iger Tri-chloressigsäure (TCA) gefällt und gelelektrophoretisch analysiert.

2.5.2 Ionenaustauscherchromatographie mit einem Hochdruck-System

Die Proben wurden in gleicher Weise vorbereitet, wie unter 2.5.1 beschrieben. Für diese Chromatographie wurde eine FPLC Anlage (Fast Protein Liquid Chromatography) der Firma Pharmacia benutzt. Diese Anlage bestand aus Probengeber, zwei Kolbenpumpen, Säule, UV Monitor und Fraktionssammler. Der Arbeitsplatz an dieser Anlage wurde freundlicherweise von Prof. Gersonde zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Auftrennung der Membranproteine wurde eine Anionenaustauschersäule verwandt (Mono Q FPLC - HR 5/5 Säule, Pharmacia), die fertig gepackt von der Firma geliefert werden. Das Säulenvolumen beträgt ca. 1 ml. Die Auftragung der Proteine erfolgte in einem stark hypotonen Puffer (0,005 Tris/HCl, pH 8 - pH 8,5), um eine optimale Bindung zu erreichen. Die Proteine wurden zuvor mit 3 % Emulphogen solubilisiert. Eluiert wurde mit einem kontinuierlich steigenden Salzgradienten in gleichen Puffer (NaCl, 0,00 - 0,5 M in 0,005 M Tris/HCl, pH 8 - 8,5). Die Qualität des benutzten destillierten Wassers kann die Ionenkonzentration im Auftrags- und Elutionspuffers beeinflussen, und damit die Bedingungen für den Lauf verändern. Daher wurde die Ionenkonzentration im Auftragspuffer stets über eine Leitfähigkeitsmessung ermittelt.

Alle verwendeten Puffer wurden vor der Benutzung sterilfiltriert (Filter mit 0,22 µm Porenweite), entgast (Saugflasche - Wasserstrahlpumpe) und die Temperatur auf Raumtemperatur eingestellt, da alle Läufe bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/ Stunde. Die Peakfraktionen wurden eingefroren und

später mit TCA gefällt und gelelektrophoretisch analysiert.

2.6 Lösen der Membranprotein-Zytoskelettprotein-Interaktion

2.6.1. Chaotrope Behandlung der Membranen

Die Membranen der *Sepia* retina wurden chaotrop behandelt, um mögliche Interaktionen der Membranproteine mit Zytoskelettproteinen zu stören und zu lösen. Hierzu wurde die Membran mit a. LIS, 3,5 Diiodosalicylat, Li-Salz, p.A. Serva

b. NH_4Cl , p.A., Merck
behandelt.

a. die Suspension wurde auf 100 mM LIS eingestellt und 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert und während dieser Zeit auf einem Vortex Schüttler geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde nach der Inkubation 30 min. zentrifugiert (100.000 x g, 2°C). Die Pellets und die Überstände dieser Zentrifugationen wurden gelelektrophoretisch analysiert.

b. Die Suspension wurde auf 500 mM NH_4Cl eingestellt, sonst wie oben.

2.6.2 Behandlung der Membranen mit basischem pH

Der pH-Wert der Membransuspension wurde mit NaOH auf pH 11 eingestellt. Die Proteinkonzentration wurden für diese Behandlung mit hypotonem Puffer (15 mM Tris/HCl, pH 7,5)) auf einen Wert von $\leq 50 \mu\text{g/ml}$ eingestellt. Während der 30 min. Inkubationszeit wurde der Ansatz auf einem Vortex Schüttler geschüttelt und danach zentrifugiert (30 min., 100.000 x g, 2°C). Die Pellets und Überstände dieser Zentrifugation wurden gelelektrophoretisch analysiert.

2.7 Behandlung der licht- und dunkeladaptierten Membranen mit Guaninnucleotid-haltigen Puffern

Die gewaschenen Membranen (2.2) wurden in physiologischem Puffer aufgenommen und mit ca. 20 "Hüben" mit einem Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert. Nachdem die Pellets ausreichend homogenisiert waren, wurde der Ansatz (6 mg Gesamtproteingehalt) in zwei Portionen geteilt: Eine Portion wurde im Dunkeln (s. 2.2) weiterverarbeitet - die andere Portion wurde 3 Minuten mit einer Kaltlichtquelle belichtet (s. 2.3.2). Durch diese Belichtung wurde ein 1:1 Gleichgewicht zwischen Rhodopsin und Metarhodopsin eingestellt (Brown & Brown, 1958). An aktives Metarhodopsin können G-Proteinmoleküle binden. Da der Puffer kein GTP enthielt, ist unter diesen physiologischen Bedingungen ein entstandener Komplex aus Metarhodopsin und G-Protein stabil. Die Temperatur der Proben betrug während dieser Zeit (4-5 min.) 22°C. Die gesamte nachfolgend beschriebene Weiterverarbeitung der Proben wurde im Dunkeln (2.2) auf Eis durchgeführt.

Die Hell- und Dunkelansätze wurden zentrifugiert (100.000 x g, 4°C, 30 min.), um die Membranen zu sedimentieren und so von löslichen Proteinen zu trennen. Die Pellets dieser Zentrifugationen wurden in einem hypotonem Puffer (15 mM Tris/HCL pH 7,4, 0.4 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF) mit einer Pasteurpipette vorsichtig resuspendiert und in gleicher Weise zentrifugiert. Diese Waschung wurde dreimal mit den hell- und dunkeladaptierten Membranen parallel durchgeführt, um sicherzustellen, daß alle löslichen Proteine entfernt sind.

Die Extraktion der licht-induziert an die Membran gebundenen Proteine wurde folgendermaßen durchgeführt: Die membranhaltigen Pellets der dritten Waschung wurden in einem GTP-(150 µM) oder GTP-γ-S-(75 µM) haltigen hypotonen Puffer resuspendiert. Für diese Extraktion wurde der gleiche Puffer benutzt, wie auch bei den vorhergegangenen Wa-

sungen (s. oben). Nach dem Homogenisieren wurden die Ansätze wie oben abzentrifugiert.

Alle Überstände der Zentrifugationen wurden, nachdem sie vorsichtig abgenommen waren, separat zentrifugiert (30 min. 100.000 x g), um alle darin befindlichen Partikel zu entfernen. Diese zentrifugierten Überstände wurden für die gelelektrophoretische Analyse vorbereitet.

Diese Methode entstand in enger Anlehnung an die von Kühn (1980) entwickelte Methode zur Reinigung von Transducin, wobei das Binden des Transducins an belichtete Membranen und das GTP induzierte Lösen von der Membran zur Aufreinigung und Characterisierung genutzt wurde.

Liste der benutzten Nucleotide:

1. GTP- γ -S, Guanosin-5'-O-Thiotriphosphat, Li-Salz, rein, Serva
2. GTP, Guanosin-5'-Triphosphat, Na-Salz, p.A., Serva
3. GDP, Guanosin 5'-Diphosphat, Na-Salz, reinst, Serva

2.8 Antikörperherstellung

2.8.1 Herstellung von polyklonalen Seren gegen Gesamtprotein

Drei Kaninchen (weibliche Kaninchen der Rasse "weiße Neuseeländer", 4 Monate alt, Dr. Ivanovas Versuchstierhaltung) wurden mit Membranproteinen der Sepiaretina und dem Lateralaugen von *Limulus* immunisiert:

- a. Membranproteine *Sepia* retina, nativ; K3
- b. Membranproteine *Sepia* retina, SDS denaturiert; K4
- c. Membranproteine der Lateralaugenretina *Limulus*, nativ; K5

Für die erste Injektion wurden jeweils 100 µg Proteinsuspension 1:2 mit Complete Freund's Adjuvant (Sigma) vermischt und im Beschallungsbad (Branson Sonifier) 10 Sekunden beschallt. Dadurch entstand eine stabile Emulsion. Zwei weiteren Immunisierungen erfolgten in gleicher Weise, jedoch wurde hier Incomplete Freund's Adjuvant (Sigma) benutzt. Die Injektion der Emulsion erfolgte unter die Nackenhaut.

Vor jeder Immunisierung wurde den Tieren 5 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Ab dem 10. Tage nach der dritten Immunisierung wurde den Kaninchen in Abständen je 5 ml Blut entnommen, bis der Titer wieder schlechter wurde.

Das Blut wurde nach dem Gerinnen abzentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Seren wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

2.8.2 Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen geleelektrophoretisch aufgereinigte Proteine

Nach einer Trennung der Membranproteine der *Sepia* retina mit SDS-PAGE mit 1,5mm dicken Gelen, wurden 6 Coomassie Blue gefärbte Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Mit einem Glas-Glas-Homogenisator wurde dieses Gelmaterial homogenisiert. Nachdem ein feines Homogenat entstanden war, wurde es für die Injektionen benutzt (Homogenat 1:2 mit PBS verdünnt). Bei jeder Injektion wurden ca. 10 µg Protein injiziert. Das Gelmaterial gibt darin befindliches Protein nur langsam ab, wie entsprechende Vorversuche gezeigt haben d.h. es ist ein ideales Adjuvant. Auf zusätzliches Adjuvant wurde daher verzichtet. Für diese Injektionen wurden 8 Kaninchen verwandt, wobei zwei vor der Entwicklung von Antiseren starben. Die Aufarbeitung des Blutes erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben.

2.8.3 Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen die mit pH 11 solubilisierten Proteine

Die mit dieser Behandlung (2.6.2) solubilisierten Proteine wurden mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, in PBS aufgenommen, mit Freund's Adjuvant versetzt und in drei weibliche bulb/C Mäuse injiziert. Den Mäusen wurde vor jeder Injektion und 10 Tage nach der 3. Immunisierung Blut aus der Augenvene entnommen. Die Aufarbeitung des Blutes erfolgte in gleicher Weise wie für Kaninchenblut beschrieben (2.8.1).

2.8.4 Herstellung eines polyklonalem Serums gegen GTP-extrahierte Proteine aus der *Sepia* retina

Mit den wie unter 2.7 beschriebenen extrahierten Proteinen wurde ein Kaninchen immunisiert. Die Probenvorbereitung erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben. Bei der Immunisierung wurde hier jedoch die Emulsion mit einer dünnen Kanüle an 15 verschiedene Stellen/ Immunisierung in (nicht unter) die Haut gespritzt. Dieses schlecht durchblutete Gewebe sorgt dafür, daß das Protein noch langsamer als bei der subcutanen Injektion an den Organismus abgegeben wird. Die Injektion wurde zweimal in dieser Weise durchgeführt. 10 Tage nach der dritten Injektion wurden dem Tier 25 ml aus der Ohrvene entnommen. Das Blut wurde in gleicher Weise wie unter 2.8.1 beschrieben aufgearbeitet.

2.9 Gewinnung von IgG-Antikörpern aus den Antiseren

Die elektrophysiologischen Injektionsversuche erforderten eine Aufarbeitung der Antiseren:

- a. alle Plasmaproteine mit Ausnahme der Antikörper können vielleicht stören, und mußten aus der Injektionslösung entfernt werden.
- b. Die Lösung mußte auf den für die Injektion erforderlichen Puffer umgepuffert werden.

Die Reinigung der Antiseren erfolgte über die Protein A-Säulenchromatographie. Bei den Läufen wurden nicht mehr als 10 ml Antiserum auf die Säule (Protein A-Sepharose CL-4B, Pharmacia, 5 ml Gelbettvolumen) aufgetragen. Nach der Auftragung wurde mit 5-fachem Volumen PBS gewaschen, um alle nicht gebundenen Serumanteile, die sich noch im Gelmaterial befanden, zu entfernen. Die Elution der spezifisch gebundenen IgG-Antikörper erfolgte mit 0,1 M Glycin/ HCl Puffer, pH 3. Bei diesem pH-Wert binden die Immunglobuline G nicht mehr an Protein A.

Zum Puffertausch wurde die Peakfraktion der Elution auf eine G-25 Sephadex Säule (Pharmacia) aufgetragen. Diese Säule wurde zuvor mit dem für die Injektion in den Ventralnervphotorezeptor von *Limulus* erforderlichen Puffer (0,5 M KCL, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) äquilibriert und die Immunglobuline in diesem Puffer eluiert.

2.10. Radioimmunoassay und ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Für den ELISA und Radioimmunoassay wurden Mikrotiterplatten aus PVC (Dynatec Denkendorf) verwendet. Proteine werden an die Oberfläche der Vertiefungen in diesen Platten gebunden. Die beiden Methoden unterscheiden sich nur in der Art der Detektion der gebundenen Antikörper und werden daher gemeinsam beschrieben. Im folgenden wird der Arbeitsablauf schematisch beschrieben:

- a. Beschichten mit Antigen, 50 μ l Proteinsuspension (ca. 5 μ g Protein in PBS, pH 8) werden in jede Vertiefung pipettiert. Inkubation ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur.
- b. Abwaschen von ungebundenen Anteilen mit PBS, 3 Mal 200 μ l PBS in jede Vertiefung, je 10 Minuten
- c. Absättigen der unspezifischen Bindungen mit BSA 1 %-ig (Bovine Serum Albumin, Serva) in PBS, Inkubation 2 Stunden bei Raumtemperatur
- d. Waschen wie b.
- e. Aufbinden der Antikörper, 50 μ l Antiserum wurden in jede Vertiefung pipettiert. Inkubation 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank. Zur Absättigung von serumabhängigen unspezifischen Bindungen des "Zweitantikörpers" wurde den Antiseren hitzeinaktiviertes Goat Normalserum zugegeben (Bio Yeda, Jerusalem)
- f. Waschung wie b.
- g. Die Detektion von gebundenen Antikörpern erfolgte mit 125 J markiertem Protein A, 125 J markierten Zweitantikörpern (ca. 50.000 cpm/Vertiefung) oder mit Peroxidase konjugierten Zweitantikörpern (Goat-Anti-Rabbit IgG oder Goat-Anti-Mouse-IgG, Serva). Inkubationszeit 4-6 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.
- h. Waschung wie b. (Die radioaktive Waschlösung wurde aufgefangen und entsorgt)

1. Radioimmunoassay: Die einzelnen Vertiefungen wurden ausgeschnitten und die gebundene Aktivität im γ -Zähler gezählt.

2. ELISA: In die Vertiefungen wurde 200 μ l Färbelösung (34 mg O-Phenyl-Diamin und 50 μ l Wasserstoffperoxid in 100 ml Citrat-Phosphat Puffer, 0,15 M, pH 5,0) pipettiert, und 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 μ l H₂SO₄ abgestoppt und der entstandene Farbkomplex im Photometer (ELISA Lesegerät, Dynatech) bei 492nm gemessen.

Citrat-Phosphat Puffer, pH 5,0, 0,15 M:

Citronensäure, 21,0 g/ l und $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 36,6 g/ l

Methode s. Hudson & Hay, 1980

2.11 Test der Antiseren mit der Immunoblot-Technik

(nach Towbin et al, 1979)

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Membranproteine der Retina von *Sepia*, wurden diese elektrophoretisch aus dem Gel auf Nitrocellulosefilter (Ba 85, 0,45µm Porenweite, Schleicher und Schüll) transferiert. Die Proteine werden von der Nitrocellulose fest gebunden, so daß nach dem Transfer auf dem Nitrocellulosefilter die gleiche Anordnung der Proteinbanden wie zuvor im Gel aufgetrennt vorlag.

