



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

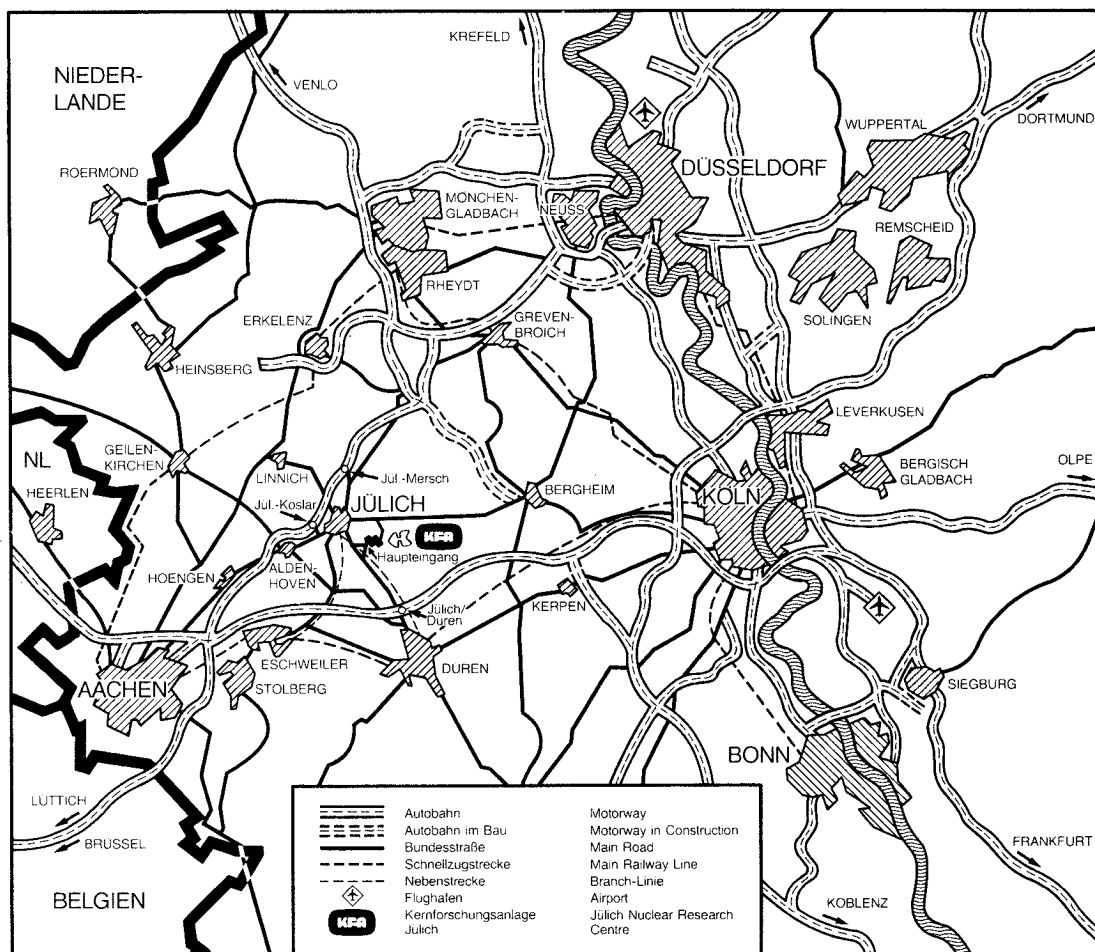
Institut für Biologische Informationsverarbeitung

**Experimente zur Phosphorylierung
und Mikroheterogenität von Arrestin
(48-kDa Protein) aus Rinderretina**

von

Ingo Weyand

**Jül-2216
Juli 1988
ISSN 0366-0885**



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2216
 Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-2216

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Experimente zur Phosphorylierung und Mikroheterogenität von Arrestin (48-kDa Protein) aus Rinderretina

von

Ingo Weyand

D 82 (Diss. T.H. Aachen)



Summary

1. Arrestin (48-kDa protein, S-antigen) from bovine retina was purified by column chromatography and subsequent FPLC-anion exchange chromatography (Mono Q column). Purified arrestin shows a charge-dependent heterogeneity which was verified by isoelectric focusing and immunoblotting with a monoclonal anti-S-antigen antibody (S6H8). The IEF pattern of purified arrestin consists of 2-4 major and at least 5-10 minor bands with isoelectric points between pH 5.5-6.1. Arrestin-subspecies were partially separated from one another by FPLC-exchange chromatography; the more basic major bands 2 and 3 (pH 6.0-6.1) were eluted in a so-called pre-peak, whereas bands 0 and 1 (pH 5.8-5.9) as well as the more acidic minor bands (pH < 5.75) were found in the asymmetric major peak. I have obtained an almost complete separation of individual subspecies by FPLC-chromatofocusing.
2. To examine a postulated light-dependent ATP/ADP-exchange on arrestin I have done nucleotide exchange and binding experiments in a reconstituted system, i.e. purified arrestin + ROS-membranes $\pm$ light. I could not detect a light-dependent binding of ATP to arrestin, but I found a light-dependent phosphorylation of arrestin.
3. I investigated whether arrestin can be stoichiometrically phosphorylated by a ROS-protein kinase and to what extent the charge-dependent multiplicity of arrestin can be explained by the degree of phosphorylation.

Arrestin is phosphorylated by the ROS-intrinsic protein kinase C (PK-C), but only substoichiometrically. In the presence of ROS-membranes the phosphorylation is light-dependent, except if additional phosphatidyl-serine (PS) vesicles are added. The phosphory-

lation conditions were optimized with a partial-purified PK-C and PS-vesicles:

at 5 mM MgCl_2 , about 100 μM free Ca^{2+} , 50 μM ATP and 5 μg PS maximally 0.1-0.15 mole phosphate/mole arrestin were incorporated.

To examine whether this apparently low ^{32}P -phosphate incorporation may be due to an in vivo pre-phosphorylation, I chemically analyzed purified arrestin and found a phosphate content of about 0.1 mole covalently-bound phosphate per mole arrestin. That means:

1. the substoichiometric phosphorylation through PK-C cannot be explained by occupied (= pre-phosphorylated) phosphorylation sites.
2. the observed charge-dependent heterogeneity of arrestin cannot be exclusively explained by phosphorylation.

It was not possible to fit phosphorylated arrestin into the IEF-pattern, because phosphorylated arrestin aggregates very easily. An eventual importance of a phosphorylation-mediated aggregation (polymerisation?) of arrestin is discussed, because phosphorylation through PK-C is light-dependent in the presence of ROS-membranes.

4. To investigate whether the charge-dependent heterogeneity
 1. may be due to cellular aging processes
 2. is possibly caused by mechanisms at the DNA- and/or RNA-level, I examined the heterogeneity of arrestin in individual calf and cattle retinas.

Analyses of single retinas revealed:

1. Both retinas of an animal show identical IEF-patterns of arrestin.
2. Characteristic differences exist between the arrestin-pattern of various individuals.
3. Arrestin can be classified in 3 distinct IEF-patterns (pattern I, II, III).

These patterns show as dominant subspecies: bands 0 and 2 in pattern I; bands 0, 1, 2, 3 in II; bands 0, 2, 4, 5 in III.

Patterns I, II and III occur with a remarkably different frequency in calf and cattle. 81 % of the examined cattle retinas revealed the so-called standard pattern (pattern I, only 2 major bands), but only 44 % of calf retinas. The occurrence of individual IEF-patterns favors the assumption that distinct subspecies of arrestin exist which differ in their primary structure and may be differentially expressed during ontogenesis.

4. The complexity of the IEF-pattern does not increase with aging; the pattern becomes rather more simply, because pattern I occurs more frequently in cattle than in calf retinas.
5. The binding of arrestin to ROS-membranes phosphorylated to various degrees (average P.-extent: 0.65, 1.74, 6.62 mole phosphate/mole rhodopsin) was studied in preliminary experiments: the higher rhodopsin is phosphorylated the more arrestin binds to rhodopsin. Subsequent IEF-analyses of bound and unbound arrestin did not hitherto reveal indications of a different binding behavior of single arrestin-bands as a function of the average phosphorylation extent of rhodopsin.

Abkürzungen

DTT	Dithiothreitol
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HP	Hauptpeak
IEF	Isoelektrische Fokussierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PG	Phosphorylierungsgrad
PK-C	Protein-Kinase-C
P/Rho	Mol Phosphat pro Mol Rhodopsin
ROS	rod outer segment (Stäbchenaußensegment)
SDM	Standardabweichung des Mittelwerts
SDS	Sodium dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VP	Vorpeak
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
1.1 Einführung in die visuelle Signal- transduktion bei Vertebraten	1
1.2 Zielsetzung der Arbeit	5
2. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	7
2.1 Ausgangsmaterial (Stäbchenaußensegmente und Retinen)	7
2.1.1 Verwendete Proteine und Proteinextrakte	7
2.1.1.1 Protein-Kinase-C haltige ROS-Protein- extrakte	7
2.1.1.2 Protein-Kinase-C aus Hühnerovidukt	9
2.1.1.3 Monoklonale anti-S-Antigen Antikörper	9
2.1.2 Herstellung von Retina-Extrakten	9
2.1.3 Membranen und Liposomen	10
2.2 Reinigung von Arrestin aus Rinderretinen	11
2.2.1 Roh-Reinigung von Arrestin	11
2.2.2 Reinigung durch FPLC-Anionenaustausch- chromatographie	13
2.2.3 Reinigung durch FPLC-Chromatofokussierung	14
2.3 Isoelektrische Fokussierung von Arrestin	15
2.4 Identifizierung von Arrestin durch Immuno-Blotting	17
2.5 Phosphorylierung von Arrestin	19
2.5.1 Phosphorylierungsversuche mit Protein- Kinase-C haltigen ROS-Proteinextrakten	19
2.5.1.1 Versuchsprinzip	19
2.5.1.2 Die Komponenten der Phosphorylierungs- ansätze	19
2.5.1.3 Die Durchführung der Phosphorylierung	21
2.5.2 Phosphorylierungsversuche mit Protein- Kinase-C aus Hühnerovidukt	22
2.5.2.1 Der rekonstituierte Phosphorylierungs- ansatz	22
2.5.2.2 Versuchsdurchführung	23
2.6 Phosphatanalyse	24
2.7 Methodischer Anhang	26