Für den Transfer wurde die Nitrocellulose direkt auf das SDS-Gel gelegt, das zuvor im Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3) 20 min. äquilibriert wurde. Von beiden Seiten wurde dieses "Gel-Nitrocellulose-Sandwich" mit je zwei Lagen dickem angefeuchtetem Filterpapier (LKB) umgeben. Die gesamte Anordnung wurde zwischen zwei Kunststoffgitter gepackt und in die speziell dafür entwickelte Elektrophoreseapparatur (LKB, 2005 Transphor Electroblotting Unit) gestellt. Die Apparatur wurde mit Transferpuffer (s. oben) gefüllt. Das elektrische Feld war senkrecht zur Gel-Nitrocellulose - Ebene ausgerichtet, so daß die Proteine (negative Ladung bei pH 8,3) aus dem Gel in Richtung Nitrocellulose (Anodenseite) gezogen wurden. Der Proteintransfer war bei 200 mA nach 3 Stunden vollständig.

Nach dem Transfer wurde ein Kontrollstreifen von der Nitrocellulose für eine Färbung mit Amidoschwarz oder Auro Dye abgeschnitten. Das Gel wurde stets zur Kontrolle mit Coomassie Blue (Serva) gefärbt.

Zur Absättigung der nicht mit transferiertem Protein belegten Bindungsstellen, wurde die Nitrocellulose 1 - 2 Stunden mit 3% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Nitrocellulose 3 mal in PBS, 10 min. gewaschen.

Die so vorbehandelten Nitrocellulosefilter wurden mit Antiserum inkubiert. Die Antiseren wurden von 1:100 bis 1:10.000 in PBS, 0,1% BSA verdünnt. Die geeignete Verdünnung wurde jeweils für jedes Antiserum ausgetestet. Die Inkubation erfolgte alternativ 2-3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Nach der Antikörperinkubation erfolgte eine intensive Waschung der Nitrocellulose in großen Volumina PBS, 0,1 % BSA (dreimal in 100 - 300 ml), um alle nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte alternativ mit ^{125}J -markiertem Protein A, ^{125}J -markierten Ziege-Anti-Kaninchen-IgG Antikörpern oder mit Peroxidase gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen IgG Antikörpern. Die Nitrocellulose wurde mit einer dieser Lösungen (verdünnt in PBS, 0,1% BSA) 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dieser Inkubation erfolgte wiederum eine intensive Waschung der Nitrocellulosefilter wie oben beschrieben. Die in radioaktiv markierten Protein A oder Antikörper inkubierten Filter wurden auf Papierhandtüchern getrocknet und autoradiographiert (X-Ray Film, Kodak, 2-4 Tage, -80 °C, mit Verstärkerfolie)

Die mit Peroxidase konjugierten Zweitantikörper inkubierten Filter wurden nach dem Waschen mit der gleichen Färbelösung inkubiert, wie sie für den ELISA Test angegeben ist (2.10). Nachdem die Banden sichtbar wurden, wurden die Nitrocellulosestreifen auf Papierhandtüchern getrocknet.
Methode nach Johnstone & Thorpe (1982)

2.11.1 Färben der Proteine auf Nitrocellulosefiltern

Die abgeschnittenen Kontrollstreifen wurden 2-3 min. in Amidoschwarzlösung (0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Danach wurde mit 45 % Methanol, 10 % Essigsäure entfärbt. Die Proteinbanden wurden nach wenigen Minuten sichtbar.

Alternativ wurden diese Kontrollstreifen mit Auro-Dye angefärbt, wobei die Streifen ca. 10-20 min. in der Lösung (Auro-Dye, Protein Stain, B 6J-048/2, Jansen Belgien) inkubiert wurden. Kolloidales Gold lagert sich an Proteinkomplexe an, wodurch die Proteinbanden ohne Entfärben der Streifen sichtbar wurden, da es keine Hintergrundfärbung gibt. Danach wurden die Streifen auf Papierhandtüchern getrocknet.

2.12 Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony

Der Boden von Petrischalen wurde 5 mm dick mit Agar (2 % Agarose in Barbiturat-Puffer) beschichtet. Mit einem Stanzgerät wurden in diesen Agar 7 Löcher gestanzt. Um ein zentrales Loch waren 6 Löcher gleichmäßig auf einem Kreis angeordnet. In jedes Loch wurden 100- 200 µl Lösung pipettiert. Alternativ wurde in das zentrale Loch das Antiserum und die Antigensuspension in die anderen Löcher pipettiert, oder umgekehrt. Die Membranproteine wurden in 0,5 % Triton X-100 aufgenommen, der Agar enthielt 0,1 % Triton X-100. Die Antikörper-Antigenreaktion wurde nach 4-8 Tagen als weißlich trübe Präzipitationslinie sichtbar.

Barbituratpuffer:

a. 5`5 Diethylbarbitursäure, Na Salz, 12 g/ 800 ml H₂O

b. 5`5 Diethylbarbitursäure, 4,4 g/ 150 ml H₂O

a wurde vorgelegt und mit b pH 8,2 eingestellt. Nach Zugabe von 0,15 g Merthiolat wurde auf 1000 ml aufgefüllt.

Agar:

2 g Agarose (Bethesda Research Laboratories) wurden in 50 ml Barbituralpuffer aufgekocht und nachdem sich der Agar vollständig gelöst hatte, wurden weitere 50 ml dieses Puffers zugegeben. Der Agar wurde sofort in die Petrischalen gegossen. Im Kühlschrank konnten diese 2-3 Wochen aufbewahrt werden.

Methode nach Ouchterlony & Nilsson (1978)

2.13 Gelelektrophorese nach Laemmli

Für die Gelelektrophorese wurden 10 %-ige Polyacrylamidgele benutzt. Die Plattengele waren 7,5, 10 und 15 mm dick, 13 cm lang und 18 cm breit. Für die Probenauftragung wurden je nach der erforderlichen Auftragungsmenge unterschiedlich große "Taschen" (Slots) ins Sammelgel gegossen. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und ca. 10 min. bei Raumtemperatur denaturiert. Methode siehe Laemmli, 1970.

Trenngelpuffer:

0,75 M Tris/ HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer:

0,25 M Tris/ HCl pH 6,8

Acrylamid/Bis/SDS - Lösung:

30 % Acrylamid

0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

0,1 % SDS

gelöst in H₂O

Ammonium-dioxypersulfat-Lösung:

0,8 % (NH₄)₂S₂O₈ in H₂O

Trenngel:

20 ml Trenngelpuffer

13,4 ml Acrylamid/ Bis/ SDS-Lösung

2 ml (NH₄)₂S₂O₈-Lösung

auf 40 ml auffüllen

+ 10 µl TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)

Sammelgel:

5 ml Sammelgelpuffer

2 ml Acryl/ Bis/ SDS - Lösung

auf 20 ml mit H₂O auffüllen

+ 10 µl TEMED

Probenpuffer:

220 mM Tris/ HCl pH 6,8

2 % SDS

5 % β-Mercaptoethanol

15 % (V/V) Glycerin

Elektrodenpuffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3

Stromstärke:

bis maximal 45 mA/ Gel, ca. 300 V

2.13.1 Anfärben der Proteinbanden in SDS-Gelen

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit unterschiedlichen Methoden alternativ oder nacheinander angefärbt:

a. Coomassie Brilliant Blue

Die Gele wurden 2-3 Stunden in Färbelösung gelegt, und anschließend entfärbt, bis die Banden sichtbar wurden.

Färbelösung: 0,075 % Serva Blau R 250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure

Entfärbelösung: 10-20 % Methanol, 10 % Essigsäure

b. Silberfärbung:

Die Gele wurden 3 Stunden in 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure fixiert, anschließend dreimal in 10 % Ethanol (10 min.) und dreimal in H₂O inkubiert. Dann wurde das Gel 30 min. in 2,5 % Na₂CO₃, 0,02 % Formaldehyd (HCOH) - Lösung gelegt und

kurz unter fließendem Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 0,1 % Silbernitratlösung (AgNO_3 , Merck). Die Banden wurden nach 2-10 min. sichtbar. Die Reaktion wurde mit 2 %-iger Essigsäure abgestoppt.

2.14 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Proteinlösungen der löslichen Proteine, der Proteinsuspensionen der Membranproteine der Retina von *Sepia* und der Antiseren und gereinigten IgG-Lösungen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. BSA diente dabei als Standard.

In Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde zu den auf 500 μl aufgefüllten Proben 500 μl Bradfordlösung pipettiert, geschüttelt und die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Parallel wurde jeweils eine Eichkurve mit BSA von 2-50 μg Protein aufgenommen.

Bradfordlösung:

7 mg Serva - Blau G 250, 5 ml Ethanol, 10 ml 85 %-ige Phosphorsäure

2.15 Adenylatcyclase Assay

Die Adenylatcyclase Aktivität der Proben wurde nach der Methode von Jakobs und Schultz (1984) gemessen. Frisch präpariertes Homogenat aus Retinen der Photorezeptoren von *Sepia*, resuspendierte Pellets und Überstände der hypotonen Waschungen wurden 50-fach in Puffer (10 mM TAA, 1 mM EDTA, 0,2% BSA, 20 mM 2-Mercaptoethanol) verdünnt. Die Adenylatcyclase Aktivität wurde in 10 μl Aliquots dieser Verdünnungen in einem Assayvolumen von 50 μl gemessen. Die eingesetzten Konzentrationen der Komponenten betrugen: 50 mM Triethanolamin, 1 mM EDTA, 1 mM Isobuthylxanthin, 100 μM cyclisches AMP, 50 μM ATP (1-2 μCi [α - ^{32}P]ATP pro

Reaktionsansatz), 10 mM MgCl, 10 μ M GMP-P(NH)P, 400 μ g/ ml Kreatinkinase, 10 mM Kreatinphosphat, pH 7,5.

Jeder Ansatz enthielt 100 μ g Membranen von S49 cyc- Lymphoma Zellen, denen das G α -S für das hormonstimulierte Adenylatcyclase System fehlt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von α - 32 ATP gestartet und während der Reaktionszeit von 30 min. auf 37°C gehalten. Die einzelnen Ansätze wurden um 20 Sekunden zeitversetzt pipettiert, um für jede Probe die auf die Sekunde gleiche Reaktionszeit zu gewährleisten. Nach 30 min. wurde die Reaktion mit 400 μ l Zn-Acetat (125 mM) und 500 μ M Na₂CO₃ (120 mM) gestoppt und die Proteine gefällt. Die gefällten Proteine wurden pelletiert (10 min., 3000 x g). Von allen Ansätzen wurden 800 μ l auf je eine Aluminiumoxidsäule aufgetragen. Die Säulen wurden 2 mal mit 2 ml Tris/ HCl, 0,5 M, pH 7,4 nachgewaschen. Das gebildete [32 P] cAMP wird nicht an die Säule gebunden und die im Eluat enthaltene Radioaktivität wurde gezählt.

Als Standardwert wurde die Aktivität von 10 μ l eines ebenfalls 50-fach verdünnten Cholalextrakt von Rinderhirn genommen, der jeweils im gleichen Assay parallel ermittelt wurde. Als Blindwert wurde die Aktivität a, der cyc- Membranen ohne Probe und b, ohne Zusatz von Probe und cyc- Membranen vom Probenwert abgezogen.

2.16 [32 P]ADP - Ribosylierung

2.16.1 [32 P]ADP - Ribosylierung mit Cholera-Toxin

Das Toxin wurde vor der Benutzung in einer Vorinkubation aktiviert. Hierzu wurden 45 μ l Cholera-Toxin in 30 μ l Tris/ HCl (75 mM, pH 7,5) und 75 μ l DTT (50 mM) bei 37°C 30 min. inkubiert und mit 100 μ l Tris/ HCl (s.o.) und 125 μ l Tris/ HCl (pH 7,5, 0.075 % BSA) aufgefüllt.

Die Proben, Mikrovillimembranen der Retina von *Sepia* und GTP-Extrakte dieser Membranen waren in hypotonem Puffer (15 mM Tris/ HCl, pH 7,5) suspendiert.

Ansatz: 30 µl Reaktionsansatz (REA - Mix)
 20 µl Probe
 10 µl aktiviertes Cholera-Toxin

REA - Mix: 10 mM Thymidin, 1 mM ATP, 0,1 mM GTP, 1,5 mM DTT, 4 mM EDTA, 1 µM NAD, 300 mM KP_i Puffer, 10 mM $MgCl_2$ 25 mM Tris/ HCl. Die Lösung wurde mit H_2O auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, wobei mit zugesetztem [^{32}P]NAD abgestimmt werden mußte, da je nach Aktivität unterschiedliche Volumina erforderlich waren, um auf 1 Mill. cpm pro Ansatz zu kommen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Toxins gestartet. Alle Ansätze wurden 20 Sekunden zeitversetzt pipettiert. Die Inkubation dauerte 30 min. bei 30 ° C. Mit 1 ml kaltem Aceton wurde die Reaktion nach dem gleichen Pipettierschema abgestoppt. So war für alle Ansätze eine auf die Sekunde gleiche Inkubationszeit gewährleistet. Die gefällten Proteine wurden sedimentiert und nochmals mit a. 20 % TCA und b. Chloroform gefällt. Das Pellet der Chloroformfällung wurde in Laemmli Probenpuffer aufgenommen.

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine (2.12) wurden die Gele gefärbt (2.12.1) und getrocknet. Die getrockneten Gele wurden autoradiographiert. Die X-Ray Filme (Kodak) wurden je nach vorhandener Aktivität im Gel 2 - 6 Tage mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

2.16.2 [^{32}P]ADP - Ribosylierung mit Pertussis-Toxin

Pertussis-Toxin wurde folgendermaßen vorinkubiert und somit aktiviert:

5 µl Pertussis-Toxin
 5 µl ATP, 10 mM
 25 µl DTT, 20 mM
 15 µl H_2O

Die Inkubation dauerte 30 min. bei 37°C. Das Toxin wurde anschließend mit 450 ml Puffer (25 mM Tris/ HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 % BSA, 20 mM DTT) verdünnt.

Ansatz: 30 µl Reaktionsmix (REA - Mix)
 20 µl Probe
 10 µl aktiviertes Pertussis Toxin

REA - Mix: 25 mM Tris/ HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM Thymidin, 5 mM ATP, 1 mM GTP, 1 µM NAD, 0,3 % Lubrol. Die Lösung wurde mit H₂O auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, wobei mit zugesetztem [³²P]NAD abgestimmt werden mußte, da je nach Aktivität unterschiedliche Volumina erforderlich waren, um auf 1 Mill. cpm pro Ansatz zu kommen.

Inkubation, Abstoppen der Reaktion und die Dreifachfällung der Proteine sowie die Weiterverarbeitung bis zur Autoradiographie erfolgte wie unter 2.14.1 beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Test der Kreuzreaktivität von Limulus und Sepia:

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit immunologischen Methoden funktionelle Proteine des Phototransduktionsprozesses zu identifizieren. Für dieses Vorhaben mußte der methodische Ansatz (Druckinjektion von Antikörpern in den ventralen Photorezeptor von *Limulus*) durch entsprechende Versuche vorab abgesichert werden. Diese Absicherung erstreckt sich weiterhin auf die erforderliche Kreuzreaktion der zu untersuchenden Membranproteine von *Sepia* und *Limulus*.

In elektrophysiologischen Versuchen konnte die Reduktion der Lichtantwort (α -Antwort) durch Injektion von polyklonalen Antikörpern in den Ventralnerv - Photorezeptor von *Limulus* gezeigt werden (Baer, 1984 / Stieve, 1983). Dies zeigt, daß es möglich ist, funktionelle Proteine der Phototransduktion durch Störung der physiologischen Funktion mittels druckinjizierter polyklonaler Antikörper zu identifizieren.

Gegen die zu untersuchenden Proteine (Fig. 1) wurden polyklonale polyspezifische Seren hergestellt. Die Kreuzreaktion dieser Antiseren mit den Proteinen wurde in Bindungstests ermittelt. Gegen folgende Retina-Membranpräparationen wurden Antikörper hergestellt:

Tab.1 Antiseren für Kreuzreaktionstests

a: native photosensorische Membranproteine von *Sepia*,
Kaninchen 3, K3

- b: SDS denaturierte photosensorische Membranproteine von Sepia,
Kaninchen 4, K4
- c: native photosensorische Membranproteine von Limulus,
Kaninchen 5, K5

Die gewonnenen Seren wurde mit dem Radioimmunoassay (RIA) und dem Plattendiffusionstest nach Ouchterlony & Nilson (1978) charakterisiert. Alle drei Kaninchen zeigten 12 Tage nach der 3. Injektion die stärkste Immunantwort, so daß diese Blutungen miteinander verglichen wurden. Im folgenden sind die Ergebnisse der Bindungstests im RIA (2.10) aufgeführt. Alle Werte sind in Bezug auf die stärkste Immunantwort (hier 24.342 Counts / Well von 100.000 eingesetzten Counts des ^{125}I -Jod markiertem Zweitantikörper entsprechen 100%, K3 gegen Sepia Membran) angegeben:

Tab. 2: Kreuzreaktion der erhaltenen Antiseren im RIA

getestete Fraktionen /	getestete Antiseren		
	K3	K4	K5

<i>Sepia</i> Membran nativ	100	82	36,4
<i>Sepia</i> Membran SDS denat.	82	82	-
<i>Sepia</i> cytosolische Proteine	11,4	-	-
<i>Limulus</i> Membran	36,4	-	11,4
<i>Limulus</i> cytosolische Proteine	11,3	-	40

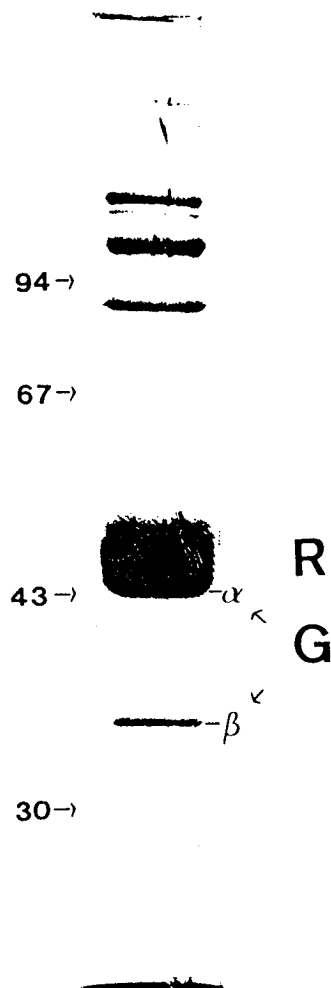


Fig. 1: Coomassie brilliant blue stained SDS PAGE (10%) of the the proteins of the photosensitive microvillar membranes of the retina from *Sepia off.* The arrows indicate the molecular weights.
 R: the major protein of this preparation Rhodopsin
 G: the 36 and 44 kDa subunits (α & β) of the G-protein of *Sepia* microvillar membranes (arrows).

Die Werte für die Normalseren liegen zwischen 1% und 3% der maximalen Bindung und dienten zur Korrektur der oben aufgeführten Werte. Diese Ergebnisse zeigen eine ausreichende Kreuzreaktivität der zu testenden Proteine: die löslichen und membrangebundenen Proteine der Retina von *Limulus* werden von Antikörpern, die gegen Retinaproteine von *Sepia* gebildet wurden, erkannt. Antiseren gegen *Limulus* Retinasuspension erkennen im umgekehrten Fall die Membranproteine aus der Retina von *Sepia* mit der gleichen Affinität. Die Test wurden zweimal durchgeführt, wobei die Antiseren gleiche Bindung an die getesteten Antigene zeigten.

Durch die teilweise reversible Denaturierung der Proteine mit SDS vor der Immunisierung wurde die Kreuzreaktion nicht beeinträchtigt: beide gebildeten Antiseren (K3 und K4) zeigten vergleichbare Bindung an native und denaturierte Proteinfractionen. Dieser Test zeigt, daß es möglich ist, die Antigene über SDS PAGE aufzureinigen. Bei dieser Methode werden die aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinbanden (elektroeluiert oder homogenisiertes Gel, 2.8.2) für die Injektion in das Kaninchen benutzt.

Zur weiteren Absicherung und Darstellung der erforderlichen Kreuzreaktivität wurden die gewonnenen Antiseren im Platten-immundiffusionstest nach Ouchterlony (1978) getestet (2.11). Mit diesem Test sollten Fehler, die durch selektives Binden der einzelnen Proteine des Antigengemisches an die Nitrocelluloseplatten im RIA entstehen können, aufgedeckt werden. Die Antigen - Antikörper Reaktion wird durch Immunpräzipitation entlang der Diffusionsfront deutlich sichtbar. Die Ergebnisse des RIA wurden mit diesem Test bestätigt, wobei eine vergleichbar exakte Quantifizierung der Immunpräzipitation nicht möglich ist (s. Tab 3).

Tab. 3: Kreuzreaktionen der Antiseren im
Plattendiffusionstest

	<i>Sepia</i>		<i>Limulus</i>	
	Antigen:	Membran Überstand	Membran Überstand	
Antiserum:K 3	xxx	xx	xx	-
K 4	xxx	xx	-*	-*
K 5	-	xx	x	xx

xxx - sehr starke Immunpräzipitation

xx - starke Immunpräzipitation

x - schwache Immunpräzipitation

- - keine Reaktion

-* - nicht getestet

Die durchgeführten Tests bestätigen die Ergebnisse des RIA, wobei die Limulus Membranproteine eine Konzentration von mindestens 0,1% Triton-X 100 im Medium benötigten. Diese Proteine können wahrscheinlich in wässrigen Milieu ohne Detergenz als Vermittler nicht ausreichend diffundieren, da bei den getesteten niedrigeren Detergenzkonzentrationen (0,005; 0,05) keine Immunpräzipitation zu sehen war. Die Ergebnisse der aufgeführten Tests zeigen die erforderliche Kreuzreaktion der Antiseren mit den Retinaproteinen der beiden Envertebraten Limulus und Sepia. Die zu untersuchenden Membranproteine sind mit immunologischen Methoden auch am System Ventralnerv Photorezeptor von Limulus nachweisbar (Antikörperinjektionen). Die Identifizierung von Membranproteinen, die eine Funktion im Phototransduktionsprozess haben, erscheint damit mit immunologischen und elektrophysiologischen Methoden möglich.

3.2 Antigenaufreinigung

3.2.1 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Für die selektive Extraktion sehr hydrophober Membranproteine, d.h. Proteine mit großem Anteil hydrophober Domänen, wurden Extraktionsmethoden für die Lipidextraktion angewendet. Kanalproteine und Rezeptorproteine haben als intrinsische Membranproteine solche Eigenschaften und kommen damit für die Proteolipidextraktion besonders in Frage (Boyan & Clement-Cormier, 1984). Nur ein kleiner Teil (2 %) der Membranproteine ist in der Regel durch organische Lösungsmittel wie Chloroform, Chloroform:Methanol oder Butanol lösbar (De Robertis, 1975; Altendorf et al., 1977). Durch die selektive Extraktion solcher Proteine aus der Membran kann man diese Proteine in einem Schritt stark anreichern, wobei der Reinheitsgrad für die Herstellung monospezifischer Antikörper ausreichen kann.

Die mehrfach durchgeführte Extraktion (3x) des gewaschenen und gefriergetrockneten Pellets der Präparation mit Chloroform : Methanol, 2:1 Volumenanteile löste kein Sepia - Membranprotein aus dem Pellet. Alle im Ausgangspellet vorhandenen Proteine befanden sich nach der Extraktion quantitativ im Pellet der Zentrifugation, mit der die in organischen Lösungsmitteln löslichen und nicht löslichen Proteine getrennt wurden. Die Überstände dieser Zentrifugation enthielten kein Protein.

3.2.2 Detergenzextraktion der Membranproteine

Die Auftrennung der Membranproteine von Sepia mit klassischen säulenchromatographischen Methoden erforderte einen Lösungsvermittler zwischen hydrophoben Membranproteinen und dem wässrigen Milieu. Mit ihrer amphiphilen Natur erfüllen Detergentien diesen Anspruch (Helenius & Simons, 1974/ Tan-

ford & Reynolds, 1976). Die nachfolgend beschriebene Trennung der Proteine sollte im zweiten Trennschritt über Ionenaustauscher Chromatographie erfolgen. Daher wurden für die Solubilisierung der Proteine nicht-ionische Detergentien gewählt. Die von E. Andre übernommene Solubilisierungsmethode in Triton X-100 erwies sich als unzureichend. Die Trennergebnisse waren nicht reproduzierbar. Daher wurden systematisch mehrere nicht-ionische Detergentien bei verschiedenen Inkubationsbedingungen getestet: siehe Tab. 1, (2.4.2 Seite 6)

Alle Ansätze wurden mit und ohne Beschallung von 10 Sekunden zu Anfang und Ende der Inkubation getestet. Bei den 3- und 5-stündigen Inkubationen wurde der Ansatz auf dem Vortex Schüttler eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Alle aufgeführten Detergentien wurden in den Konzentrationen 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % eingesetzt. Bei den Extraktionen wurden die Proteinkonzentrationen jeweils so gewählt, daß Detergenz im ausreichenden molaren Überschuß vorhanden war (Detergenz : Protein $\geq 20 : 1$). Bereits nach kurzer Zeit (20 - 30 Sekunden) wurden die zuvor trüben Membransuspensionen klar. Nach der Inkubation unter den aufgeführten Bedingungen wurden die Ansätze bei $100.000 \times g$, 90 min. (Temperatur wie bei Inkubation), abzentrifugiert. So wurden detergenzlösliche von detergenzunlöslichen Proteinen getrennt. Die gelelektrophoretische Analyse der Überstände und Pellets der Zentrifugation zeigte, daß kein Protein unter den getesteten Bedingungen detergenzlöslich ist. Alle Proteine sind quantitativ abzentrifugierbar: die Überstände enthielten kein Protein.

3.2.3 Proteintrennung mit Niederdruck-Säulenchromatographie

Der erste Trennschritt bei einer Proteintrennung ist häufig die Gelpermeationschromatographie für eine Fraktionierung des vorliegenden Gemisches nach Molekulargewicht. Da die detergent-"solubilisierten" Retinaproteine abzentrifugierbar waren, wurden die Proben nach einstündiger Inkubation mit Detergenz durch ein Membranfilter mit 0,22 µm Porenweite gepresst und dann auf die Säule aufgetragen. Es wurde nicht vorher abzentrifugiert. Da alle getesteten Detergentien in den beschriebenen Versuchen die gleichen Ergebnisse gezeigt hatten, wurde hier Emulphogen gewählt. Emulphogen absorbiert nicht in UV Bereich, und stört somit nicht die photometrische Proteinbestimmung.

Die Ergebnisse der Chromatographie zeigen erwartungsgemäß dieselbe schlechte Löslichkeit der Membranproteine: ungefähr 80 % der aufgetragenen Proteine aggregiert und permeiert nicht in das Säulenmaterial. Die restlichen Proteine permeieren die Säule, werden aber schlecht fraktioniert. Die geringe erreichbare Auflösung ist ein Indiz für die Interaktionen der Proteine zu Aggregaten, d.h. die Proteine sind nicht solubilisiert. Im Elutionsdiagramm erscheinen die permeierenden Proteine in einem Peak. Dieser Peak enthält alle Proteine der Membran der Sepiaretina. Zuweilen traten sehr kleine Nebenpeaks auf, die aber nicht reproduzierbar waren. Die gebildeten Aggregate liegen also im gleichen Molekulargewichtsbereich.

3.2.4 Proteintrennung mit Ionenaustauscherchromatographie mit einer FPLC Anlage

Da die Permeationschromatographie nicht den gewünschten Trennerfolg gebracht hat, versuchte ich spezifischer aufzu-

trennen. Hierzu bietet sich die Ionenaustauschchromatographie an. Aus Gründen der Material- und Zeitersparnis wurde das Trennverfahren mit einer FPLC- (Fast Liquid Protein Chromatography) Anlage gewählt. Diese bietet die Möglichkeit einer sehr schnellen repetitiven Trennung, wobei kleinste Proteilmengen (≤ 100 ug) für eine Trennung ausreichen. Die Probenvorbereitung entspricht der bei der Niederdrucksäulenchromatographie. Für die Trennungen wurden Membranproteine aus einer Präparation verwandt, wobei jeweils ein Teil unmittelbar vor der Trennung mit Detergenz solubilisiert wurde. Die auf dem Anionenaustauscher Mono Q (s. 2.5.2) bei pH 8, 0,005 M Tris/ HCl aufgetragenen Proteine wurden mit einem kontinuierlichen Salzgradienten (0-0.5M NaCl) eluiert. Es zeigten sich trotz stark veränderlicher Elutionsdiagramme im wesentlichen drei Peaks, die bei jedem Säulenlauf auftauchten:

Tab. 5: Eluierte Peaks bei der Ionenaustauscherchromatographie

1. Peak I:	0,15 M NaCl, 30 % des eluierten Protein
2. Peak II:	0,24% NaCl, 5-10 % des eluierten Protein
3. Peak III:	0,30% NaCl, 60-65 % des eluierten Protein

Bei jedem Chromatographielauf wurden 40 - 70 % des aufgetragenen Proteins spezifisch eluiert. Ein Teil fiel auf der Säule aus, ein anderer Teil band nicht an die Anionenaustauschermatrix. Durch Erhöhung des pH Wertes, die eine stärkere spezifische Bindung bewirken sollte, konnten die Verluste nicht vermindert werden.

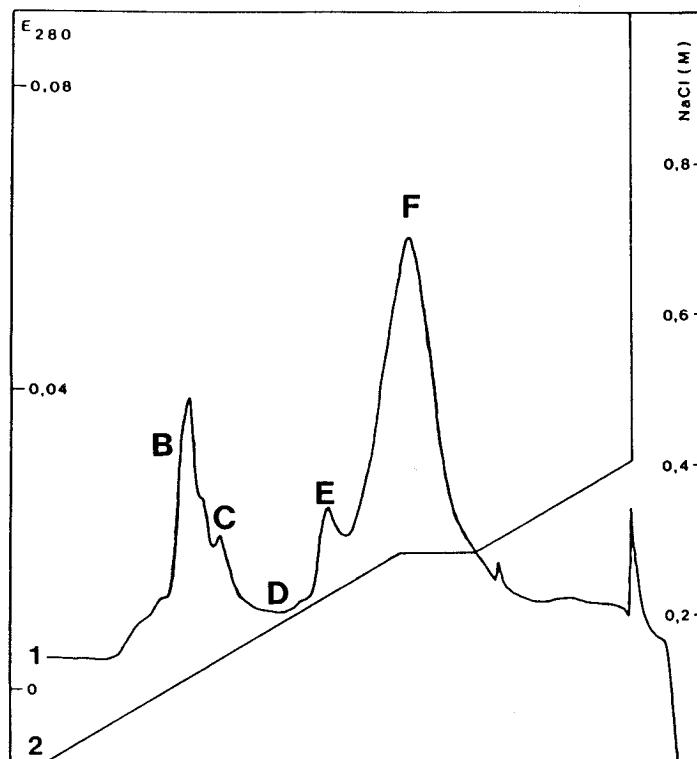


Fig. 2: Elution diagramm of ion exchange chromatographie of detergent solubilized Sepia membrane proteins. Line 1 represents the absorbtion at 280 nm of eluted proteins (E_{280}). 200 ug emulphogen treated proteins were applied to the anion exchange-columnn (Mono Q) in 0,005 M tris/HCl buffer, pH 8. Bound proteins were eluted with a continuos salt gradient NaCl, line 2 (NaCl concentration). For gelelektrophoretical analysis of the peaks B-F see Fig. 3.