	<u>Seite</u>
3. <u>ERGEBNISSE</u>	29
3.1 Reinigung von Arrestin	29
3.1.1 Roh-Reinigung	29
3.1.2 Reinigung mittels Anionenaustauscher-FPLC	31
3.2 Nachweis der Ladungsmikroheterogenität von Arrestin	34
3.2.1 Isoelektrische Fokussierung und Immunoblotting	34
3.2.2 Teilweise Trennung der Subspezies durch FPLC-Ionenaustauschchromatographie	36
3.3 Phosphorylierung von Arrestin	38
3.3.1 Phosphorylierungsversuche mit ROS-Proteinextrakten	38
3.3.2 Phosphorylierungsversuche mit teilgereinigter Protein-Kinase-C (PK-C)	46
3.3.3 Isoelektrische Fokussierung von phosphoryliertem Arrestin	50
3.4 Phosphatanalyse	53
3.5 Mikroheterogenität von Arrestin in Einzelretinen	54
3.6 Versuche zur Trennung von Arrestin-Subspezies mittels FPLC-Chromatofokussierung	61
4. <u>DISKUSSION</u>	64
4.1 Warum wurden Phosphorylierungsversuche mit Arrestin durchgeführt?	64
4.2 Diskussion der Phosphorylierungsversuche	66
4.3 Diskussion der Mikroheterogenität	72
4.4 Arrestin-Heterogenität in einzelnen Retinen	75
4.5 Ausblick	80
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	81
6. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	84

1. Einleitung

1.1 Einführung in die visuelle Signaltransduktion ----- bei Vertebraten -----

Aufnahme und Verarbeitung extrazellulärer Reize durch adäquate Signaltransduktionssysteme ist für Pro- und Eukaryoten von **existenzieller** Relevanz (1). Die Perception des Reizes 'Licht', d.h. die Absorption von Photonen, erfolgt im Vertebratenauge durch spezialisierte Photorezeptorzellen, die Stäbchen bzw. Zapfen. Die Außensegmente der Stäbchen, die für das Dämmerungssehen verantwortlich sind, enthalten die zur Reizaufnahme und -verarbeitung notwendigen molekularen Komponenten (Proteine), um den Lichtreiz in elektrische Impulse, d.h. Potentialänderungen der Zellmembran, umzusetzen (2 - 4).

Die Stäbchenaußensegmente enthalten dicht gepackte, stapelförmig angeordnete Membranen (Disks), die fast ausschließlich aus dem lichtsensitiven Rezeptor Rhodopsin und Phospholipiden bestehen. Die Absorption eines Photons durch dieses integrale Membranprotein führt zu einer cis-trans-Isomerisation des proteingebundenen Chromophors 11-cis-Retinal, die nicht nur eine Konformationsänderung im Bereich der hydrophoben Chromophoren-Bindungsstelle bedingt, sondern, mit einer kurzen zeitlichen Verzögerung Konformationsänderungen des cytoplasmatisch exponierten Rhodopsinanteils induziert.

Die zelluläre, elektrophysiologisch meßbare Antwort auf den Reiz besteht hingegen in einer Hyperpolarisation der Plasmamembran. Die Hyperpolarisation wird bis zur Synapse weitergeleitet und dort der nachfolgenden Nervenzelle mitgeteilt.

In der ROS-Plasmamembran sind spannungsunabhängige Kationenkanäle (sog. Na^+ -Kanäle) lokalisiert, die im Dunkeln geöffnet sind, nach Belichtung aber geschlossen werden. Die Abnahme des hauptsächlich von Na^+ -Ionen getragenen Stroms in das Stäbchenaußensegment bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung des K^+ -Ausstroms im Innensegment führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle in Richtung auf ein K^+ -Gleichgewichtspotential.

Die räumliche Distanz zwischen Diskmembranen (Reizperzeption) und Plasmamembran (Reizantwort) fordert einen internen, löslichen second messenger, der die funktionelle Kopplung zwischen diesen Strukturen ermöglicht.

Dieser second messenger ist das zyklische GMP, welches unmittelbar die Kationen-Kanäle der Plasmamembran öffnen kann (5, 6, 7). Die Regulation der cGMP-Konzentration erfolgt durch die cGMP-PDE Enzymkaskade.

Die cGMP-PDE-Enzymkaskade (oder: Rhodopsin-Transducin-cGMP-Phosphodiesterase-Kaskade) beruht auf spezifischen Interaktionen zwischen lichtaktiviertem Rhodopsin (Rh^*) und löslichen bzw. peripher membran-gebundenen ROS-Proteinen (8 - 11).

Es wurden bisher drei ROS-Proteine identifiziert, die nach Belichtung an photoaktiviertes Rhodopsin binden können:

(1) TRANSDUCIN, das G-Protein der visuellen Informationskaskade (12 - 19), welches nach lichtabhängigem Nukleotidaustausch mit seiner aktivierten α -Untereinheit (also: T_α -GTP) die cGMP-PDE durch Bindung der inhibitorischen PDE-Untereinheiten aktiviert (20 - 22).

Ein photoaktiviertes Rhodopsin (Rh^*) vermag nacheinander ca. 500 Transducine zu aktivieren, die ihrerseits stöchiometrisch cGMP-PDE-Moleküle aktivieren können. Die

aktive PDE wiederum ist in der Lage 2.000 bis 4.000 cGMP-Moleküle pro Sekunde zu hydrolysieren, so daß nach einem absorbierten Photon durch diese zweistufige Amplifikation $10^5 - 10^6$ Moleküle second messenger hydrolysiert werden können.

(2) RHODOPSIN KINASE, die spezifisch lichtaktiviertes Rhodopsin mehrfach (maximal neunfach) an Serin und Threonin phosphorylieren kann (23 - 28).

(3) ARRESTIN, auch 48-kDa PROTEIN oder S-ANTIGEN genannt (29 - 31), welches an lichtaktiviertes und phosphoryliertes Rhodopsin binden kann (30).

Arrestin (S-Antigen) wurde bisher mehr oder weniger ausschließlich in retinalen oder retina-analogen Gewebestrukturen von Vertebraten und photorezeptiven Organen von Invertebraten lokalisiert (32 - 38). Mittels immunchemischer und immuncytochemischer Methoden konnte Arrestin in Wirbeltier-Stäbchen und Zapfen, sowie in Zellen des Pinealorgans (Epiphyse) und des Plexus choroideus lokalisiert werden. Arrestin scheint ein phylogenetisch sehr altes Protein zu sein, da eine S-Antigen-(ähnliche)-Immunreaktivität in den photosensitiven Strukturen verschiedener Tierstämme nachgewiesen wurde, beispielsweise schon bei Plathelminthen und Anneliden.

Die komplette Aminosäuresequenz des retinalen Rinder-Arrestins ist mittlerweile aus Klonier- und Sequenzierungsexperimenten bekannt (39, 40).

Retinales Arrestin ist ein lösliches, 48.000 Dalton großes Protein, welches in bemerkenswert großer Menge in den Stäbchenzellen vorkommt. Das Verhältnis von Arrestin

zu Rhodopsin entspricht zumindest ungefähr 1 Molekül Arrestin / 10 Molekülen Rhodopsin; bei Ratten fanden Broekhuysen et al. (41) sogar ein 1 zu 1 Verhältnis von Arrestin zu Rhodopsin.

Arrestin kann im Dunkeln in der gesamten Photorezeptorzelle lokalisiert werden; nach Belichtung wurde eine deutliche Verschiebung von Arrestin aus dem Innensegment in das Außensegment beobachtet (41, 42).

Die lichtabhängige Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin ist die Grundlage für seine bisher erkannte Funktion innerhalb der cGMP-PDE-Enzymkaskade (43). Durch die Bindung von Arrestin an lichtaktiviertes und phosphoryliertes Rhodopsin wird Transducin kompetitiv verdrängt. Als Folge dieses Verdrängungsmechanismus wird die Transducin-vermittelte Aktivierung der cGMP-PDE unterdrückt. Dadurch wird weniger second messenger (cGMP) hydrolysiert, so daß eine vermehrte Öffnung von cGMP-sensitiven Kationenkanälen in der Plasmamembran erfolgen kann: das Ruhepotential über der Plasmamembran wird dadurch wieder erreicht.

Die "arretierende" Funktion von 48-kDa Protein innerhalb der Reizverarbeitungskette der Sehzellen veranlaßte Zuckerman et al. (87), dieses Protein Arrestin zu nennen. Nach Zuckerman und Cheasty (44) wird allerdings die aktivierte cGMP-PDE in Gegenwart von ATP unmittelbar durch Arrestin inhibiert und steht damit im Gegensatz zu dem von Wilden et al. (43) entwickelten Wettbewerbsmodell.

Neben seiner Funktion innerhalb der cGMP-PDE-Enzymkaskade wirkt Arrestin ebenfalls im hormonell stimulierten, G-Protein-vermittelten β_2 -adrenergen-Transduktionssystem (45). Für eine Desensibilisierung des β_2 -adrenergen Rezep-

tors aus Hamsterlungenzellen ist neben seiner Phosphorylierung durch die β -adrenerge Rezeptorkinase ein weiteres Protein notwendig. Dieses Protein ist bis jetzt noch nicht identifiziert, kann aber durch Arrestin aus Rinderretinen ersetzt werden: die Zugabe von gereinigtem Arrestin zu phosphoryliertem β_2 -adrenergen Rezeptor führte zu einer ca. 40 % niedrigeren Agonist-stimulierten GTPase-Aktivität des stimulatorischen G-Proteins (45).

Darüberhinaus besitzt Arrestin (S-Antigen) auch eine klinisch-pathologische Relevanz. Es kann sowohl im tierexperimentellen Modell als auch beim Menschen Autoimmunerkrankungen des Auges und der Epiphyse induzieren, die als autoimmune Uveoretinitis (EAU) bzw. Pinealitis (EAP) bezeichnet werden (46 - 48). Da die autoimmune Uveoretinitis durch ein lösliches Antigen der Rinderretina ausgelöst wurde, bezeichneten Wacker et al. (46) dieses als S(oluble)-Antigen.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Zuckerman et al. (65) hatten 1984 in Analogie zum lichtabhängigen Nukleotidaustausch am Transducin (13) einen lichtabhängigen ATP/ADP-Austausch am 48-kDa Protein postuliert. Sie nehmen an, daß diese Nukleotid-Bindungs-kapazität von Arrestin eine Funktion bei der cGMP-PDE-Inaktivierung besitzt (44). Zur Überprüfung dieses Postulats führte ich Nukleotidaustausch- und Bindungsexperimente mit $[2,8-^3\text{H}]\text{-ATP}$ im rekonstituierten System, d.h. gereinigtes Arrestin + Diskmembranen $\pm$ Lichtbedingungen, durch.