Der Reinheitsgrad der Proteine in den Peaks, der mit dem ersten Lauf zu erreichen war, reichte für die Herstellung monospezifischer Antikörper nicht aus (s. Fig. 3, Seite 37) Fig. 3 zeigt eine Anreicherung eines 36 kDa Peptids in Peak III. Alle anderen Proteine sind jedoch in dieser Fraktion ebenfalls vorhanden, wenn auch in weit geringeren Mengen. Der

erste Trennschritt ergab eine ca. 20-fache Anreicherung des 36 kDa Peptids. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Fraktionen dieses Peaks aus 5 - 10 Läufen vereinigt und rechromatographiert. Dieser zweite Lauf (mehrfach durchgeführt) führte zum fast vollständigen Verlust dieses Proteins durch Präzipitation auf der Säule und fehlender Bindung an die Austauscherguppen. Diese Ergebnisse der repetitiven Läufe weisen auf Tubulin in der Präparation hin. Durch das Poolen des Peaks III aus mehreren Läufen war ein Wechsel warm-kalt-warm nicht zu vermeiden, da die Proben im Warmen sehr Protease anfällig sind. Durch diesen Temperaturwechsel wird vorhandenes Tubulin zur Aggregation mit anderen Proteinen angeregt. (Schliwa, 1986)

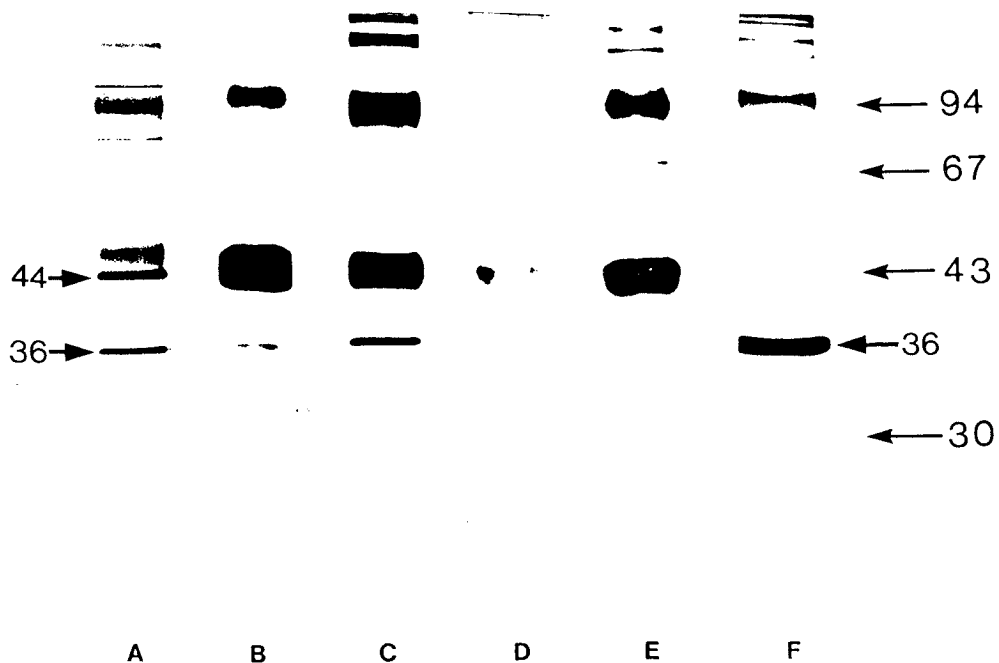


Fig 3: Silver stained SDS PAGE (10 %) of pooled fractions of the ion exchange chromatography. A shows *Sepia* membrane proteins, B to F shows the fractions as indicated in Fig. 2.

3.2.5 Chaotrope Behandlung der Membranen

Die schlechte Löslichkeit der Membranproteine mit Detergentien kann auf darauf zurückzuführen sein, daß Membranproteine mit Cytoskelettproteinen interagieren (Saibil, 1982). Durch diese Interaktionen können die Membranproteine von der Cytosolseite her stark quervernetzt werden. Eine Solubilisierung von in dieser Weise aggregierten Proteinen ist nicht vollständig und reproduzierbar. Daher behandelte ich die Membranen mit einem Chaotrop, das auch für die Solubilisierung membranassoziierter Proteine benutzt wird, da es die hydrophoben Wechselwirkungen abschwächt und so die Löslichkeit in wässrigem Milieu verbessert. Ein starkes Chaotrop wie Lis (s. 2.6.1) löst über die Störung der Wasserstruktur solche hydrophilen Wechselwirkungen (Hattefi & Hanstein, 1969). Durch Zentrifugation kann man die Cytoskelettproteine von den Membranproteinen trennen.

Die gelelektrophoretische Analyse der Überstände und Pellets dieser Zentrifugationen ergab folgendes Ergebnis: ein 36 kDa und ein 44 kDa Protein gingen durch die Behandlung quantitativ in den Überstand und ließen sich durch die Zentrifugation nicht sedimentieren (s. Fig. 4, A-B-C).

Die Inkubation der Membranen mit NH_4Cl zeigte keine Solubilisierung dieser Proteine. Die 36 und 44 kDa Proteine sind keine Cytoskelettproteine, da sie im Überstand bleiben. Sie scheinen membranassozierte Proteine zu sein, dessen Interaktion mit der Membran oder Membranproteinen durch das starke chaotrope Reagenz gestört wird.

3.2.6 Inkubation der Membran bei pH 11

Das Ziel der Behandlung der Membran mit diesen drastischen Inkubationsbedingungen ist, wie oben beschrieben (3.2.5), vorhandenes Cytoskelett von der Membran zu lösen. Die Membransuspension wurde auf den pH Wert 11 eingestellt (s. 2.6.2) und bei Raumtemperatur 30 Minuten geschüttelt. Die Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen der chaotropen Behandlung: ein 36 kDa und 44 kDa Protein gehen quantitativ in den Überstand. Da bei diesem pH Wert die Membranstruktur ebenfalls stark gestört ist, spricht auch dieses Ergebnis für membranassoziierte Proteine.



Fig. 4: Coomassie brilliant blue stained SDS PAGE (10%) of the pellets (Pe) and supernatants (Su) of the membrane treatments with the chaotrop and pH 11. A: 10 µg of proteins of microvillar membranes. B: pellet and C: TCA precipitated supernatant of the centrifugation of membranes treated with the chaotrop D: 10 µg of the microvillar membranes before treatment with pH 11 and E: pellet and F: supernatant separated by centrifugation after treatment with pH 11. In C and F the whole precipitated supernatants were applied to the gel.

3.3 Licht- und Nucleotidabhängiges Binden der 36/44 kDa Peptide

Bei Inkubation der Membranfraktion mit Puffern (Tris/ HCl, Hepes) hoher (1M NaCl) und niedriger Ionenstärke (0,005 M Tris/HCl oder Hepes) wurden kleine Mengen der Proteine mit

dem apparenten Molekulargewicht von 36 und des 44 kDa von der Membran gelöst (Fig. 5, A-a). Der größere Teil dieser Proteine sedimentierte jedoch mit den Membranen (Fig. 5, B-a).

Bei den in Fig. 4 dargestellten Experimenten wurden die photosensorischen Membranen (Fig. 5, B-a) vor der GTP- Γ -S Extraktion 3 mal mit hypotonen Puffer (0,005 M HEPES) gewaschen. Die erste dieser Waschungen setzte "größere" Mengen der 36 und 44 kDa Proteine frei. Dieser Betrag verminderte sich mit jedem folgendem Waschschrift. Durch Zusatz von GTP- Γ -S zum verwendeten hypotonem Waschpuffer, wurde der Betrag der freigesetzten Proteine bei belichteten Proben (lichtregulierte G- Proteine binden unter physiologischen Bedingungen an Metarhodopsin) bei ansonsten gleichen Bedingungen ca. 20-fach gesteigert (vergleiche hierzu in Fig. 5 A belichtet u. B nicht belichtet: b: 3. hypotone Waschung, c,d: 4. hypotone Waschung ohne und mit GTP- Γ -S). Bei nicht belichteten Membranen wird mit GTP- Γ -S nicht mehr Protein freigesetzt als ohne GTP- Γ -S, d.h. mit hypotonem Waschpuffer. Die Extraktion mit dem nicht hydrolysenstabilen GTP war erwartungsgemäß weniger effektiv.

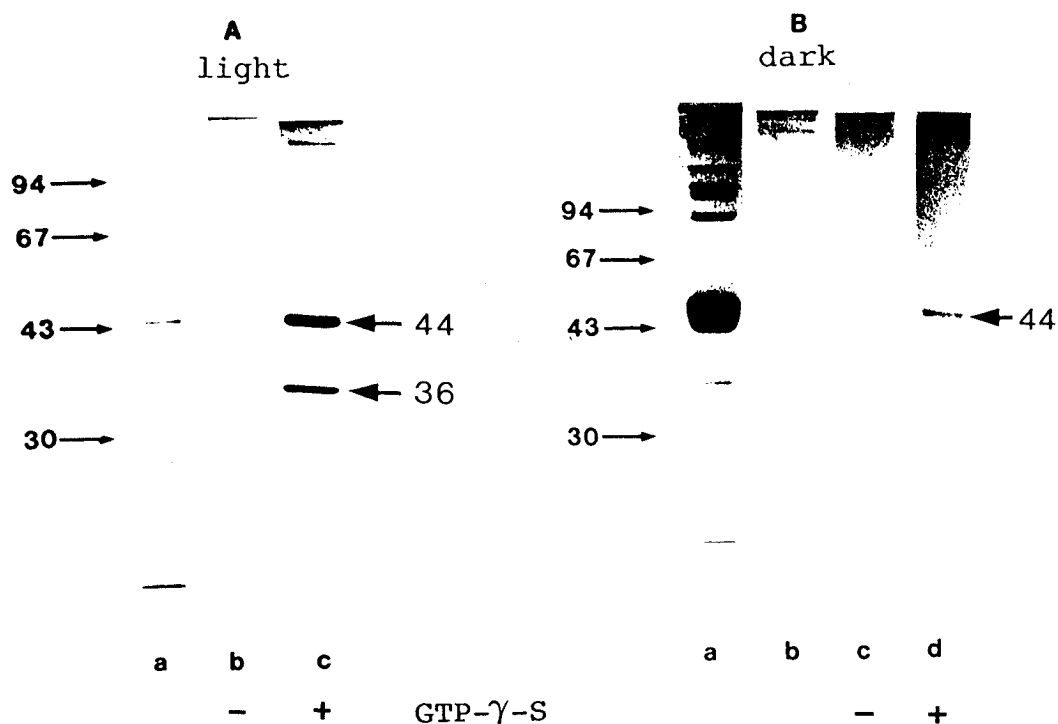


Fig. 5: Coomassie stained SDS PAGE of GTP- γ -S extracted proteins of A: light- and B: dark-adapted photoreceptor membranes from *Sepia*.

A-a: supernatant of the last hypotonic wash before extraction with GTP- γ -S. A lane b and c: hypotonic washing step, b: without GTP- γ -S, c: with 200 μ M GTP- γ -S. B-a: 10 μ g of microvillar membranes from *Sepia*. b: supernatant of the last hypotonic wash before extraction with GTP- γ -S. B, lane c and d: hypotonic washing step, c: without GTP- γ -S, d: with 200 μ M GTP- γ -S.

The protein content of the initial pellets for light and dark extraction was the same and from all supernatants the same part was TCA precipitated and applied to the gel.

Die Solubilisierung der beiden Proteine durch GTP- γ -S ist ein Indiz für eine Regulation der Bindung der Proteine an die Membran durch Guaninnucleotide und somit für Untereinheiten von G-Proteinen (Kühn, 1980).

Der Einfluß des Adaptationszustandes der Membranen auf die Extrahierbarkeit der beiden Proteine ist ein wichtiger Hinweis dafür, daß es sich um in den Phototransduktionsprozess involvierte Proteine handelt. Der große Unterschied in der Menge an freigesetztem 36 kDa und 44 kDa Protein in licht- und dunkelpräparierten Membranen kann durch licht-induziertes Binden der Peptide an entstandenes Metarhodopsin erklärt werden. Dies ist eine mögliche Erklärung, die durch die Übereinstimmung mit den Befunden bei Vertebraten wahrscheinlicher wird. Man kann diese Befunde daher als Hinweis werten, daß G-Proteine auch bei *Sepia* eine Funktion im Phototransduktionsprozess haben. Diese Interpretation wird unterstützt durch Antikörperbindungsstudien (s.3.3.4) und Toxin katalysierte Markierungsexperimente (s.3.4.2).

Bei der durchgeführten Belichtung mit intensivem Weißlicht (2.3) wird ein 1:1 Gleichgewicht zwischen Rhodopsin und Metarhodopsin eingestellt (Brown & Brown, 1958). Die Präparation erfolgt im unmittelbaren Anschluß an diese Belichtung. Die Bindung der G-Proteine an aktives Metarhodopsin ist unter den gewählten Bedingungen stabil, und nur durch Guaninnucleotide lösbar. Den Anteil an aktivem Metarhodopsin kann als hoch angesehen werden, da durch die Präparation die lösliche Metarhodopsinkinase entfernt wurde. In isolierten Membranen wird keine phosphorylierung von Metarhodopsin beobachtet (Bentrop & Paulsen)

Bei der Solubilisierung mit Guanin Nucleotiden wird auch bei hohen GTP- γ -S Konzentrationen und langen Inkubationszeiten nicht das gesamte Protein aus dem Membranverband gelöst. Dieser Befund deutet auf die Möglichkeit hin, daß die 44 kDa Bande im SDS PAGE unter Umständen zwei Proteine dieses Molekulargewichts repräsentiert.

3.4 Bindungsexperimente mit polyklonalen monospezifischen Antikörpern

3.3.1 Antikörperherstellung gegen elektrophoretisch aufgereinigte Proteine

Mit säulenchromatographischen Methoden konnte kein Membranprotein ausreichend angereichert werden (s.3.2.3). Daher wurde versucht, die Antigene mit einer präparativen Gelelektrophorese aufzureinigen. Hierzu wurden 1,5 mm dicke Gele benutzt, um ausreichend große Proteinmengen in den aufgetrennten Proteinbanden zu erhalten. Die ausgeschnittenen Proteinbanden wurden homogenisiert und für die Injektion in Kaninchen benutzt. Die Entwicklung der Antikörper in den Kaninchen wurde im ELISA verfolgt. Gegen folgende Banden wurden Antiseren hergestellt:

Tabelle 6: Antiseren gegen gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteinbanden

A: Membranproteine	LOW	36 kDa Peptid
	High Molekular I	95 kDa Peptid
	High Molekular II	90 kDa Peptid
B. Lösliche Proteine	Löslich Low	39 kDa Peptid
	Löslich Medium	66 kDa Peptid
	Löslich High	93 kDa Peptid

Tabelle 7 und 8 zeigen die Bindung der entwickelten Antiseren an die Membranfraktion (7) und an die lösliche Fraktion (8) der Retina von *Sepia* im ELISA. Hierbei wurde die Bindung des Zweitantikörpers (2.10) über die Peroxidase-katalysierte Farbreaktion ermittelt. Die Bildung des Farbkomplexes wurde photometrisch bei 490 nm verfolgt und quantifiziert. Die nachfolgenden Werte sind in Bezug auf die stärkste Immunantwort (2. Antiserum gegen HMII) angegeben, wobei die Extinktion 1,633 100% entspricht.

Tab. 7: Bindung der Antikörper an die Membranfraktion

	HMI	HMII	LOW	LÖS.High	LÖS. M	LÖS L
NS	1	30	20	16	73	11
1. AS	1	58	8	13	5	2
2. AS	28	100	65	60	93	20

Tab. 8: Bindung der Antikörper an die lösliche Fraktion

	HMI	HMII	LOW	LÖS.High	LÖS. M	LÖS L
NS	90	90	82	82	93	82
1. AS	90	100	87	87	82	82
2. AS	100	93	93	100	100	87

Das Normalserum wurde dem Kaninchen vor der ersten Immunisierung entnommen, das 1. Antiserum 12 Tage nach der ersten Immunisierung, das 2. 12 Tage nach der 2. Immunisierung.

Um die gefundenen Werte des ELISA Tests abzusichern, in dem die Mikrotiterplatten mit BSA abgesättigt werden, wurde getestet, wie stark die Antiseren an natives und SDS- denaturiertes BSA binden. Es zeigte sich keine Bindung der Antiseren an natives oder denaturiertes BSA (s. Tab. 9).

Weiterhin wurden folgende Blockmethoden für das Abblocken von unspezifischen Bindungen getestet: Die Mikrotiterplatten wurden vor der Inkubation mit dem konjugierten Antikörper alternativ mit inaktiviertem Ziegen Normalserum (Arbeitsprotokoll der Firma Bio Yeda), Gelantine, Ovalbumin und Tween inkubiert. Durch diese Behandlung der Mikrotiterplatten wurden die Ergebnisse der ELISA Tests nicht beeinflusst.

Tab. 9 Test von Blockmethoden für unspezifische Bindung im ELISA

getestet mit dem 2. Antiserum HMII, s. Tab 6/7

Behandlung Mikrotiterplatte	Extinktion
nach Protokoll 2.10, Sepia Membran	1,623
nur Beschichtung mit nativem BSA	0,052
nur Beschichtung mit SDS denaturiertem BSA	0,048
nach Protokoll 2.10, Sepia Membran	1,623
zusätzliche Absättigung mit Ziege NS	1,587
zusätzliche Absättigung mit Gelantine	1,553
zusätzliche Absättigung mit Ovalbumin	1,632
zusätzliche Absättigung mit Tween	1,658

Die Ergebnisse der ELISA Tests zeigten eine Entwicklung der Immunantwort ab dem 2. Antiserum, wobei die Spezifität der

Seren nicht sehr stark war. Alle Antiseren binden sehr stark an die löslichen Proteine von der *Sepia* Retina. Ebenfalls erkennen die Antiseren, die gegen lösliche Proteine hergestellt wurden, in diesem Test die Membranproteine sehr gut. Diese starke unspezifische Bindung im Test ist nicht auf Bindung an BSA (s.o.) zurückzuführen.

Die Antiseren gegen Membranproteine wurden für die weitere Charakterisierung im Western Blot getestet. Hier zeigte sich ebenfalls eine starke unspezifische Bindung aller Antiseren an alle Proteinbanden aus den löslichen Überständen und der Membranfraktion von der Retina von *Sepia*. Hier wurden ebenfalls die oben aufgeführten Abblockmethoden für unspezifische Bindung angewandt. Diese Ergebnisse zeigen, daß über diese Methode aufgearbeitetes Protein nicht dem für Antikörperherstellung erforderlichen Reinheitsgrad entspricht. Die vermutlich noch vorhandenen Verunreinigungen werden vom Immunsystem des Organismus "gesehen", das heißt induzieren eine Antikörperbildung.

Weiterhin fällt die hohe Affinität der Normalseren insbesondere zu den löslichen *Sepia* Proteinen auf. Diese kann man darauf zurückzuführen, daß im Organismus vorhandenen Antikörper unspezifisch an Sepiaproteine binden. Aber auch ein Detektionsfehler, der durch den Peroxidase gekoppelten Ziege -Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper entsteht, kann für diesen Befund verantwortlich sein: Dieser gekoppelte Zweitantikörper zeigte in der Routinearbeit keine konstanten Ergebnisse. In aufeinanderfolgenden Tests zeigte die Peroxidase bei gleichbleibenden Bedingungen beim gleichen Antiserum Markierung unterschiedlicher Banden. Wir vermuten, daß die starke unspezifische Bindung durch den Ziegen Antikörper entsteht. Dadurch wurden die ELISA Tests und die Western Blots nicht interpretierbar.

3.4.2 Antiseren gegen die löslichen Proteine des pH 11 Extrakts

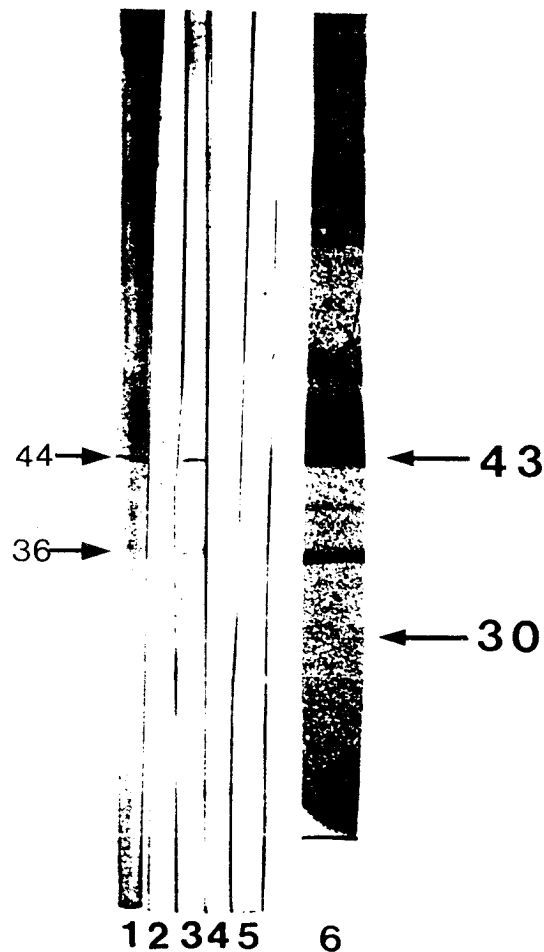


Fig. 6: Immunoblot of antisera raised against pH 11 solubilised 36/44 kDa proteins from microvillar membranes from *Sepia*. 6: Coomassie brilliant blue stained SDS-Gel from microvillar membranes, 1-5: Immunoblots made of an identical SDS Gel as shown in 6. 1,3,5: three antisera against the 36 kDa and a 44 kDa protein, 2,4: two corresponding preimmunesera. The arrows indicate the molecular weights. Bound antibodies were detected with peroxidase konjugated anti IgG antibodies.

Mit den in Fig. 4-F gezeigten Proteinen, die durch die Behandlung der Membransuspension mit pH 11 solubilisiert wur-

den, wurden drei bulb/ C Mäuse immunisiert. Die entwickelten Antiseren wurden im Immunoblot gegen *Sepia* Membranfraktion getestet. (Fig. 6) Alle drei Antiseren erkennen hochspezifisch "ihr" Antigen in der Membranfraktion. Die Normalseren der getesteten Mäuse zeigen keinerlei unspezifische Bindung. Die Effizienz der entwickelten Präparationsmethode für diese Proteine ist überzeugend: obwohl nur geringe Mengen (15 µg/ Injektion/ Maus) für die Immunisierung zur Verfügung standen, entwickelten sich spezifische Antiseren.

Mit den in Fig. 5 gezeigten Überständen aus der GTP- γ -S Extraktion wurde ein Kaninchen immunisiert. Das entwickelte Antiserum wurde mit der Immunoblot Technik getestet und zeigte bei Verwendung von 125 Jod markiertem Zweitantikörper sehr starke unspezifische Bindung, d.h. unspezifisch an Nitrocellulose (sowohl an mit BSA als auch an mit Tween abgesättigte Nitrocellulose) und an alle Proteinbanden. Der Antikörper ist für weitere Untersuchungen nicht brauchbar.

3.4.3 Kreuzreaktivität der 36/44 kDa Proteine mit Anti-G - Protein Antiseren

Die Ergebnisse der GTP- γ -S Extraktion, das pH abhängige Lösen und die lichtabhängige Extrahierbarkeit der 36 kDa und 44 kDa Proteine aus der Membran bei licht- oder dunkelpräpariertem Material weisen auf Licht- und Guaninnucleotid regulierte Proteine hin. Die Kreuzreaktion von Anti-Transducin Antikörpern mit einem 36 kDa Peptid konnte im Immunoblot gezeigt werden (Gierschik et al., 1984; Tsuda et al., 1986). Daher testete ich die Kreuzreaktivität der identifizierten Banden mit Antiseren, die gegen gereinigte G-Proteine aus Vertebraten gerichtet sind.

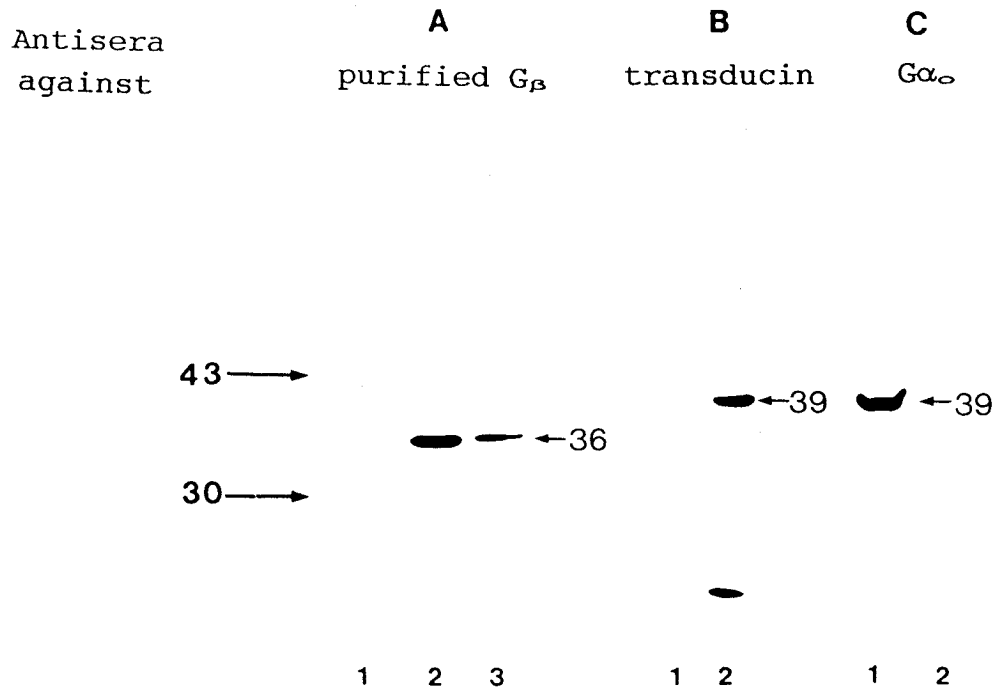


Fig. 7: Crossreactivity of *Sepia* proteins with anti G antibodies. Antisera were raised against purified G-protein-subunits from vertebrate sources and against transducin (all subunits). **A**: antiserum against G_{β} tested with *Sepia* photoreceptor membranes (1), transducin (2) and cholate extract of porcine brain (3). **B**: antiserum against transducin tested with *Sepia* photoreceptor membranes (1) and purified transducin (2). **C**: antiserum against $G\alpha_o$ tested with cholate extract of porcine brain (1) and *Sepia* photoreceptor membranes (2). All tested antibodies do not recognize the proteins of the photoreceptor membranes from *Sepia* (A1, B1, C2), but bind to on the G protein subunits of vertebrates (A2-3, B2, C1).

Die in Fig 7. getesteten Antiseren wurden von Prof. Dr. Schultz zur Verfügung gestellt (Codina, 1985, Rosenthal, 1986). Mit jedem Antigen (gereinigtes $G\alpha$, $G\beta$ und Transducin) wurden drei Kaninchen immunisiert, von jedem Kaninchen wurden zwei oder drei verschiedene Blutungen getestet. Alle diese Tests zeigten das gleiche Ergebnis:

Die Antiseren gegen Transducin der Rinderretina (drei Untereinheiten), gereinigtes $G\alpha$ und gereinigtes G_{β} aus Schweinegehirn erkennen ihre Antigene im Cholatextrakt aus

Schweinegehirn und die Untereinheiten des Transducin sehr gut. Keines der getesteten Antiseren erkannte jedoch die G-Protein Untereinheiten der *Sepia* retina. Obwohl der Titer der getesteten Antiseren sehr hoch war, konnte keine Kreuzreaktivität mit den *Sepia* Präparationen gezeigt werden.

Im folgenden wurden Antiseren getestet, die gegen ein kurzes synthetisches Peptid gerichtet sind. Analysen der vorliegenden Aminosäure-Sequenzen von verschiedenen G-Proteinen (Hurley, 1984 / Harris et al., 1985) ergaben 16 bzw. 17 Aminosäure lange, allen G-Proteinen homologe Abschnitte. Eine dieser homologen Sequenzen aus der $G\alpha$ -Untereinheit wurde künstlich synthetisiert. Sie ist 16 Aminosäuren lang und ist sequenzgleich mit der GTP-Bindungsstelle der $G\alpha$ -Untereinheiten. Für die $G\beta$ -Untereinheit ergab sich ein homologer 17 Aminosäuren langer Abschnitt, der synthetisiert und zur Immunisierung verwandt wurde.

Diese synthetischen Peptide wurden für die Herstellung polyklonaler Antiseren verwandt (Mumby, et al., 1985). Auf diese Weise sind spezifische Antiseren gegen eine definierte und bekannte, allen G Proteinen gemeinsame Determinanten entstanden ($G\alpha_{common}$ und $G\beta_{peptid}$). Diese polyklonalen Antiseren binden stärker als monoklonale Antikörper, die gegen die gleichen G-Protein-Untereinheiten gerichtet sind. Durch diese Eigenschaften sind sie ein idealer Sensor für die Suche nach G-Protein Untereinheiten in verschiedenen Geweben.

Zur Charakterisierung der Antiseren und zum Vergleich der Bindung an *Sepia* Membranproteine und an Vertebraten Membranproteine wurde die Bindung des Anti- $G\alpha_{common}$ Antikörper an verschiedenen gereinigte $G\alpha$ -Untereinheiten getestet (s. Fig.8): $G\alpha_o$ und $G\alpha_T$ aus Schweinehirn, $G\alpha_s$ aus menschlichen Erythrozyten, (Codina et al., 1985) und Transducin aus der Rinderretina (Kühn, 1980). Im gleichen Immunoblot wurde die Kreuzreaktion des Antikörpers mit der Membranfraktion der *Sepia* retina und mit dem GTP- γ -S Extrakt

getestet. Beim Auftragen der Proben auf die Gele wurden gleiche Proteinmengen (ca. 0,5 µg) der zu testenden Banden angestrebt.