Es konnte keine lichtabhängige ATP-Bindungskapazität von Arrestin nachgewiesen werden; stattdessen beobachtete ich eine lichtabhängige Phosphorylierung von Arrestin durch $AT^{32}P$ und ROS-Proteinextrakte. Die im Rahmen dieser Versuche durchgeführten FPLC-Reinigungen von Arrestin ergaben Hinweise auf eine ladungsbedingte Heterogenität von Arrestin, die durch IEF verifiziert wurde.

Daraus entwickelten sich zwei Fragestellungen:

1. Wird Arrestin (möglicherweise lichtabhängig) von einer Stäbchenaußensegment-Proteinkinase stöchiometrisch phosphoryliert?
2. Inwieweit kann die ladungsbedingte Mikroheterogenität durch Phosphorylierung erklärt werden?

Gegebenenfalls sollte noch eine weitere Frage beantwortet werden, nämlich die, ob neben posttranslationalen auch andere Mechanismen an der Entstehung der Arrestin-heterogenität beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1 Ausgangsmaterial (Stäbchenaußensegmente und ----- Retinen) -----

FrISChe Rinderaugen wurden im Dunkeln auf Eis transportiert (Herr Esser) und bei Rotlicht weiter aufgearbeitet. Stäbchenaußensegmente aus frischen Rinderretinen wurden fast immer von Frau Derichs oder Herrn Wüst nach Wilden und Kühn (25) präpariert; die Präparation der meisten Retinen wurde von Frau Derichs und Herrn Esser durchgeführt.

2.1.1 Verwendete Proteine und Proteinextrakte -----

Arrestin wurde aus eingefrorenen Retinen präpariert (siehe 2.2.1).

Isotonische und hypotonische ROS-Proteinextrakte wurden prinzipiell nach Kühn (49) präpariert.

2.1.1.1 Protein-Kinase-C haltige ROS-Proteinextrakte -----

Protein-Kinase-C haltige Proteinextrakte wurden wie folgt hergestellt:

- a): ROS wurden bei einer Konzentration von 100-150 μ M Rhodopsin in 120 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.0, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA bei schwachem Rotlicht homogenisiert und 5 - 10 min auf Eis stehen gelassen. Dann wurde das Homogenisat halbiert; zur Herstellung von isotonischem Dunkelextrakt wurde die eine Hälfte mit obigem Puffer auf 120 μ M Rhodopsin verdünnt und bis zur Abzentrifugation der extrahierbaren Proteine unter Lichtabschluß auf Eis gehalten. Die Extraktion von ROS-Proteinen unter Lichtbedingungen erfolgte folgendermaßen:

die andere Hälfte des Homogenisats wurde statt mit Puffer mit einem entsprechenden Volumen von hochphosphorylierten Membranen (Endkonzentration: 10 μ M hochphosphoryliertes Rhodopsin) gemischt und dann 10 min bei 25° C im Wasserbad hinter einer orangen Plexiglasscheibe belichtet (150 W Lampe; $\lambda > 530$ nm). Dies erfolgte, um Arrestin-befreite isotonische Extrakte zu erhalten.

Dunkelgehaltenes und belichtetes Homogenisat wurden dann zur Gewinnung der EGTA-extrahierbaren ROS-Protein-Kinase-C 30 min bei ca. 50.000 g, 2° C zentrifugiert und die erhaltenen Überstände nochmal klarzentrifugiert. Diese waren 120 μ M (bezogen auf die Rhodopsinkonzentration). Die extrahierten Proteine wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

- b): Eine stärker konzentrierte Protein-Kinase-C Präparation (siehe Diskussion) enthielt folgende Veränderungen: ROS wurden bei schwachem Rotlicht zuerst mit 120 mM NaCl, 10 Hepes pH 7.5, 1 mM DTT bei 4° C 15 min bei 40.000 g gewaschen und anschließend in 120 mM NaCl, 10 Hepes pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM EGTA homogenisiert (ca. 5.5 mg Rhodopsin/ml). Das Homogenisat wurde dann im Dunkeln auf 25° C temperiert und anschließend 8 min bei 25° C belichtet. Das belichtete Homogenisat wurde 5 min bei ca. 250.000 g zentrifugiert, der isotonische EGTA-Überstand nochmal ultrazentrifugiert und anschließend mit Centri-con-30 Mikrokonzentratoren (Amicon) bei 5° C konzentriert. Die Lagerung erfolgte mit 50 % (v/v) Glycerin in flüssigem Stickstoff. Die Konzentration dieses ROS-Proteinextraktes betrug 0.85 mM (bezogen auf die Rhodopsinkonzentration).

2.1.1.2 Protein-Kinase-C aus Hühnerovidukt

Die verwendete teilgereinigte Protein-Kinase-C Präparation aus Hühnerovidukt wurde von Herrn F. Horn (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt (50). Diese Protein-Kinase-C (Reinheit ca.23 %) lag in 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 25 mM β -Mercaptoethanol und 50 % Glyzerin vor. Die anfängliche Aktivität belief sich auf 17 mU/ml (bei einer spezifischen Aktivität von ca. 300 mU/mg Protein). Nach (51) ist eine Unit von Protein-Kinase-C definiert als die Enzymmenge, die 1 μ Mol γ -Phosphat von ATP pro Minute bei 30° C in Histon IIIs (Sigma) inkorporiert.

2.1.1.3 Monoklonale anti-S-Antigen-Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen anti-S-Antigen-Antikörper stammen aus dem Labor von Herrn J.-P. Faure (Paris). Es handelt sich dabei um die DEAE-aufgereinigten bzw. affinitätschromatographisch gereinigten IgG-2a Antikörper S8D8, S8D1 und S6H8. In den Versuchen wurde fast immer der affinitätschromatographisch gereinigte S6H8 verwendet (52).

2.1.2 Herstellung von Protein-Extrakten aus einzelnen Retinen

Dunkel verpackte, einzelne Rinder- bzw. Kälberretinen, die in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert waren, wurden in 30° C warmem Wasser aufgetaut und bei schwachem Rotlicht in 1 ml Lysepuffer (10 mM Hepes pH 7.4, 0.2 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT) auf Eis homogenisiert.

Die Homogenisate verblieben 15 Minuten auf Eis und wurden dann auf 120 mM NaCl und 1 mM MgCl_2 eingestellt. Die Retinen wurden nochmal vorsichtig homogenisiert, standen weitere 15 min auf Eis und wurden dann bei 4° C 15 min bei ca. 300.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Herstellung von Lichtretina-Extrakten wurden die Retinen in 120 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.4-7.5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA kurz auf 25° C im Wasserbad temperiert und dann 4 min belichtet (150 W Lampe, $\lambda > 530$ nm). Die belichteten Retinen wurden dann genauso weiterverarbeitet wie ihre Dunkel-Pendants.

2.1.3 Membranen und Liposomen

In den Phosphorylierungsversuchen wurden folgende ROS-Membranen verwandt:

Aus den zur Extraktion von ROS-Protein-Kinase-C verwendeten ROS-Pellets wurden hypotonisch gewaschene ROS-Membranen gewonnen (cf. Abb. 7). Die Waschungen (in der Regel dreimal) erfolgten mit 10 mM Hepes pH 7.0, 1 mM DTT und je nach Fragestellung in Anwesenheit von 1 mM EGTA. Die gewaschenen Membranen wurden dann in einem Puffer mittlerer Ionenstärke aufgenommen (120 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.5, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT).

Phosphorylierte und regenerierte Disk-Membranen (PG: ca. 5.5 P/Rho) stammten von Frau Wilden (25).

Phosphatidylserin-Liposomen wurden wie folgt hergestellt: aus einer unter Luftabschluß bei -80° C gelagerten L- α -Phosphatidyl-L-Serin-Stammlösung wurde auf Eis unter Argonatmosphäre ein entsprechendes Gebrauchs-

aliquot entnommen und das Lösungsmittel (Chloroform : Methanol, 95 : 5) unter Argon abgedampft. Die Lipide wurden mit 60 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.5 versetzt (1 mg/ml) und in verschlossenen Eppendorf-Gefäßen im Eiswasserbad zweimal je zehn Sekunden bei höchster Stufe ultrabeschallt (Beschallungstopf: Branson Sonifier B-12). Die Liposomen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und am darauffolgenden Tag verwendet.

Für die Arrestinbindungsversuche (siehe Diskussion) wurden von Herrn Schiewe nichtphosphorylierte Kontrollmembranen sowie unterschiedlich hochphosphorylierte Membranen zur Verfügung gestellt. Die durchschnittlichen Phosphorylierungsgrade dieser regenerierten Membranen waren 0.65, 1.74 und 6.62 P/Rho.