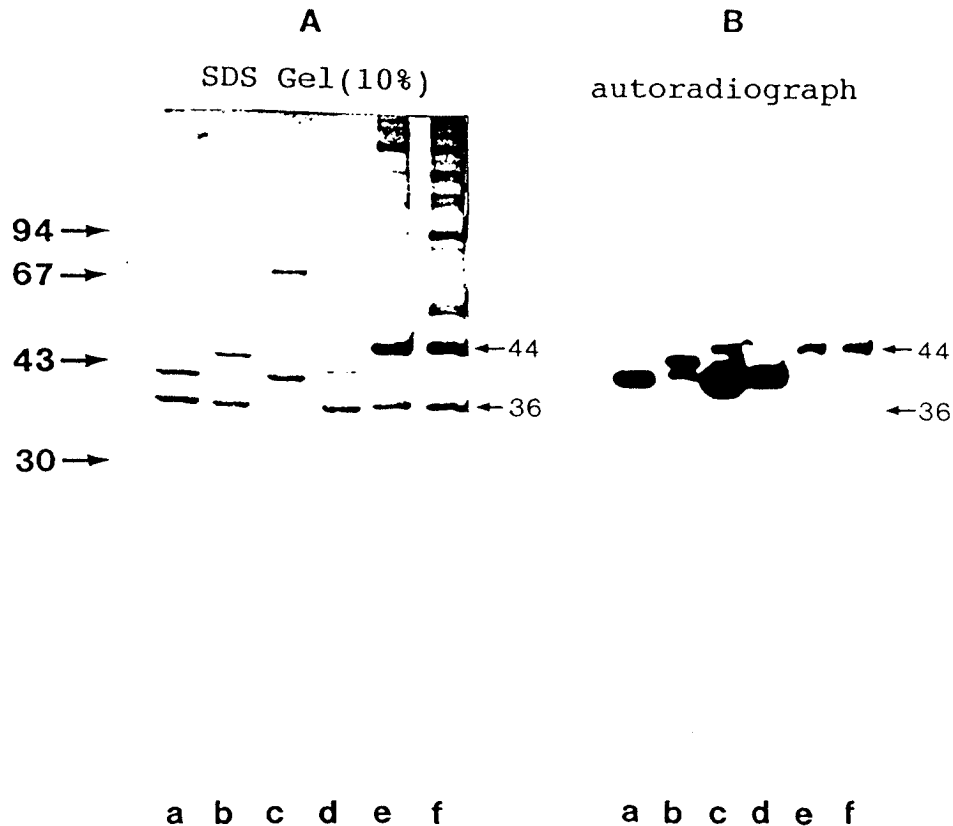


Fig 8: **A:** Coomassie blue stained SDS Gel (10%) of purified G-proteins from vertebrates (bovine, human, porcine) and *Sepia*: transducin (a), $G\alpha_s$ (b), $G\alpha_o$ (c), $G\alpha_i$ (d) and GTP- γ -S extracted 36/44 kDa proteins (e) and the photoreceptor membranes from *Sepia*. The amount of total protein loaded per lane was chosen to yield comparable amounts of the respective $G\alpha$ subunit. **B:** autoradiograph of an immunoblot made from identical SDS gel as shown in **A**. The antiserum anti- $G\alpha$ peptid was used in a serum dilution of 1:200, bound antibodies were detected with radiolabeled protein-A X-ray films were exposed for 48 hours. The anti $G\alpha$ antiserum binds to all tested α -subunits of vertebrates, but also to the 44 kDa protein of *Sepia* photoreceptor membranes.

Der Antikörper erkennt in der angewandten Serumverdünnung 1:200 die $G\alpha$ -Untereinheiten der Vertebraten sehr gut. An die Untereinheiten $G\alpha_o$ und $G\alpha_t$ (Codina et al., 1985) bindet der Antikörper sehr stark, die $G\alpha$ -Untereinheit vom Transducin wird ebenfalls gut erkannt; die Bindung an $G\alpha_s$ ist etwas geringer als an die anderen $G\alpha$ -Untereinheiten. Die 44 kDa Bande aus der *Sepia* Membran wird sowohl in der gesamten Membranfraktion, als auch im GTP- γ -S Extrakt erkannt, wobei die Bindung des Antikörpers an die Evertrebraten Proteine deutlich schwächer ist als an die $G\alpha$ - Untereinheiten von Vertebraten. Diese Bindung ist jedoch deutlich und spezifisch: In der gesamten Membranfraktion wird nur an das 44kDa Protein gebunden. Die Bindung und die hohe Spezifität deuten auf Homologien zwischen den markierten Proteinen hin. Da das Antigen für diesen Antikörper die GTP- Bindungsstelle repräsentierende Aminosäuresequenz ist, ist diese immunologische Kreuzreaktion mit dem 44 kDa Protein der Sepiaretina ein starker Hinweis auf ein G Protein.

Zur Charakterisierung des $G\beta$ *peptid* Antikörpers (s.o.) und zur Ermittlung der Kreuzreaktion mit *Sepia* Membranproteinen wurde die Bindung an folgende gereinigte $G\beta$ -Untereinheiten von Vertebraten getestet: Transducin aus Rinderretina und $G\beta$ aus Schweinegehirn. Im gleichen Immunoblot wurde die Bindung des Antikörpers an die Membranfraktion der *Sepia* retina und dem GTP- γ -S Extrakt getestet. Fig. 9 zeigt ein Coomassie Brillant Blau gefärbtes SDS Gel der aufgeführten $G\beta$ -Peptide. Bei der Auftragung wurden gleiche Proteinnengen für die $G\beta$ -Banden angestrebt. B zeigt einen Immunoblot, der aus einem identischen SDS Gel angefertigt wurde. Das $G\beta$ -Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:600 angewandt, die gebundenen Antikörper wurden mit ^{125}J markiertem Protein A nachgewiesen. Die Röntgenfilme wurden 48 Stunden exponiert.

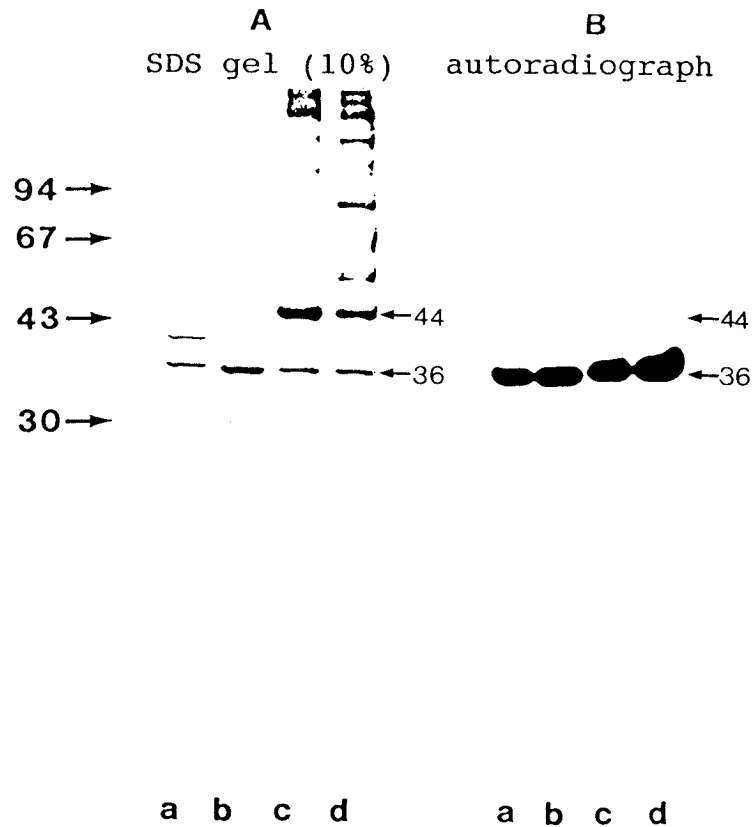


Fig. 9: A: Coomassie blue stained SDS gel (10%) of proteins from vertebrates (bovine and porcine) and *Sepia*: transducin (a), purified G β from porcine brain, GTP- Γ -S extracted (c) and the photoreceptor membranes from *Sepia*. The amount of total protein loaded per lane was chosen to yield comparable amounts of the respective G β subunit. B: autoradiograph of an immunoblot, made from an identical SDS gel, using the anti G β peptide antiserum in a serum-dilution of 1:600, bound antibodies were detected with radiolabeled protein-A. X-ray films were exposed for 48 hours. The autoradiograph (B) shows binding of the antiserum to transducin and G β from vertebrates but also to the 36 kDa protein as well in the GTP- Γ -S extract as in the membrane fraction of the retina from *Sepia* (c,d).

Der Anti G β _{peptid} Antikörper erkennt die G β -Untereinheiten des Transducins und die gereinigte G β -Untereinheit aus Schweinegehirn sehr gut. Mit der gleichen Affinität wird sowohl in der Membranfraktion von *Sepia*, als auch im GTP- γ -S Extrakt die 36 kDa Bande erkannt. Die Bindung an die *Sepia*proteine ist vergleichbar stark der Bindung an die Vertebraten Proteine.

3.5 Identifizierung des Guanin-Nucleotid-abhängigen 44 kDa Peptids in der Membranfraktion von Sepia mit pharmakologischen Methoden

3.5.1 Aktivierung der Adenylatcyclase mit dem 44 kDa Protein im Adenylatcyclase Assay

Die fehlende Kreuzreaktion des anti Transducin Antikörpers mit der 44 kDa Bande (3.3.4) kann ein Hinweis auf die unterschiedliche Funktion dieser Proteine sein. Im Homogenat aus Ventralnerv Photorezeptoren von *Limulus* wurde bereits ein Protein mit Adenylatcyclase aktivierender Eigenschaft nachgewiesen (Malbon et al., 1984 / Brown et al., 1983). Das Molekulargewicht der 44 kDa Bande liegt zudem im Bereich der Adenylatcyclase stimulierenden G α S-Untereinheiten. Die berichteten Molekulargewichte für die leichten und schweren Formen liegen bei 42 bis 45 und 45 bis 52 kDa (Sternweis, et al., 1981). In Analogie zum Hormon- stimulierten System wäre auch für die *Sepia* Retina eine Transduktion über eine Adenylatcyclase denkbar.

Aus diesen Gründen erschien es sinnvoll, die Adenylatcyclase stimulierende Aktivität der 44 kDa Bande in verschiedenen Präparationen zu testen: frisch präparierte Membranen von Photorezeptoren, die entsprechenden Überstände und die GTP- γ -S Extrakte. Als Kontrolle wurde Cholatextrakt aus

Erythrozyten eingesetzt. Der Test wurde drei mal durchgeführt (jeweils Dreifachbestimmungen).

Im Assay wurde das hormonstimulierte Adenylatcyclase-System der Lymphoma Zelllinie S 49 cyc- benutzt. Dieser Zelllinie fehlt durch Mutation die $G\alpha_s$ -Untereinheit des G-Proteins. Deswegen wird die Cyclase nicht durch Hormon aktiviert. Setzt man $G\alpha_s$ zu, so wird die Cyclase wieder stimulierbar. Die Cyclase Aktivität wird anhand des gebildeten [^{32}P] cyclischem AMP aus [α ^{32}P] ATP gemessen. (Salomon, 1979 / Schultz & Jakobs, 1984) Die $G\alpha$ -Untereinheiten von Invertebraten sind in diesem System rekonstituierbar, Malbon. et al. (1984) wiesen auf diese Weise eine $G\alpha_s$ -Untereinheit im Homogenat der Ventralaugen von *Limulus* nach.

Tab. 10 Adenylatcyclase Assay (2.15)

Ansatz	ausgezählte Radioaktivität
Blanc: Reaktionsansatz ohne cyc- Membranen und ohne Probe	123
Basal: Reaktionsansatz mit cyc- Membranen und ohne Probe	187
Standard: Reaktionsansatz mit cyc- Membranen und $G\alpha_s$ (Cholatextrakt aus Erythrozyten)	9344
Probe 1: Reaktionsansatz mit cyc- Membranen und Sepia photosensorische Membranen	322
Probe 2: Reaktionsansatz mit cyc- Membranen und Sepia lösliche Proteine	268
Probe 3: Reaktionsansatz mit cyc- Membranen und Sepia GTP- Γ -S Extrakte	298

Im Gegensatz zum Cholatextrakt aus Rinderhirn, stimulierte

keine der getesteten *Sepia* Präparationen die Adenylatcyclase der Lymphoma Zelllinie. Das 44 kDa Protein ist also keine $G\alpha_s$ -Untereinheit.

3.5.2 ADP-Ribosylierung des 44 kDa Proteins mit Cholera und Pertussis Toxin

Cholera- bzw. Pertussis Toxin können in vivo die Übertragung einer ADP-Ribose von NAD auf $G\alpha$ -Untereinheiten von G-Proteinen katalysieren (Hildebrandt et al., 1983) Dabei wird durch Cholera Toxin ADP - Ribose auf die aktivierte $G\alpha$ -Untereinheit übertragen, die dann ständig in diesem Zustand verbleibt (Ribeiro-Neto, 1985); durch Pertussis Toxin wird Übertragung auf die nicht aktivierte $G\alpha$ - Untereinheit katalysiert (Sekura, 1985). Diese Untereinheit ist nicht mehr durch den Rezeptor aktivierbar (Kurose, et al., 1983 / Hsia, et al., 1984).

Durch ihre hohe Substratspezifität bieten diese Toxine in vitro neben funktionellen Untersuchungen (Injektion in den Ventralnerv Photorezeptor) die Möglichkeit der Identifizierung von $G\alpha$ -Untereinheiten von G-Proteinen. Wird im Assay [^{32}P] NAD als Cosubstrat angeboten, können die markierten Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

In Fig. 10 sind die Ergebnisse der Markierungsexperimente mit Cholera und Pertussis Toxin dargestellt. Die Membranfraktion (A) und die GTP- γ -S Extrakte (B) wurden mit Cholera Toxin inkubiert, mit Pertussis Toxin wurde die Membranfraktion (C) inkubiert. a zeigt jeweils den Ansatz mit Toxin, b ist jeweils die Kontrolle ohne Toxin.

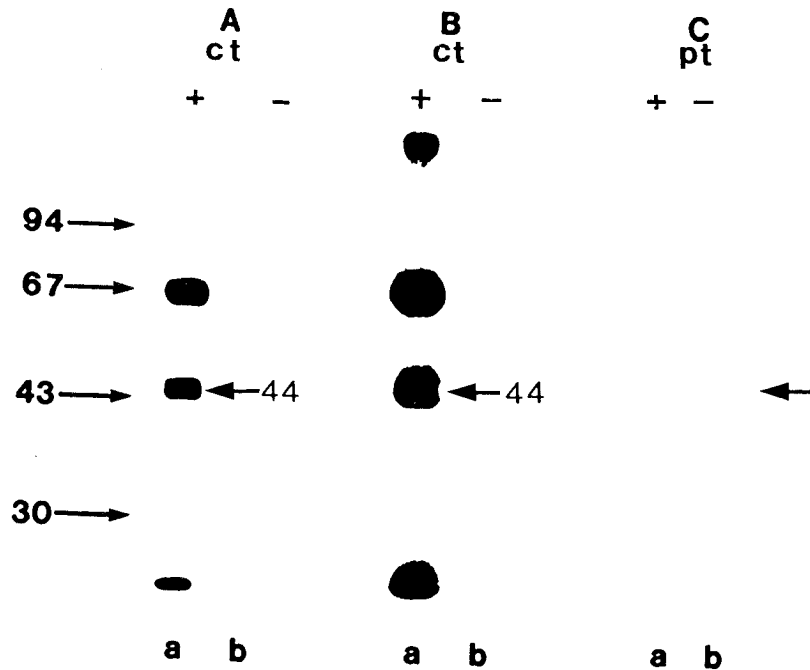


Fig.10 [^{32}P]ADP-ribosylated proteins separated by SDS/PAGE. A: photoreceptor membranes from *Sepia*, B: GTP- γ -S extracts incubated with cholera toxin, C: photoreceptor membranes incubated with pertussis toxin; a: with (+) and b: without toxin (-). X-ray films were exposed for 3 days at -80°C . Cholera toxin caused incorporation of radioactivity into proteins of 67 and 44 kDa M_r (A). The 67 kDa band corresponds to BSA which was used as a carrier protein for diluted cholera toxin. The 44 kDa proteins appears to be the preferential substrate of cholera-toxin. Pertussis toxin did not ADP ribosylate the 44 kDa protein of *Sepia* photoreceptor membranes (C). The membrane fraction contained a substrate of 39 kDa M_r .