2.2 Reinigung von Arrestin aus Rinderretinen

2.2.1 Roh-Reinigung von Arrestin

Arrestin wurde nach 2 sehr verschiedenen Methoden gereinigt, nach Dorey et al. (53) bzw. Wilden et al. (54). Beide Methoden liefern vergleichbar reines Arrestin (Reinheit: größer als 70 %); die Präparationen enthalten allerdings unterschiedliche, verunreinigende Proteine (54). Säulenchromatographisch gereinigtes Arrestin (53) unterscheidet sich weder im cGMP-PDE-Test noch im IEF-Muster von dem, welches über die lichtabhängige Bindung an phosphoryliertes Rhodopsin (54) gereinigt wurde. Die Reinigung nach (53) wurde von mir folgendermaßen durchgeführt:

Alle Präparationsschritte erfolgten entweder auf Eis oder in einer auf 4° C klimatisierten Kühlkammer. Dazu wurden bei schwachem Rotlicht Retinen in 10 mM Na₂K-PO₄

pH 7.6 eine halbe Stunde unter ständigem Rühren lysiert, weitere 30 min unter isotonischen Ionenbedingungen extrahiert und die isotonisch extrahierbaren Retinaproteine durch zweimalige Zentrifugation (jeweils 30 min) bei ca. 50.000 g gewonnen. Der Retinaextrakt wurde mit gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung pH 7.2 auf 25 % Sättigung gebracht und nach drei Stunden bei 50.000 g zentrifugiert. Das Aussalzungspellet wurde verworfen, der Überstand bei 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung über Nacht gerührt, die ausgesalzten Proteine 15 min bei 50.000 g abzentrifugiert und das Pellet in 10 mM $\text{Na}_2\text{K-PO}_4$ pH 7.6 homogenisiert. Das Homogenisat wurde 60 min bei ca. 130.000 g zentrifugiert und der klarzentrifugierte Überstand auf einer äquilibrierten (20 mM $\text{Na}_2\text{K-PO}_4$ pH 7.6, 0.02 % NaN_3) Gelfiltrationssäule (Ultrogel AcA 44, LKB) chromatographiert. Die Fraktionen, die dem Molekulargewichtsbereich 42 bis 70 KDalton entsprachen, wurden vereinigt, auf eine vorher äquilibrierte (10 mM $\text{Na}_2\text{K-PO}_4$ pH 7.6) Hydroxyapatit-Adsorptionssäule (HA-Ultrogel, LKB) aufgetragen und stufenweise mit 10, 50 und 100 mM $\text{Na}_2\text{K-PO}_4$ pH 7.6 eluiert. Der nach 100 mM $\text{Na}_2\text{K-PO}_4$ -Gabe eluierte Arrestinpeak wurde vereinigt, gegen 10 mM NaCl, 2 mM Hepes pH 7.0, 0.05 mM EGTA dialysiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Reinigung nach Wilden et al. (54) beruht auf der lichtabhängigen Bindung von Arrestin an belichtetes und phosphoryliertes Rhodopsin. Die Arrestinhaltigen Membranpellets wurden in 300 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ resuspendiert, so daß nach Lyophyllisation der Arrestinhaltigen-Endüberstände salzfreie Proteinpräparationen vorlagen. Diese Reinigung wurde von Frau Derichs durchgeführt.

2.2.2 Reinigung durch FPLC-Anionenaustauschchromatographie

Bezugnehmend auf Zigler et al. (55) wurde Arrestin mittels einer LKB-High-Pressure-Liquid-Chromatography-Anlage über eine Anionenaustauscher-Säule weiter aufgereinigt. Dazu wurde eine FPLC-Mono Q HR 5/5-Säule von Pharmacia verwendet. Die Mono Q Säule wurde vor dem Probenauftrag nacheinander mit 10 mM Tris-HCl pH 8.6 (5 ml), 10 mM Tris-HCl pH 8.6 + 500 mM NaCl pH 8.6 (10 ml) und zum Schluß 10 mM Tris-HCl pH 8.6 (5 ml) äquilibriert.

Roh-gereinigtes Arrestin (bis zu drei Milligramm/Trennung) wurde in der Regel in 10 mM Tris-HCl pH 8.6 auf die Säule aufgetragen.

Zuvor wurden die Arrestin-Aliquots zur Abtrennung von eventuell unlöslichem Material 15 min bei 300.000 g zentrifugiert und anschließend durch MILLEX-GV-Filter (Millipore; 0.22 µm Porenweite) filtriert. Das Filtrat wurde isokratisch (0.5 ml/min) aufgetragen und die aufgetragenen Proteine anschließend mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 500 mM NaCl in 10 mM Tris-HCl pH 8.6 bei einer Salzkonzentrationsänderung von 17.24 mM pro ml Gradientenvolumen eluiert.

Die Fraktionen des jeweiligen Arrestin-Vor- bzw. -Hauptpeaks wurden entweder vereinigt und gegen 10 mM NaCl, 2 mM Hepes pH 7.0, 0.05 mM EGTA über Nacht dialysiert oder nach Fragestellung einzeln verwendet.

Die Präparation von salzfreien Arrestin-FPLC-Präparationen erfolgte mit $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ als Puffer und Eluenten.

Die Säule wurde mit 20 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ pH 7.95 (5 ml), 600 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ pH 7.95 (10 ml) und zuletzt 20 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ pH 7.95 (10 ml) äquilibriert. Die Proteine wurden mit einem linearen 20 bis 600 mM $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Gradienten eluiert; die Konzentrationsänderung des Eluenten betrug 29 mM pro ml Gradientenvolumen. Die Arrestin-Vor- bzw. -Hauptpeak-Fraktionen wurden vereinigt, durch Centricon-30 Mikrokonzentratoren (Amicon) konzentriert und das Proteinretentat dreimal mit je 1 ml bidestilliertem H_2O gewaschen. Die lyophilisierten Retentate wurden bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Reinigung durch FPLC-Chromatofokussierung

Um unterschiedlich geladene Arrestin-Subspezies voneinander zu trennen, wurde Arrestin einer FPLC-Chromatofokussierung unterworfen. Das Trennprinzip einer Chromatofokussierung besteht darin, daß Proteine, die an die Säulenmatrix gebunden haben, in einem pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt werden. Verwendet wurde eine Mono P HR 5/20-Säule (Pharmacia), ein schwacher Anionenaustauscher, dessen Matrix mit tertiären und quartären Aminen substituiert ist.

Die Trennung erfolgte in einem pH-Intervall von pH 7 bis 5.

Die Mono P-Säule wurde 30 min mit Startpuffer (25 mM bis(2-Hydroxyethyl)iminotris(Hydroxymethyl)methane/HCl, pH 7.1) äquilibriert; lyophilisiertes roh-gereinigtes Arrestin wurde in Startpuffer gelöst und analog zur FPLC-Anionenaustauschchromatographie zentrifugiert und filtriert. Die Proteine wurden eluiert mit 64 ml 1 : 10 verdünntem Polybuffer 74, pH 5.0 in H_2O ; der pH wurde mit HCl eingestellt.

Die Entwicklung des pH-Gradienten wurde überprüft durch pH-Messungen ausgewählter Fraktionen. Falls erforderlich, wurden Fraktionen vereinigt, konzentriert (Centri-con-30), die Proteinkonzentrate mehrmals mit H_2O gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3 Isoelektrische Fokussierung von Arrestin

Als analytische Nachweismethode für ladungsbedingte Heterogenität des Arrestins wurde die isoelektrische Fokussierung (IEF) in Polyacrylamidgelen angewandt. Die IEF erfolgte fast immer in vertikalen Plattengelen (135 x 170 x 1.5 mm), in einigen Versuchen auch in Rundgelen (115 mm, Ø 5 mm).

Um bei IEF-Rundgelen eine gute Wandhaftung der Gellösung an der inneren Glasoberfläche zu erreichen, wurden zuvor die Glasröhrchen nacheinander mit Chromschwefelsäure, H_2O , gesättigter KOH in Ethanol, H_2O , konzentrierter Essigsäure, H_2O , Ethanol gereinigt. Die Polyacrylamidkonzentration der IEF-Gele betrug (meistens) 5.5/0.29 % aus einer filtrierten, bei $-20^{\circ}C$ gelagerten Stammlösung von 30/1.6 % (w/v) Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (Serva). Die Gele enthielten 5 % (v/v) Ampholine (40 % w/v; LKB) aus 4 % Ampholine des pH-Bereichs 5 - 7 und 1 % Ampholine des pH-Bereichs 3.5 - 10. Manchmal wurde den Gelen 0.5-1 % Detergens (Nonidet P-40, Sigma; n-Octylglucosid, Boehringer Mannheim) zugesetzt.

Die Elektrodenlösungen waren 20 mM NaOH (kathodal) und 50 mM H_3PO_4 (anodal). Die Fokussierleistung betrug in der Regel 2400 Voltstunden.

Die Proben wurden nach einstündiger Präfokussierung in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 - 7.5, 2 % (v/v) Ampholine pH-Bereich 3.5 - 10, 30 % (w/v) Saccharose aufgetragen. Sie

waren überschichtet mit 33 mM Tris-HCl pH 7.4, 1.32 % (v/v) Ampholine 3.5 - 10, 20 % (w/v) Saccharose. Die IEF erfolgte meistens bei ca. 15° C unter Verwendung vorgekühlter Elektrodenlösungen.

Um die isoelektrischen Punkte (pI) der Arrestin-Hauptbanden zu bestimmen, wurden benachbarte, native Gelstreifen in 5 mm lange Gelstücke geschnitten, die Ampholine über Nacht in 10 mM KCl eluiert und anschließend das pH-Profil aufgenommen. Die pH-Gradienten der IEF-Gele wurden nicht in jedem Fokussierexperiment parallel bestimmt, sondern bei ca. jedem dritten Versuch. Die pH-Profile ergaben für die drei Arrestin-Hauptbanden isoelektrische Punkte von pH 5.75 - 5.80 (Bande 0), pH 5.85-5.9 (Bande 1) und pH 6.0 - 6.05 (Bande 2). Die pI-Bestimmung hat einen Schwankungsspielraum in der zweiten Dezimale; dies beruht darauf, daß die pH-Gradientenprofile aus Meßwerten rekonstruiert werden, die relativ großen, nämlich 5 mm langen Gelstücken entstammen. Die Verwendung von 2 mm langen Gelstücken würde zwar zweieinhalb mal so viele pH-Meßwerte ergeben, aber auch einen erheblichen Mehraufwand an unproduktiver Meßzeit. Ich begnügte mich deshalb mit 26 - 28 pH-Meßwerten/IEF-Gellänge.

Da eine artifizielle Mikroheterogenität beispielsweise durch Aggregation von Ampholinen an Proteine zustande kommen kann (vgl. (88)), wurden außer LKB-Ampholinen noch andere Träger-Ampholyte eingesetzt: 5 % (v/v) Servalyte aus 4 % Servalyte pH 4-6, 1 % Servalyte pH 3-10 (Serva) und 5 % (v/v) Resolyte pH 4-8 (BDH Chemicals).

Das IEF-Muster von Arrestin war unabhängig davon, welche Ampholine verwandt wurden. Ebenso war es unabhängig davon, ob Arrestin bei Raumtemperatur oder bei 4° C fokussiert wurde. Gegen eine künstliche Heterogenität spricht auch, daß die Anwendung von Detergenz-haltigen IEF-Gelen (z.B. mit NP-40 oder Octylglucosid) das IEF-Muster nicht beeinflusste. Ich erhielt, egal ob Arrestin in Gegenwart von Proteaseinhibitoren bzw. in deren Abwesenheit gereinigt wurde, kongruente IEF Muster. Ebenso wenig bewirkte eine Vorbehandlung von Arrestin mit Reduktionsmittel (75 mM DTT) eine Bandenverschiebung. Die Arrestin-Banden, die in jedem der bisher mehr als 30 IEF-Experimenten auftraten, durch Aggregationsartefakte zu erklären, ist auch deshalb nicht plausibel, da Arrestin in Harnstoff-/Detergenzhaltigen IEF-Gelen ein Mehr-Bandenmuster zeigte.

2.4 Identifizierung von Arrestin durch Immuno- ----- Blotting -----

Gelelektrophoretisch oder isoelektrisch fokussiertes Arrestin wurde durch Diffusions-Western-Blotting identifiziert. Dies beinhaltet den bidirektionalen Transfer von Proteinen aus der Gelmatrix auf Nitrocellulose-Filter, ihre Immobilisierung durch Bindung an die NC-Membran und nachfolgende Identifizierung mittels spezifischer Liganden. Dafür wurden die SDS- bzw. IEF-Gele von beiden Seiten mit je einer PBS-getränkten Nitrocellulose-Membran (BA 85, 0.45 µm, Schleicher & Schüll) bedeckt, auf welche je zwei Lagen PBS-getränkte Whatman 3 - Filterpapiere folgten. Diese Anordnung lag bei Raumtemperatur zwischen zwei Glasplatten und wurde von oben beschwert (500 g). Nach zwei Stunden wurden die NC-Mem-

branen (oder, sofern nur die obere Gelseite mit einer NC-Membran bedeckt war, die top-NC-Membran) vorsichtig abgehoben und entweder bei -20° gelagert oder (in den meisten Versuchen) direkt nachfolgendem Immunostaining unterzogen. Die NC-Filter wurden bei Raumtemperatur dreimal je 10 min mit PBS gewaschen ($4 - 5 \text{ ml/cm}^2$) und dann zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 0.3 % (w/v) Gelatine in PBS bei 37°C 75 min inkubiert; alternativ wurde über Nacht bei 5°C und 30 min bei 37°C abgesättigt. Die NC-Membran wurde mit PBS (10 min, RT) gewaschen und dann mit 5 bis $8 \text{ } \mu\text{g/ml}$ monoklonalem anti-S-Antigen-Antikörper in PBS inkubiert (90 min, 37°C , $2 - 3 \text{ ml/cm}^2$ NC-Membran).

Die NC-Membranen wurden fünfmal gewaschen (PBS, je 5 min, RT) und dann mit einem affinitätsgereinigten spezies-spezifischen, biotinylierten Antikörper inkubiert (sheep-anti-mouse Ig, Amersham; 60 min bei 37°C , $1 : 250 - 300$ verdünnt in PBS + 0.1 % Gelatine, $2 - 3 \text{ ml/cm}^2$). Die Membranen wurden wie oben beschrieben wieder gewaschen und dann mit Biotin-Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplexen (Amersham) inkubiert (60 min bei 37°C , $1 : 400$ verdünnt in PBS + 0.1 % Gelatine, $2 - 3 \text{ ml/cm}^2$). Nach mehrmaligem Waschen mit PBS und 100 mM Tris-HCl pH 7.5 (je 5 min pro Waschschritt) wurde die Substratlösung zugegeben; als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase wurde 4-Chloro-1-naphtol (0.5 mg/ml in 83 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 0.025 - 0.03 % (v/v) H_2O_2) verwandt.

Primäre und sekundäre Antikörperlösung sowie die Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplex-haltige Lösung wurden mehrmals (bis zu dreimal) für die Entwicklung von Nitrocellulose-Blots verwendet. Die Lagerung erfolgte dann bei -80°C .

2.5 Phosphorylierung von Arrestin

2.5.1 Phosphorylierungsversuche mit Protein-Kinase-C haltigen ROS-Proteinextrakten

2.5.1.1 Versuchsprinzip

Das Prinzip dieser Versuche besteht darin, FPLC-gereinigtes Arrestin durch die ROS-endogene Protein-Kinase-C zu phosphorylieren und anschließend die phosphorylierten, löslichen Proteine von den Membranen durch Zentrifugation zu separieren. Die Zentrifugationsüberstände werden dann durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (57) aufgetrennt und phosphorylierte Proteine durch Autoradiographie der getrockneten Gele identifiziert.

2.5.1.2 Die Komponenten der Phosphorylierungsansätze

[γ - ^{32}P]-ATP (5 bis 15 Ci/mMol) wurde von NEN Du Pont bezogen und in Gegenwart von 2 mM EDTA, 20 mM Tricin, 40 mM Ammoniumbicarbonat bei -80°C gelagert. Die radioaktive AT^{32}P -Lösung wurde mit nicht-radioaktiver ATP-Lösung, deren Konzentration vorher spektralphotometrisch bestimmt war (λ_{max} 259 nm), auf eine ausreichende Stammkonzentration eingestellt und in einer Endkonzentration von ca. 100 μM verwendet. Die spezifische Aktivität der AT^{32}P -Gebrauchslösung lag zwischen 700 bis 1000 cpm/pMol; die exakte Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte jeweils, indem Aliquots der AT^{32}P -Lösung entnommen und die Radioaktivität im Flüssig-Szintillationszähler (Tri-Carb 2000 CA, Packard) bestimmt wurde.

Als Substrat für die ROS-Protein-Kinase-C wurden 70 pMole Arrestin, welches über die FPLC-Mono Q-Säule gereinigt war, in einem Phosphorylierungsansatz (0.1 ml) eingesetzt.

Die Konzentration von Arrestin in den Phosphorylierungsproben war $\geq 0.7 \mu\text{M}$. In manchen Proben war die Arrestinkonzentration dann geringfügig größer als $0.7 \mu\text{M}$, wenn mit Protein-Kinase-C haltigen ROS-Extrakten phosphoryliert wurde, die bei schwachem Rotlicht hergestellt waren.

Dies beinhaltet, daß außer den zugegebenen 70 pMolen Arrestin noch das in diesen Dunkel-Extrakten vorhandene Arrestin im Phosphorylierungsansatz vorliegt. Die Menge des Gesamtarrestins erhöht sich damit bei diesen Versuchsansätzen auf (höchstens) 73 bis 74 pMole Arrestin, d.h. auf (höchstens) $0.74 \mu\text{M}$.

Als Quelle für endogene ROS-Protein-Kinase-C wurden die unter 2.1.1.1 beschriebenen ROS-Proteinextrakte verwendet. Es wurde von den Protein-Kinase-C haltigen Standard-Extrakten jeweils soviel eingesetzt, daß die Rhodopsinkonzentration als Angabe für die Konzentration der Extrakte $40 \mu\text{M}$ betrug.

Der stärker konzentrierte ROS-Protein-Kinase-C Extrakt (2.1.1.1 b) wurde in einer Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ Rhodopsin als Angabe für die Extraktkonzentration verwandt.

Als Phospholipid wurden hypotonisch gewaschene ROS-Membranen (cf. 2.1.3) in einer Konzentration von $40 \mu\text{M}$ Rhodopsin verwandt.

Die Phosphorylierungsreaktion erfolgte bei:

100 μM AT^{32}P , ca. 1 mM MgCl_2 , 100-130 mM Salz (NaCl , KCl), 10 mM Hepes pH 7.5, 1 mM DTT und bei einer Ca^{2+} -Überschußkonzentration von 120 - 200 μM durch Zugabe von CaCl_2 . In den Kontrollproben wurde kein CaCl_2 zugegeben.

2.5.1.3 Durchführung der Phosphorylierung

Die Phosphorylierung wurde in Eppendorf-Röhrchen durchgeführt, das Probenvolumen betrug 0.1 ml. Es wurden auf Eis nacheinander bei schwachem Rotlicht Inkubationspuffer (Endkonzentrationen: 120 mM NaCl , 10 mM Hepes pH 7.5, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT), MgCl_2 , CaCl_2 , Arrestin, ROS-Extrakte und Membranen pipettiert, anschließend AT^{32}P zugegeben und die Proben 20 min bei 25° C entweder im Dunkeln oder im Licht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort in Eiswasser gestellt und mit EDTA (5 mM), nicht-radioaktivem ATP (10 mM) und PO_4^{3-} (10 mM) zum Stoppen der Reaktion versehen. Die Ansätze wurden in einer Beckman-Zentrifuge 40 min bei ca. 50.000 g, 4° C zentrifugiert und die Überstände nochmal klarzentrifugiert. Die Überstände (und gegebenenfalls auch die Membranpellets) wurden in SDS-Probenpuffer 20 min bei 40° C denaturiert, die Polypeptide in vertikalen SDS-Gelen (57) aufgetrennt und entweder durch Coomassie- oder Silverstaining angefärbt. Die angefärbten Gele wurden unter Vakuum getrocknet und mehrmals, unterschiedlich lange, autoradiographiert. Zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität wurden die getrockneten Gele hydratisiert, die Proteinbanden ausgeschnitten und die Radioaktivität im Flüssig-Szintillationszähler bestimmt.

2.5.2 Phosphorylierungsversuche mit Protein-Kinase-C ----- aus Hühnerovidukt -----

Roh- bzw. FPLC-gereinigtes Arrestin wurde mit einer partiell gereinigten Protein-Kinase-C (50) in Gegenwart von hypotonisch gewaschenen Membranen oder Phosphatidylserin-Liposomen phosphoryliert; meisten wurden PS-Liposomen eingesetzt.

2.5.2.1 Der rekonstituierte Phosphorylierungsansatz -----

Es wurde meistens mit einer 50 μM AT^{32}P -Lösung phosphoryliert, deren spezifische Aktivität zwischen 600 - 1000 cpm/pmol lag. Wurde eine andere AT^{32}P -Konzentration verwandt (um die Phosphorylierung bezüglich dieses Parameters zu optimieren), so wurde mit ungefähr gleich hoher spezifischer Aktivität gearbeitet.