Cholera Toxin katalysiert den Transfer von Radioaktivität auf zwei Hauptbanden, ein 67 und ein 44 kDa Peptid (Fig.10,A). Die 67 kDa Bande der Autoradiographie korrespondiert mit dem eingesetzten BSA (4ug/ Assay Tube), welches als Carrier Protein für das verdünnte Cholera Toxin fungiert. Durch SDS PAGE war die andere hauptsächlich markierte Bande nicht von der Guanin Nucleotid- sensitiven 44 kDa Bande der *Sepia* Photorezeptoren zu trennen. Da die maximal eingesetzte

Proteinmenge für die 44 kDa Bande sowohl in der Membranfraktion, als auch im Extrakt (Fig.10,B) nicht mehr als 0.5 µg/ Reaktionsansatz beträgt, die Schwärzung aber mindestens so stark wie bei der 67 kDa Bande (BSA, 4 µg / Ansatz) ist, scheint die 44 kDa Bande spezifisch markiert zu sein, d.h. das Substrat für Cholera Toxin zu sein. In Tintenfischen (Squid, *Loligo opalescens*) konnte ebenfalls eine 44 kDa Bande mit Cholera Toxin markiert werden, wobei diese Markierung in Analogie zum Transducin lichtabhängig ist (Vandenberg, & Montal, 1984). Diese Bande scheint der 46 kDa Bande zu entsprechen, für die Saibil & Michel-Villaz (1984) in einer Papainverdauung Sequenzhomologien zum Transducin zeigen konnte. Die Unterschiede in den angegebenen Molekulargewichten können auf unterschiedliche Bestimmungsmethoden oder Ungenauigkeiten zurückzuführen sein.

Pertussis Toxin ribosyliert die 44 kDa Bande der *Sepia* Photorezeptoren nicht (Fig.10, C). In der Membranfraktion wird eine 39 kDa Bande sehr schwach markiert. Auch in Fliegenaugen konnte eine 39 kDa Bande markiert werden, die jedoch nur im ungereinigten Homogenat zu finden ist (Paulsen & Bentrop, 1986). Daher liegt die Vermutung nahe, daß diese 39 kDa Bande bei *Sepia* ebenfalls aus Ganglienzellen stammt, die die Präparation verunreinigen.

4. Diskussion

4.1. Kreuzreaktion zwischen *Limulus* und *Sepia*

Zum Nachweis der Kreuzreaktion zwischen *Limulus* und *Sepia* wurden die hergestellten Antiseren im ELISA und RIA getestet und weiterhin sollen diese Protein A gereinigte Antikörper in den Ventralnerv Photorezeptor injiziert werden. Auf histologischen Schnitten der Lateralaugen von *Limulus* sollen die hergestellten Antiseren ebenfalls getestet werden. Die auf diese Weise versuchte Identifizierung von Funktionen (hier

Proteine) mit Antikörpern in der lebenden Zelle und deren Lokalisation auf histologischen Schnitten, weist grundsätzlich einige Unsicherheiten auf:

In die Photorezeptorzelle injizierte aufgereinigte Antiseren sollen über die Bindung an ein bestimmtes Protein dieses in seiner Funktion stören. Dieses Protein wird so im funktionellen Test über die intrazellulären Ableitung von lichtinduzierten Potentialen identifizierbar (Stieve, 1983a). Dies setzt jedoch voraus, daß das Antigen das im ELISA und Western Blot erkannt wird, auch in vivo für den Antikörper zugänglich und erkennbar ist. Bei Membranproteinen besteht die Möglichkeit, daß im Antiserum überwiegend Antikörper gegen hydrophobe Domänen des Proteins entwickelt wurden, die in der Zelle durch Membranlipide maskiert sind.

Die Zellkompartimentierung kann die Zugänglichkeit der Proteine für die Antikörper durch Diffusionsbehinderung beeinträchtigen oder ganz verhindern. Antiseren, die in vivo keine Wirkung zeigen, lassen keine Aussage für die Funktion des betreffenden Proteins im Transduktionsprozess zu.

Die entwickelten polyklonalen Antiseren bestehen aus einer Vielzahl von an verschiedenen Antigenen bindenden Klonen. Zudem werden immer mehr Sequenzabschnitte bekannt, die in verschiedensten Proteinen auftauchen, d.h. sehr konserviert sind. Dadurch ist in vivo und auf histologischen Schnitten mit unspezifischen Bindungen zu rechnen, die mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden RIA, ELISA und Immunoblot nicht unbedingt erfaßt werden. Das in vivo erkannte Protein ist z.B. mit dem Immunoblot nicht identifizierbar. Durch die angewandte Präparationsmethode können Proteine verloren gehen oder die relativen Anteile der Proteine am Gesamtproteingehalt können stark verschoben werden, so daß die Proteinverteilung in den präparierten Mikrovillimembranen nicht der Verteilung in vivo entspricht. Diese Möglichkeiten müssen bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.2 Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen G- Protein Untereinheiten von Vertebraten mit dem 36 und 44 kDa Proteinen

Die Molekulargewichte 36 und 44 kDa der membranassoziierten Proteine, und Berichte aus der Literatur (Vandenberg & Montal, 1984 / Saibil & Michel-Villaz, 1984a) ließen annehmen, daß diese Proteine Untereinheiten eines G-Proteins sind. Dieses G-Protein könnte bei *Sepia* eine dem Transducin entsprechende Funktion haben. Jedoch wurden die von mir isolierten Proteine weder von Anti-Transducin-Antikörpern (vergl. Tsuda, et al., 1986, nur Kreuzreaktion mit G β Untereinheit), noch von Antikörpern gegen aufgereinigte Untereinheiten von G-Proteinen (vergl. Rosenthal, 1985) erkannt. Antiseren gegen synthetisierte Peptide (s. 3.4.3; G α_{common} und G β_{peptide}) zeigten dagegen die erwartete Bindung: sowohl die 44 kDa Bande wird von G α_{common} , als auch die 36 kDa Bande wird vom G β_{peptide} Antikörper erkannt. Diese Antikörper binden erwartungsgemäß auch an die zur Herstellung der oben genannten Antiseren benutzten Proteine (Transducin, Go, Gs, G τ). Diese Experimente zeigen, daß die aufgereinigten Untereinheiten den homologen Teilabschnitt auch enthalten. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede in der Bindung der Antiseren ist, daß diese Determinante erst bei der Denaturierung in der SDS PAGE bzw. im Immunoblot zugänglich wird. Da nur bis zu 10% der Proteine auf der Nitrocellulose renaturieren, kann der Antikörper die Determinante hier erkennen. Es ist daher anzunehmen, daß diese Determinante bei der Immunisierung nicht zugänglich ist, oder im Vergleich zu den anderen Abschnitten des Proteins nur sehr schwach immunogen ist. Diese gegen die ganze Untereinheit entwickelten Antiseren enthalten dann keine, wenige oder gering affine Antikörper gegen dieses Protein. Erst durch Injektion des synthetisierten Peptids wird diese als immunogene Determinante für das Immunsystem erkennbar. Diese Möglichkeit wird zur Zeit überprüft, indem denatu-

riertes Transducin für die Immunisierung verwandt wird. Die entwickelten Antiseren sollten Antikörper gegen diese Sequenz enthalten und mit den *Sepia* G-Proteinen kreuzreagieren.

Die oben genannten Ergebnisse bestätigen jedoch das Vorhandensein von α - und β - Untereinheiten von G-Proteinen in den Photorezeptoren von *Sepia*. Die starke und spezifische Bindung weist auf Homologien der Proteine von Vertebraten und Invertebraten hin. Die Sequenzen der für die Immunisierung benutzten Peptide scheint also hochkonserviert zu sein (Mumby et al., 1985 / Harris et al., 1985).

Die sehr starke Bindung des Anti-G β_{peptide} -Antikörpers an die 36 kDa Bande weist auf größere Ähnlichkeiten zwischen dieser Bande und den G β Untereinheiten der anderen getesteten G-Proteine hin. Dies wird durch das exakt übereinstimmende elektrophoretische Laufverhalten aller vier getesteten G β -Peptide unterstrichen. Die G β Untereinheiten der Vertebraten (Transducin, G s und G t) sind ebenfalls sehr ähnlich: durch "Peptide Maps" und Aminosäureanalyse sind sie nicht unterscheidbar (Manning & Gilman, 1983). Es ist anzunehmen, daß diese Ähnlichkeiten nicht nur innerhalb der Vertebraten bestehen, wie die starke Kreuzreaktion zeigt.

Das Antigen für das G α_{common} Antiserums ist eine die GTP-Bindungsstelle repräsentierende Peptidsequenz (s.o.). Die dargestellte immunologische Kreuzreaktivität der Vertebraten G α -Untereinheiten mit der markierten 44 kDa Bande in der *Sepia* Membranfraktion und im GTP- γ -S Extrakt ist daher ein weiteres Indiz für eine G-Protein Identität der 44 kDa Untereinheit.

4.3 ADP - Ribosylierungs - Experimente

Das 44 kDa Protein ist ein Substrat für Cholera Toxin, aber nicht für Pertussis Toxin. Proteine ähnlichen Molekularge-

wichts wurden bei anderen Evertrebraten gleichfalls mit diesen Toxinen markiert und als G-Proteine identifiziert (Tsuda et al., 1986 / Vandenberg & Montal, 1984 / Bontrop & Paulsen, 1986). Das Pertussis Toxin Substrat, die 39 kDa Bande in der photosensorischen Membran von *Sepia* ist mittels Coomassie Blau Färbung im SDS Gel nicht nachweisbar. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Bande um eine Verunreinigung der Mikrovilli Präparation mit Membranen aus Ganglienzellen. Diese Vermutung wird auch von Paulsen und Bontrop, 1985 gemacht, die ein Pertussis Toxin Substrat im Homogenat und nicht in gereinigten photosensorischen Membranen fanden.

Das 44 kDa Protein stimuliert die Adenylatcyclase nicht und man kann daher annehmen, daß es in den photosensorischen Membranen ebenfalls ein anders Zielenzym aktiviert. Die Kompatibilität des cyc- Systems (3.5.1) mit Evertrebraten G-Proteinen konnte von Malbon et al. (1984) mit Ventralnerv Photorezeptor von *Limulus* gezeigt werden. Injektionen von cAMP in den Ventralnerv Photorezeptor zeigten jedoch keine Effekte auf Erregung und/oder Adaptation (Corson et al., 1976 / Stern & Lisman, 1982 / Brown et al., 1984). Dies spricht ebenfalls gegen eine für den Phototransduktionsprozess relevante Aktivierung einer Adenylatcyclase.

4.4 Solubilisierung der 36 und 44 kDa Proteine mit GTP- γ -S von belichteten Membranen

Die immunologische Kreuzreaktion der anti-G α_{common} und anti-G $\beta_{peptide}$ Antikörper mit den *Sepia* Proteinen ist nur ein wichtiger Hinweis auf Ähnlichkeiten - erst der funktionelle Test konnte die Integration dieser Proteine in den Phototransduktionsprozeß nachweisen. Metarhodopsin bindet das G-Protein, dessen α -Untereinheit GDP gegen GTP austauscht und sich vom Rezeptor und damit auch von der Membran löst. Die so aktivierte Untereinheit hydrolysiert GTP zu GDP und geht

damit zurück in den inaktiven Zustand. Dieser für Vertebraten gut untersuchte Mechanismus (Kühn, 1980) konnte auch für *Sepia* gezeigt werden:

Die 36 und 44 kDa Proteine aus der Retina von *Sepia* lösen sich bei Behandlung zuvor belichteter Membranen mit GTP- γ -S haltigem Puffer von der Membran. Aus nicht belichteten Membranen wird bei dieser Behandlung signifikant weniger Protein freigesetzt. Das mehr freigesetzte Protein hat demzufolge lichtinduziert an die photosensorischen Membranen gebundenen, wahrscheinlich an aktives Metarhodopsin. Dieses Ergebnis zeigt neben der Nucleotidregulierbarkeit vor allem, daß die 36 und 44 kDa Proteine wie Transducin (Kühn, 1980) lichtinduziert an die Membran binden. Diese Übereinstimmungen zum Transducin (Kühn, 1980) machen auch für dieses Protein eine entsprechende Funktion wahrscheinlich.

Für die Rezeptor- vermittelnde Rolle eines G-Proteins bei Vertebraten sprechen neben den gezeigten Ergebnissen auch die bei verschiedenen Evertibraten nachgewiesene lichtaktivierbare GTPase Aktivität, die mit dem langandauernden erregten Zustand von Metarhodopsin korreliert ist (Blumenfeld et al., 1986). Weiterhin konnte man die lichtinduzierte Bindung von radioaktiv markierten GTP Analogen zeigen (Vandenberg & Montal, 1984).

Dieses lichtabhängige Lösen von der Membran durch GTP- γ -S ist eine starke Evidenz für eine dem Transducin analoge Funktion dieses Proteins bei *Sepia*. Diese Analogie konnte durch lichtinduzierbare Aktivierung der GTPase Aktivität des Transducins (Saibil & Michel-Villaz, 1984) und der Phosphodiesteraseaktivität (Vandenberg & Montal, 1984) durch photosensorische Membranen von Tintenfischen (Squid) gezeigt werden.

In elektrophysiologischen Experimenten am Ventralnerv Photorezeptor von *Limulus* konnte in vivo die entsprechende Wirkung des GTP- γ -S gezeigt werden. Das hydrolysenstabile Nucleotid hat bei Injektion in die Zelle aktivierende Wirkung (Bolsover & Brown, 1982 / Fein & Corson, 1981 / Corson et al. 1983)

Literaturverzeichnis

Altendorf, K.; Lukas, M.; Kohl, B.; Muller, C.; Sander-
mann, H. (1977):

Isolation and purification of bacterial membrane proteins
by use of organic solvents: The lactose permease and the
carbodiimide-reactive protein of the adenosinetriphospha-
tase

J. Supramol. Struct. 6, 229-238

Baer, K. (1984):

Untersuchungen der Funktion von Proteinen im Evertebraten
Photorezeptor mit Hilfe von Antikörpern

Dissertation, RWTH Aachen, Institut für Neurobiologie der
KFA Jülich

Bentrop, J.; Paulsen, R. (1986)

Light modulated ADP-ribosylation, protein phosphorylation
and protein binding in isolated *fly* photoreceptor membranes
Eur. J. Biochem. 161, 61-67

Blumenfeld, A.; Erusalimsky, J.; Heichel, O.; Selinger, Z.;
Minke, B. (1985)

Light activated guanosine-triphosphatase in *Musca* eye
membranes resembles the prolonged depolarizing afterpoten-
tial in photoreceptor cells

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7116-7120

Bolsover, S.R.; Brown, J.E. (1980)

Guanosine phosphates and the control of membrane potential
in *Limulus* ventral photoreceptors

Biological Bulletin 159 (2), 480

Bolsover, S.R.; Brown, J.E. (1982)

Injection of guanosine and adenosine nucleotides into
Limulus ventral photoreceptor cells

J. Physiol. 332, 325-342

Bordier, C. (1980)

Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution

J. Biol. Chem. 256 (2) , 1604-1607

Boyan, B.D.; Clement-Cormier, Y. (1984)

Membranes, Detergents and Receptor Solubilisation

Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Avenue, New York, NY 10011, 47-63

Bradford, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding

Anal. Biochem. 72, 248-254

Brown, P.K.; Brown, P.K. (1958)

Visual Pigments of the *octopus* and *cuttlefish*

Nature 182, 1288-1290

Brown, J.E.; Blinks, J.R. (1974)

Changes in intracellular free calcium concentrations during illumination of invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin

J. Gen. Physiol. 64, 643-665

Brown, J.E.; Kaupp, U.B.; Malbon, C.C. (1981)

cAMP and adenylate cyclase probably do not mediate excitation in *Limulus* ventral photoreceptors

Biol. bull. mar. biol. Lab., Woods Hole 161, 340

Brown, J.E.; Kaupp, U.B.; Malbon, C.C. (1984)

3',5'-Cyclic adenosine monophosphate and adenylate cyclase in phototransduction by *Limulus* ventral photoreceptors

J. Physiol. 353, 523-539

Brown, J.E.; Rubin, L.J. (1984)