Die Proben enthielten 50 pMol Arrestin (0.5 μM Endkonzentration), ca. 1.6 pMol Protein-Kinase-C (0.016 μM Endkonzentration) und 5 μg Phosphatidylserin-Liposomen. Wurden statt der Liposomen hypotonisch gewaschene ROS-Membranen verwandt, so betrug deren Rhodopsin-Konzentration 10 μM . Die verwendeten ROS-Membranen waren in Anwesenheit von EGTA gewaschen worden.

Die Phosphorylierung erfolgte unter isotonischen Ionenbedingungen pH 7.4 - 7.5 (cf. 2.5.1.2) in Gegenwart von 5 mM MgCl_2 und einem ca. 100 μM Ca^{2+} -Überschuß aus CaCl_2 .

2.5.2.2 Versuchsdurchführung

Es wurden auf Eis nacheinander Inkubationspuffer (cf. 2.5.1.2), MgCl_2 , CaCl_2 , Arrestin, Protein-Kinase-C, Liposomen und zuletzt AT^{32}P in Eppendorf-Röhrchen pipettiert und diese dann im Wasserbad 15 min bei 30°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumlicht.

Wurde in Anwesenheit von ROS-Membranen phosphoryliert, so erfolgte deren Zugabe und die des AT^{32}P 's bei schwachem Rotlicht; die Eppendorf-Röhrchen wurden in das Wasserbad gesetzt, mit einer orangen Platte abgedeckt und bei Raumlicht inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben in Eiswasser gestellt und abhängig vom jeweiligen Versuch, unterschiedlich weiterverarbeitet. Wurde die Probe durch SDS-Gelelektrophorese und/oder IEF analysiert, so wurden Aliquots der Probe entnommen und in vorgelegten SDS-Probenpuffer bzw. EDTA-haltigen IEF-Probenpuffer (10 mM Endkonzentration EDTA) pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C kurzfristig aufbewahrt.

Alternativ wurden Aliquots von Proben, die keine ROS-Membranen enthielten, mit 1 ml eiskalter Lösung aus 25 % Trichloressigsäure/0.1 mM ATP versetzt und 10 min in Eis präzipitiert. Die Präzipitate wurden dann dreimal gewaschen (mit je 1 ml 25 % TCA/0.5 mM H_3PO_4) und in 1 ml NCS-Szintillationscocktail solubilisiert. Die TCA-gefällte Radioaktivität wurde im Flüssig-Szintillationszähler bestimmt.

2.6 Phosphatanalyse

Um das Ausmaß einer Arrestin-Vorosphorylierung zu bestimmen, wurde ein chemischer Phosphattest (P_i -Test) angewandt, mittels dessen der Phosphatgehalt eines Proteins ermittelt wird. Das Prinzip der Phosphatmessung nach Buss und Stull (56) besteht darin, zuerst Protein-gebundenes Phosphat durch Veraschung in anorganisches Phosphat zu überführen. Dieses kann als Phosphomolybdat-Komplex unter Farbverstärkung mit Malachitgrün photometrisch bestimmt werden. Die Erfassungsgrenze dieses Testes liegt bei etwa 0.2 nmol Phosphat.

Erforderliche Lösungen:

- 1) anorganischer Phosphatstandard zur Erstellung der Eichkurve (1 M H_3PO_4)
- 2) 10 % (w/v) $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ in 4 N HCl (Ammonium-heptamolybdat-Lösung)
- 3) 0.2 % (w/v) Malachitgrün in H_2O
- 4) Phosphattestreagenz: dafür wird 1 Volumen der Ammoniummolybdat-Lösung mit 3 Volumina der Malachitgrün-Lösung gemischt, 30 min gerührt und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. Bevor Filter und Gefäße verwandt wurden, wurden sie mehrmals mit 6 N HCl gespült und unter dem Abzug trocken gefönt (56).
- 5) Veraschungsreagenz: 10 % (w/v) $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ in 95 % Ethanol.
- 6) 1.2, 4 und 6 N HCl

Zur Entfernung von nicht kovalent gebundenem Phosphat wurden die Proben (zwischen 1.2 und 3 nMol Protein/Probe) mit gleichem Volumen eiskalter 20 % Trichlor-essigsäure (Endkonzentration 10 %) versetzt, 10 min auf Eis präzipitiert und anschließend 3-4 min bei 4 000 rpm

zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 50 μ l eiskalter 0.1 N NaOH aufgelöst, sofort neutralisiert und dieser Präzipitationszyklus zweimal wiederholt. Die neutralisierten Endpräzipitate wurden entweder bei -20° C kurzfristig aufbewahrt oder direkt verascht.

Die Veraschung der Proteine erfolgte in Duran-Reagenzgläsern, die zuvor mit 6 N HCl zweimal ausgekocht und anschließend mehrmals mit H_2O gespült wurden. Die veraschten Proben wurden, nachdem sie abgekühlt waren, in 0.45 ml 1.2 N HCl aufgenommen. Sobald der weiße Aschenrückstand gelöst war, wurde 0.15 ml Phosphattestreagenz dazugegeben und nach 10 min die Lösung bei 660 nm photometrisch bestimmt. Für die photometrischen Bestimmungen wurden mit 6 N HCl ausgespülte Quarzküvetten verwendet, die ausschließlich für Phosphattests benutzt wurden.

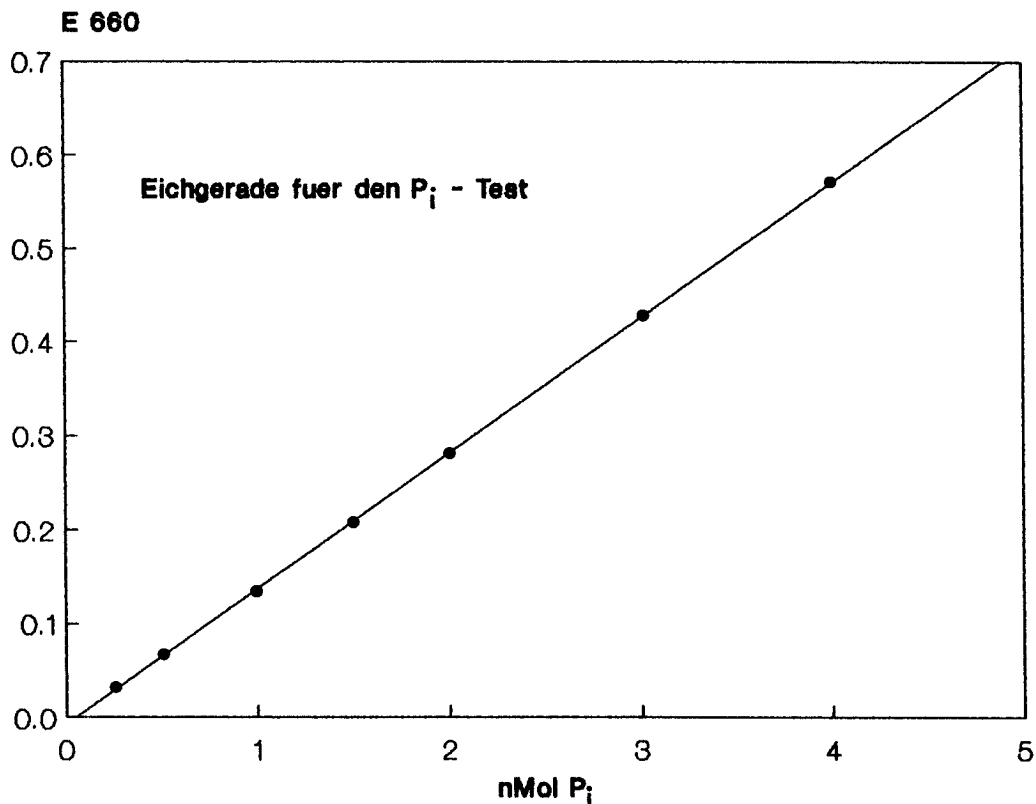


Abb. 1: Eichgerade für den P_i -Test
 Als Phosphatstandard wurde eine entsprechend verdünnte 1 M H_3PO_4 Eichlösung (Merck) verwendet.

Eine Eichgerade wurde mit 0.25 - 4 nmol anorganischem Phosphat/Probe erstellt (Abb. 1). Es wurden jeweils 3 Bestimmungen/Meßwert durchgeführt und der Mittelwert um den gemittelten Blindwert korrigiert. In den Phosphat-testen wurden immer die direkt entsprechenden Blindwerte der gleichen Vorbehandlungs- bzw. Veraschungsprozedur unterzogen. Der gemittelte Blindwert wurde von den Probenmeßwerten subtrahiert.

	Einzelmeßwerte der Blindproben (E ₆₆₀)	Mittelwert ± SDM
bei:		
Eichkurve	0.05, 0.049, 0.0495	0.0495 ± 0.0005 (± 1%)
FPLC-Hauptpeak Arrestin	0.065, 0.0595, 0.055	0.0598 ± 0.005 (± 8.4%)
säulchenchroma- tographisch ge- reinigtes Arrest- tin	0.024, 0.03, 0.026	0.0267 ± 0.0031 (± 11.6%)
roh-gereinigtes Arrestin nach (54)	0.049, 0.04 0.037, 0.033, 0.034	0.0445 ± 0.0064 (± 14%) 0.0347 ± 0.0021 (± 6.1%)

Buss und Stull (56) geben als typischen Blindwert ca. 0.05 an. Die Blindwerte hängen m.E. sowohl vom Alter des Phosphattestreagens als auch der Blindprobenzusammensetzung (z.B. Puffer) ab.

2.7 Methodischer Anhang

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgten nach Laemmli (57). Für eine densitometrische Auswertung der Gele wurden diese nach (58) angefärbt, ansonsten mit folgender Coomassie-Lösung:

0.2 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blue R 250

50 % (v/v) Ethanol

7 % (v/v) Essigsäure

Entfärbt wurde mit 20 % Ethanol/8 % Essigsäure.

Die Silberfärbung von Gelen wurde nach (89) durchgeführt.

IEF-Gele wurden zuerst mehrere Stunden in 20 % (w/v) Sulfosalicylsäure gewaschen, anschließend mit folgender Lösung angefärbt:

0.05 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blue R 250

25 % (v/v) Isopropanol

20 % (v/v) Sulfosalicylsäure

Entfärbelösung: 20 % Ethanol/8 % Essigsäure

Angefärbte Gele wurden bei 80° C unter Vakuum (Biorad, Gel Slab Dryer) auf Whatman 3 - Papier getrocknet.

Die Autoradiographie von Gelen erfolgte mit Hyperfilm-MP Röntgenfilmen (Amersham), die Exposition in Kodak X-OMATIC Kassetten. Entwicklung und Fixierung der Röntgenfilme wurde mit handelsüblichen Fotochemikalien durchgeführt.

Einige verwendete Puffer:

Na₂K-PO₄-Puffer: 37.8 g Na₂HPO₄ · 2H₂O

(0.5 L, 500 mM) 5.1 g KH₂PO₄ mit KOH auf pH 7.6

PBS-Puffer (1 L): 8 g NaCl

0.2 g KCl

1.15 g Na₂HPO₄ · 2H₂O

0.2 g KH₂PO₄

NCS-Szintillationscocktail (2.5 L):

187.5 mg POPOP

15 g PPO

90 % (v/v) Toluol

10 % (v/v) NCS-Tissue-Solubilizer
(Amersham)

Proteinbestimmungen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, nach Bradford (59) mit Bio-Rad Protein-Reagenz. Als Standard diente Rinder-Serumalbumin (Bio-Rad).

3. Ergebnisse

3.1 Reinigung von Arrestin

Um eindeutige Aussagen zu einer physiko-chemischen und funktionellen Charakterisierung eines Proteins machen zu können, ist seine Reinigung erforderlich. Das gereinigte Protein kann dann z.B. durch IEF charakterisiert (54) oder in Funktionstests eingesetzt werden (45).

3.1.1 Roh-Reinigung

Arrestin wurde nach der Methode von Dorey et al. (53) roh-gereinigt. Die bei 50 %iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung ausgefällten cytoplasmatischen Retinaproteine wurden zuerst nach Molekulargewicht durch eine Ultrogel-Aca 44 Gel-filtrationssäule aufgetrennt (Abb. 2a). Anhand von zuvor erfolgten Eichläufen dieser Säule mit Markerproteinen (BSA: 68 kDa, OVA: 44 kDa, Myoglobin: 17 kDa) wurden die Fraktionen vereinigt, die dem Molekulargewicht nach Arrestin enthalten sollten. Die vereinigten Fraktionen 49 bis 59 wurden auf einer Ultrogel-HA Adsorptionschromatographie-Säule stufenweise eluiert (Abb. 2b).

Der Proteinpeak, der nach 100 mM $\text{Na}_2\text{K-PO}_4$ Gabe eluiert wird, enthält als prädominantes Protein Arrestin (Abb. 2c). Neben Arrestin sind noch wenige, andere Retinaproteine in geringer Menge in der Arrestin-Rohpräparation enthalten. Die densitometrische Auswertung des Coomassie-angefärbten Proteinmusters von SDS-Rundgelen ergab einen Reinheitsgrad von 70 bis 90 % für roh-gereinigtes Arrestin. Vergleichbar reines Arrestin erhält man laut Literatur mit anderen chromatographischen Trennmethoden (z.B. 82, 84).

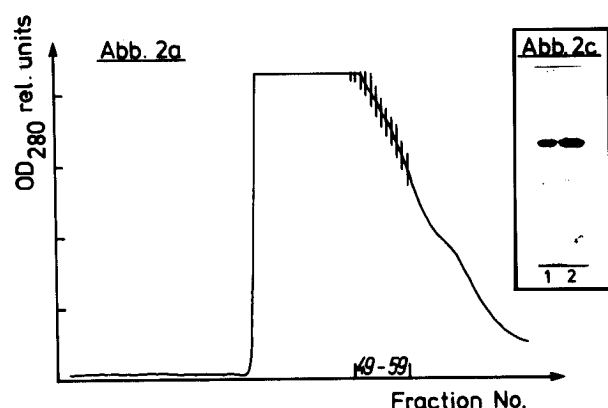


Abb. 2a: Gelfiltrationschromatographie (Ultrogel-Aca 44) von Ammoniumsulfat-gefällten (50 % Sättigung) Retina-proteinen
Gelbett: 2.5 x 67 cm; Eluent: 20 mM $\text{Na}_2\text{K-PO}_4$ pH 7.6, 0.02 % NaN_3 ; Flußrate: 1.5 ml/min. OD = 0.5.
Die Fraktionen 49 - 59 wurden vereinigt und auf eine Adsorptionschromatographie-Säule aufgetragen.

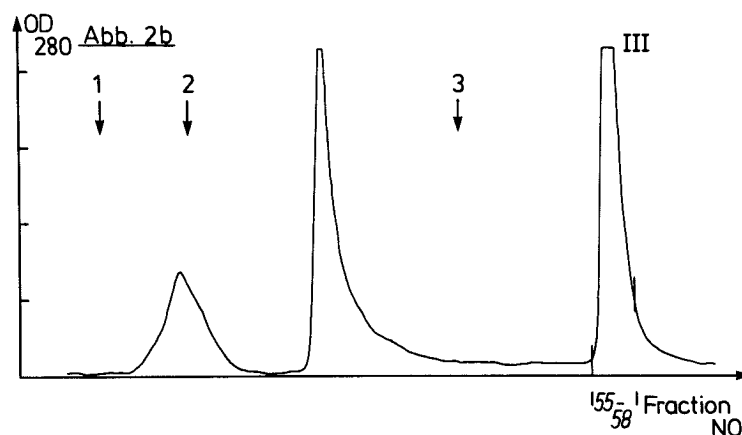


Abb. 2b: Adsorptionschromatographie (Ultrogel-HA) der gepoolten Ultrogel-Aca 44 Fraktionen 49 - 59. Gelbett: 2.5 x 16 cm; die Proteine wurden stufenweise mit 10 mM (1↓), 50 mM (2↓) und 100 mM (3↓) $\text{Na}_2\text{K-PO}_4$ pH 7.6 eluiert. Peak III enthält stark angereichert Arrestin. OD = 1.0.

Abb. 2c: Polypeptidmuster von roh-gereinigtem Arrestin in 10 % SDS-PAGE
Aus dem Arrestinpool (Fraktionen 55 - 58) wurden 3.6 (1) bzw. 7.2 μg (2) Gesamtprotein aufgetragen.

3.1.2 Reinigung mittels Anionenaustauscher-FPLC

Um nahezu reines Arrestin zu erhalten, wurden roh-gereinigte Proteinpräparationen durch eine FPLC-Anionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt. Verwendet wurden Mono Q - Säulen, starke Anionenaustauscher, deren Matrix mit quartären Aminen substituiert ist.

Abb. 3a zeigt ein Elutionsdiagramm, das man erhält, wenn roh-gereinigtes Arrestin über die Mono Q - Säule im NaCl-Gradienten gereinigt wird. Die Hauptmenge des aufgetragenen Proteins wird in zwei Peaks eluiert: in einem Hauptpeak 200 bis 260 mM NaCl und in einem sogenannten Vor-Peak zwischen 160 und 190 mM NaCl. Die Peakmaxima liegen bei ca. 180 mM bzw. ca. 240 mM NaCl. Der Hauptpeak zeigt eine auffällige Asymmetrie. Der Peakanstieg ist weniger steil als der Peakabfall und enthält die Ansätze zweier Schultern. Da roh-gereinigte Arrestinpräparationen als dominantes Protein Arrestin enthalten, stellte sich die Frage, ob eventuell die Hauptpeak-Asymmetrie durch andere Retinaproteine bedingt ist, die ebenfalls im Bereich von 200 bis 260 mM NaCl eluiert werden. Ist dies nicht der Fall, dann sollte die Peakasymmetrie ein Indiz für eine Inhomogenität des mengenmäßig stärksten Proteins (= Arrestin) sein.

Um diese Frage tendenziell abzuklären, wurden FPLC-Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3b).

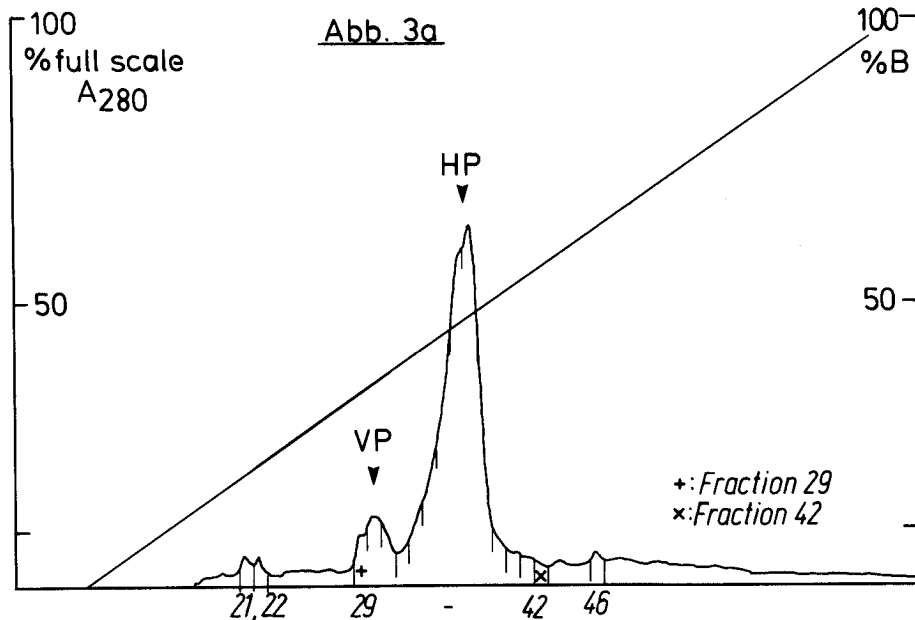


Abb. 3a: Elutionsdiagramm einer FPLC-Mono Q-gereinigten Arrestinpräparation
 Roh-gereinigtes Arrestin (ca. 1.8 mg) wurde isokratisch in 10 mM Tris-HCl pH 8.6 (1 ml/min) aufgetragen und anschließend mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 - 500 mM, 0.5 ml/min) eluiert. Das Proteinmuster der bezifferten Fraktionen ist in Abb. 3b zu sehen. OD = 0.64