A direct demonstration that inositol-triphosphate induces an increase in intracellular calcium in *Limulus* photoreceptors

Biochemical and Biophysical Research Communications 125, 1137-1142

Literaturverzeichnis

Altendorf, K.; Lukas, M.; Kohl, B.; Muller, C.; Sander-
mann, H. (1977):

Isolation and purification of bacterial membrane proteins
by use of organic solvents: The lactose permease and the
carbodiimide-reactive protein of the adenosinetriphospha-
tase

J. Supramol. Struct. 6, 229-238

Baer, K. (1984):

Untersuchungen der Funktion von Proteinen im Evertebraten
Photorezeptor mit Hilfe von Antikörpern

Dissertation, RWTH Aachen, Institut für Neurobiologie der
KFA Jülich

Bentrop, J.; Paulsen, R. (1986)

Light modulated ADP-ribosylation, protein phosphorylation
and protein binding in isolated *fly* photoreceptor membranes
Eur. J. Biochem. 161, 61-67

Blumenfeld, A.; Erusalimsky, J.; Heichel, O.; Selinger, Z.;
Minke, B. (1985)

Light activated guanosine-triphosphatase in *Musca* eye
membranes resembles the prolonged depolarizing afterpoten-
tial in photoreceptor cells

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7116-7120

Bolsover, S.R.; Brown, J.E. (1980)

Guanosine phosphates and the control of membrane potential
in *Limulus* ventral photoreceptors

Biological Bulletin 159 (2), 480

Bolsover, S.R.; Brown, J.E. (1982)

Injection of guanosine and adenosine nucleotides into
Limulus ventral photoreceptor cells

J. Physiol. 332, 325-342

Bordier, C. (1980)

Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution

J. Biol. Chem. 256 (2) , 1604-1607

Boyan, B.D.; Clement-Cormier, Y. (1984)

Membranes, Detergents and Receptor Solubilisation

Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Avenue, New York, NY 10011, 47-63

Bradford, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding

Anal. Biochem. 72, 248-254

Brown, P.K.; Brown, P.K. (1958)

Visual Pigments of the *octopus* and *cuttlefish*

Nature 182, 1288-1290

Brown, J.E.; Blinks, J.R. (1974)

Changes in intracellular free calcium concentrations during illumination of invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin

J. Gen. Physiol. 64, 643-665

Brown, J.E.; Kaupp, U.B.; Malbon, C.C. (1981)

cAMP and adenylate cyclase probably do not mediate excitation in *Limulus* ventral photoreceptors

Biol. bull. mar. biol. Lab., Woods Hole 161, 340

Brown, J.E.; Kaupp, U.B.; Malbon, C.C. (1984)

3',5'-Cyclic adenosine monophosphate and adenylate cyclase in phototransduction by *Limulus* ventral photoreceptors

J. Physiol. 353, 523-539

Brown, J.E.; Rubin, L.J. (1984)

A direct demonstration that inositol-triphosphate induces an increase in intracellular calcium in *Limulus* photoreceptors

Biochemical and Biophysical Research Communications 125, 1137-1142

Brown, J.E.; Rubin, L.J.; Ghalvayini, A.J.; Traver, 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 (1982) 160-163

Brown, J.E.; Rubin, L.J. (1986)

Signal transduction: The putative participation of inositol triphosphates in *Limulus* photoreceptors

Fortschritte der Zoologie, Band 33, ed. Lüttgen

Membrane Control, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York

Calhoon, R.; Tsuda, M. Ebrey, T.G. (1980)

A light activated GTPase from *Octopus* photoreceptors

Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 1452-1457

Corson, D.W., Fein, A. Schmidt, J. (1979)

Two effects of phosphodiesterase inhibitors on *Limulus* ventral photoreceptors

Brain Res. 176, 365-368

Codina, J. Rosenthal, W., Hildebrandt, J.D., Birnbaumer, L., Sekura, R.D. (1985)

Purification of N_{α} and N_{β} , the coupling proteins of hormone-sensitive adenylyl cyclases without intervention of activating regulatory ligands

Methods Enzymol. 109, 446-465

Corson, D.W.; Fein, A.; Walthall, W.W. (1983)

Chemical excitation of *Limulus* photoreceptors II.

Vanadate, GTP- γ -S and fluoride prolong excitation evoked by dim flashes of light

J. Gen. Physiol. 82, 659-677

Fein, A.; Payne, R.; Corson, D.W.; Berridge, M.J.; Irvine, R.F. (1984)

Photoreceptor excitation and adaptation by inositol-1,4,5-triphosphate

Nature 311, 157-160

Fein, A. (1986)

Excitation and adaptation of *Limulus* photoreceptors by light and inositol-1,4,5-triphosphate

Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 110-114

Trends in Neurological Science

Fein, A.; Corson, D.W. (1981)

Excitation of *Limulus* photoreceptors by vanadate and by a hydrolysis resistant analogue of guanosine triphosphate

Science 212, 555-557

Gilman, A.G. (1984)

G-proteins and dual control of adenylatcyclase

Cell 36, 577-579

Gierschik, P., Codina, J., Simons, C., Birnbaumer, L.,

Spiegel, A. (1985)

Antisera against a guanin nucleotide binding protein from retina crossreact with the β -subunit of the adenylyl cyclase-associated guanine nucleotide binding proteins, N_s and N_i

Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82, 727-731

Hamdorf, K. (1979)

The physiology of invertebrate visual pigments. In: Vision in Invertebrates (Handbook of Sensory Physiology) Vol. VII 6A (H.Autrum, ed.) 145-224, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Hamdorf, K.; Razmjoo, S. (1977)

The prolonged depolarizing afterpotential and its contribution to the understanding to photoreceptor funktion

Biophys. Struc. Mech. 3, 163-170

Hamdorf, K.; Razmjoo, S. (1979)

Photoconvertible pigment states and excitation in

Calliphora; the induction and properties of the prolonged depolarizing afterpotential

Biophys. Struc. Mech. 5, 137-161

- Hamdorf, K.; Paulsen, R.; Schwemer, J. (1973)
Photoregeneration and Sensitivity Control of Photoreceptors
of Invertebrates
in: Biochemistry and Physiology of visual pigments
ed. H. Langer, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- Harris, B.A.; Robishaw, J.D.; Mumby, S.M.; Gilman, A.G.
(1985)
Science 229, 1274-1277
- Hattefi, Y., Hanstein, W. (1969)
Slubilization of particulate proteins and nonelectrolytes
by chaotropic agents
Proc. Natl. Acad. Sci. 62, 1129-1136
- Hudson, L.; Hay, F.C. (1980)
Practical Immunology, Sec. Ed.
Blackwell Scientific Publications Oxford-London-Edinburgh-
Boston-Melbourne
- Hurley, J.B.; Simon, M.J.; Teplow, D.B.; Robishaw, J.D.;
Gilman, A.G. (1984)
Science 226, 860-862
- Hurley, J.B.; Fong, H.K.W.; Teplow, D.B.; Dreyer, W.J.;
Simon, M.J. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81, 6948-6952
- Kaupp, U.B. (1986)
II Rezeptorphysiologie und Orientierung
Sensory physiology and orientation
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 79, 51-68
- Koch, K.-W.; Kaupp, U.B.; (1985)
Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in
membranes of bovine rods by a cooperative mechanism
J. Biol. Chem. 260, 6788-6800
- Kühn, H. (1980)
Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other
proteins with bovine photoreceptor membranes
Nature 283, 587-589

Johnstone, A.; Thorpe, R. (1982)

Immunochemistry in Practice

Blackwell Scientific Publications Oxford-London-Edinburgh-
Boston-Palo Alto-Melbourne

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the
head of bacteriophage T4

Nature 227, 680-685

Levy, S., Fein, A. (1985)

Relationship between light-sensitivity and intracellular
free calcium in *Limulus* ventral photoreceptors. A

quantitative study using Ca-selective microelectrodes

J. Gen. Physiol. 85, 805-841

Malbon, C.C.; Kaupp, U.B.; Brown, J.E. (1984)

Limulus ventral photoreceptors contain a homologue of the
 α -subunit of mammalian Ns

FEBS Lett. 172, 91-94

Manning, D.R., Gilman, A.G. (1983)

J. Biol. Chem. 258, 7059-7063

Mumby, S.M.; Kahn, R.A.; Manning, D.R.; Gilman, A.G. (1986)

Antisera of designed specificity for subunits of guanine
nucleotide-binding regulatory protein

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 265-269

Ouchterlony O.; Nilson, L.A. (1978)

Immunodiffusion and immunoelectrophoresis

In: Handbook of Experimental Immunology

ed. D.M. Wier, Chapter 19

Blackwell Scientific Publications, Oxford

Paulsen, R.; Bontrop, J. (1986)

Light modulated biochemical events in fly photoreceptors

Progr. Zool. 33, 299-319

Paulsen, R., Bontrop, J., Bauernschmitt, H.G., Böcking, D., Peters, K. (1987)

Phototransduction in invertebrates: components of a cascade mechanism in fly photoreceptors

Photochemistry and Photobiophysics, Sppl. 261-272

Payne, R. (1986)

Phototransduction in microvillar photoreceptors of invertebrates: mediation of a visual cascade by inositol triphosphate

Photobiochemistry and Photobiophysics 13, 373-397

Payne, R., Corson, D.W., Fein, A. (1986)

Pressure injection of calcium both excites and adapts *Limulus* ventral photoreceptors

J. Gen. Physiol. 88, 107-126

Payne, R., Corson, D.W., Fein, A., Berridge, M.J. (1986)

Excitation and adaptation of *Limulus* ventral photoreceptors by inositol 1,4,5 trisphosphate result from a rise in intracellular calcium

J. Gen. Physiol. 88, 127-142

Payne, R. Fein, A. (1987)

Inositol-1,4,5,-triphosphate releases calcium from specialized sites within *Limulus* photoreceptors

The Journal of Cell Biology 104, 933-937

Ribeiro-Neto, F.A.P.; Mattera, R. Hildebrandt, J.D.;

Codina, J.; Field, J.B.; Birnbaumer, L. Sekura, R.D. (1985)

ADP-ribosylation of membrane components by Pertussis and Cholera toxin

In: Assay of Hormonal Effects

Acad. Press. Inc.

Rosenthal, W.; Kaesling, D.; Rudolph, U; Kleuss, C.;

Pallast, M. (1986)

Identification and characterisation of the 35 kDa β -subunit of guanine-nucleotide-binding proteins by an antiserum raised against transduction

Eur. J. Biochem. 158, 255-263

Salomon, Y. (1979)

Adenylat Cyclase Assay

Advances in Cyclic Nucleotide Research 10

ed. by G. Brooker, P. Greengard, G.A. Robison

Saibil, H.R. (1982)

An ordered membrane cytoskeleton-network in *Squid* photorezeptor microvilli

J. Mol. Biol. 158, 435-456

Saibil, H.R. (1984)

A light stimulated increase of cyclic GMP in *Squid* photoreceptors

FEBS Lett. 168, 213-216

Saibil, H.R., Michel-Villaz, M. (1984)

Squid rhodopsin and GTP-binding protein crossreact with vertebrate photoreceptor enzymes

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5111-5115

Schultz, G.; Jakobs, K.H. (1984)

In: Methods of Enzymology, 4, 369-378

ed. H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim

Sekura, R. (1985)

Pertussis Toxin: A tool for studying the regulation of adenylatcyclase

In: Assays of Hormonal Effects

Acad. Press. Inc.

Stieve, H. (1977 a)

Photoreception und ihre molekularen Grundlagen

in: Biophysik - Ein Lehrbuch

Hrsg. W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Stieve, H. (1977 b)

Thoughts on the comparative biology of photosensory function

Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1-25, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Stieve, H.; Baer, K.; Bruns, M. (1983)

Antibodies interfere with the excitation of *Limulus* photoreceptor cells

7. European Neuroscience Meeting, 11.-16.9. 1983

Stieve, H. (1983)

Transduction of light energy to electrical signals in photoreceptor cells

Society for Experimental Biology Symposium XXXVI, The Biology of Photoreception, ed. D.J. Cosens and D. Vince-Price

Stieve, H. (1984 a)

Transduktionsmechanismen in Photorezeptoren bei Evertabraten

Zoolog. Kolloquium, 5.1. 1984, Hamburg

Stieve, H.; Baer, K. (1984 b)

Lichtinduzierte Modifikation eines Polypeptids in der Sehzelle des Flußkrebess untersucht mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern

Schwerpunktprogramm "Biochemie des Nervensystems"

13.-14.12. 1984, Göttingen

Stieve, H. (1985)

Phototransduction in Invertebrate Visual Cells.

The present State of Research-Exemplified and Discussed Through the *Limulus* Photoreceptor Cells

Neurobiology (ed. by R. Gilles and J. Balthazart)

Springer Verlag, Heidelberg

Stieve, H. (1986)

Editor: The molecular mechanism of photoreception

Springer Verlag, Berlin

Stryer, L.; Hurley, J.B.; Fung, B.K.-K. (1981)

First stage of amplification in the cyclic-nucleotide cascade of vision

In: Current Topics in Membranes and Transport

Vol. 15: Molecular Mechanism of Photoreceptor Transduction

ed. W.H. Miller, Academic Press 93-108, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco

Stryer, L. (1986)

Cyclic GMP cascade of vision

Ann. Rev. Neurosci. 9, 87-119

Taylor, R. (1978 a)

Isolation and purification of a veratridine binding proteoglycolipid from rat gastrocnemius tissue

J. Neurochem. 31, 1199-1207

Taylor, R. (1978 b)

Isolation and purification of cholinergic receptor proteolipids from rat gastrocnemius tissue

J. Neurochem. 31, 1183-1198

Towbin, H.; Staehlin, T.; Gordon, J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 9, 4350-4354

Tsuda, M.; Tsuda, T.; Terayama, Y.; Fukuda, Y.; Akino, T.; Yamanaha, G.; Stryer, L.; Katada, T.; Ui, U.; Ebrey, T. (1986)

Kinship of cephalopode photoreceptor G-protein with vertebrate transducin

FEBS Lett. 198 (1), 5-10

Vandenberg, C.A.; Montal, M. (1984 a)

Light-regulated biochemical events in invertebrate photoreceptors. Light activated guanosine triphosphatase, guanine nucleotide binding, and cholera toxin catalysed labelling of *Squid* photoreceptor membranes

Biochemistry 23, 2339-2347

Vandenberg, C.A.; Montal, M. (1984 b)

Light regulated biochemical events in invertebrate photoreceptors. Light regulated phosphorylation of rhodopsin and phosphoinositides in *Squid* photoreceptor membranes

Biochemistry 23, 2347-2352

Diese Arbeit wurde am Institut für Biologie II der RWTH Aachen und am Institut für Neurobiologie der KFA Jülich angefertigt.

Für die großzügige Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an einer FPLC-Anlage im Institut für physiologische Chemie bedanke ich mich bei Prof. Gersonde.

Die freundliche Aufnahme und intensive Unterstützung während meiner Arbeiten am Institut für Pharmakologie der FU Berlin, insbesondere die Bereitstellung der Antikörper haben mir sehr geholfen und ich bedanke mich bei Prof. G. Schultz, Dr. Hinsch und Dr. Rosenthal und allen Mitarbeitern des Instituts.

Bei Dr. J. Nuske bedanke ich mich für die Unterstützung bei den praktischen Arbeiten und die Durchsicht des Manuskripts.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Overath und Herrn Nacken, die durch ihre Mühe die nicht einfache Aufzucht der Sepien am Insitut ermöglichten und damit die Arbeitsbedingungen wesentlich verbesserten.

Herrn Prof. H. Stieve danke ich für die Bereitstellung des Themas, insbesondere aber für die großzügige Unterstützung der Arbeit, seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen Anregungen.

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre, die mit zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