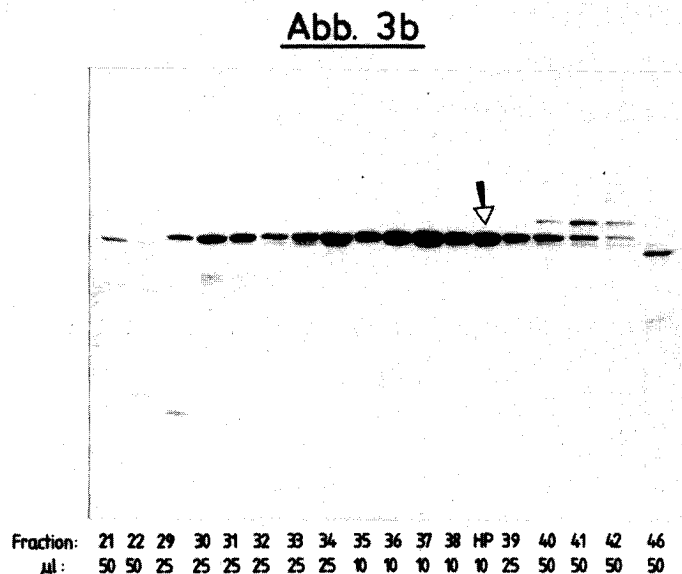


Abb. 3b: Coomassie-angefärbte SDS-PAGE der in Abb. 3a bezifferten FPLC-Fractionen.
 Die eingesetzten Probenvolumina sind angegeben; Probe HP(80486MQ) enthält 3.9 µg Protein. Die Fraktionen 29 bis 42 umfassen die zwischen 160 und 290 mM NaCl eluierten Proteine. (↓Arrestin)

Der Vergleich von roh-gereinigtem (Abb. 2c: 1 , 3.6 µg Protein) und FPLC-gereinigtem Arrestin (Abb. 3b: 3.9 µg Protein) zeigt die Effizienz der FPLC-Reinigung.

Die gelelektrophoretische Analyse der FPLC-Fraktionen erlaubte weiterhin folgende Aussagen. Da der FPLC-Hauptpeak (Abb. 3a) nahezu ausschließlich 48-kDa Polypeptide enthält (cf. Proteinstreifen der Fraktionen 33 - 38), erscheint es plausibel, die beobachtete Peak-Asymmetrie auf zwar molekulargewichtsgleiche, aber möglicherweise ladungsdifferente Arrestine zurückzuführen. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß die FPLC-Vorpeakfraktionen 29 - 31 ebenfalls 48-kDa Polypeptid enthalten. Dies bedeutet, daß Anteile des in einer Roh-Präparation vorliegenden Gesamtarrestins durch geringere - bezogen auf die zur Elution des Hauptpeak-Arrestins notwendigen - Salzkonzentrationen eluiert werden, d.h. weniger stark an die Anionenaustauschermatrix gebunden haben. Dies impliziert, daß die im Vorpeak eluierten Arrestin-Subspezies eine positivere Nettoladung als die im Hauptpeak eluierten haben sollten.

Die Verifikation von Arrestin in Vor- und Hauptpeak erfolgte durch Immunoblotting von SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennten FPLC-Fraktionen (hier nicht gezeigt); dazu wurde ein monoklonaler anti-S-Antigen-Antikörper (S6H8, (52)) verwandt, der in beiden Peaks die Arrestinbande erkannte.

3.2 Nachweis der Ladungsmikroheterogenität von ----- Arrestin -----

3.2.1 Isoelektrische Fokussierung und Immunoblotting -----

Die Annahme ladungsbedingter Arrestin-Subspezies wurde durch die isoelektrische Fokussierung von unterschiedlichen Roh- und FPLC-Präparationen überprüft und nachgewiesen. Im Sinne einer eindeutigen (laborinternen) Terminologie wurden die IEF-Banden von Arrestin mit arabischen Ziffern bezeichnet. Die dominante, d.h. am stärksten angefärbte, Arrestin-Bande wurde mit 0 benannt; die zu dieser Bande kathodal gelegenen mit +1, +2 usw., die anodaleren Banden hingegen mit -1, -2 usw. (cf. Abb. 4a).

In Abb. 4a ist das IEF-Muster von roh- und FPLC-gereinigtem Arrestin zu sehen. Sowohl roh-gereinigtes Arrestin (2 nach (53); 4 nach (54)), als auch die entsprechenden FPLC-Weiterreinigungen (1 , 3) zeigen mehrere Arrestin-Banden. Die IEF-Muster von roh-gereinigtem Arrestin (2, 4) sind unabhängig von der verwandten Präparationsmethode qualitativ identisch; diese Aussage gilt ebenso für den Vergleich von FPLC-gereinigtem Arrestin (1 , 3). Je nachdem ob FPLC-gereinigtes- oder Gesamt-Arrestin fokussiert wird, besteht das IEF-Muster aus 2-4 Haupt- und 5-10 Nebenbanden in einem Bereich von pH 5.5 bis 6.1. Die Arrestin-Nebenbanden, die man im Coomassie angefärbten Gel (Abb. 4a) teilweise nur schwach erkennen kann, sind im korrespondierenden Immunoblot (Abb. 4b) aufgrund der höheren Sensitivität des Detektionssystems gut zu erkennen.

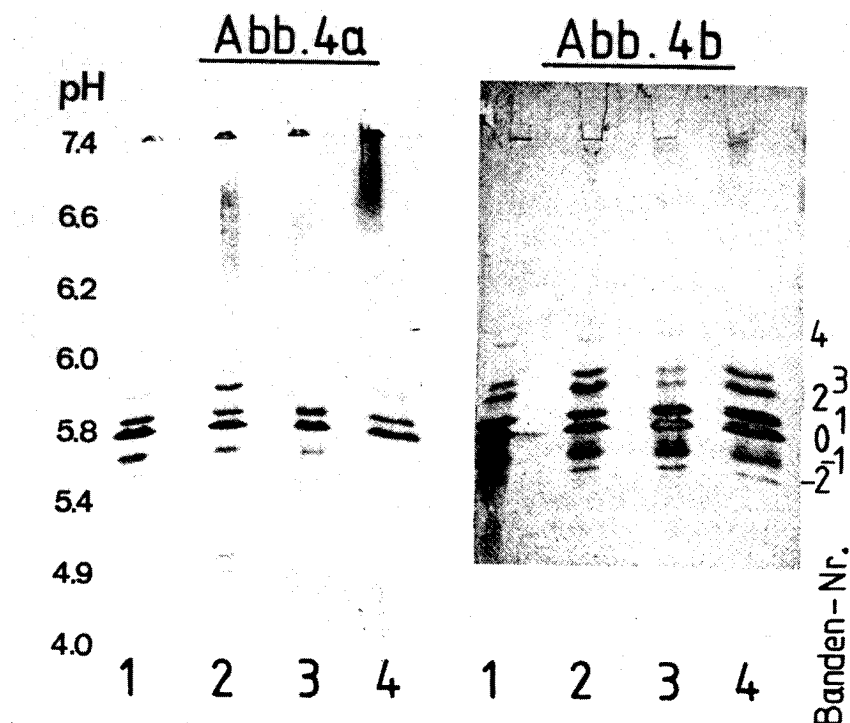


Abb. 4a: Isoelektrisches Fokussiergel mit verschiedenen Arrestinpräparationen (jeweils 10 μ g Protein). Das Coomassie angefärbte Gel zeigt in Spalten 2 und 4 roh-gereinigtes Arrestin; das dazugehörige FPLC-gereinigte Arrestin ist in Spalten 1 und 3 fokussiert (54).

Abb. 4b: Der korrespondierende Immunoblot weist aufgrund der höheren Sensitivität mehr Arrestinbanden auf. Die im Text angeführte Terminologie der Arrestinbanden ist neben dem Immunoblot dargestellt. Die dominante Arrestinbande wurde mit 0 bezeichnet, die dazu kathodaleren resp. anodaleren Banden mit positiven resp. negativen arabischen Ziffern.

3.2.2 Teilweise Trennung der Subspezies durch FPLC- ----- Ionenaustauschchromatographie -----

Es zeigte sich, daß FPLC-Hauptpeak-Arrestin (Abb. 4b, 1, 3) weniger an Banden 2- und Banden 3-Arrestin enthielt als Gesamtarrestin (Abb. 4b, 2, 4).

Die daraus abgeleitete Vermutung, daß im FPLC-Vorpeak präferentiell Banden 2- und Banden 3-Arrestin vorzufinden sei, erwies sich als richtig (Abb. 5). Man sieht, daß die fokussierten Arrestin-Banden aus Vor- und Hauptpeak (2, 3) sich zum IEF-Muster von Gesamt-Arrestin (1) komplettieren. Korreliert mit ihrer Azidität werden also Arrestin-Subspezies auf der FPLC-Mono Q-Säule teilweise voneinander getrennt; dies ist ein wichtiges Argument für eine reale, d.h. nicht durch die IEF artifiziell geschaffene, Mikroheterogenität von Arrestin.

Abb. 5

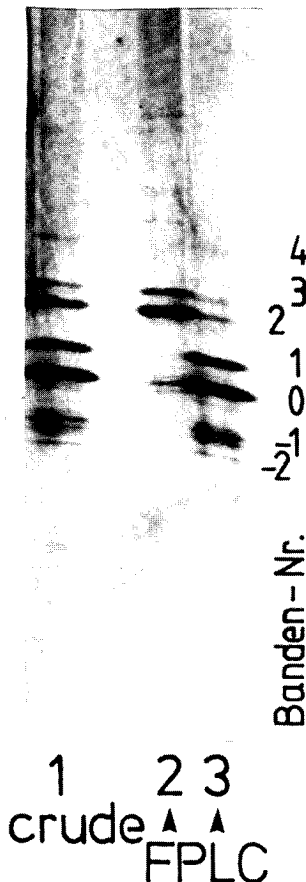


Abb. 5: Silberangefärbtes IEF-Gel mit:

1: 1.2 µg roh-gereinigtes Arrestin

2: weniger als 1 µg FPLC-Vorpeak Arrestin

3: 1.2 µg FPLC-Hauptpeak Arrestin

Man sieht, daß im FPLC-Vorpeak hauptsächlich Banden 2- und Banden 3-Arrestin eluiert wird. Die IEF-Muster der beiden FPLC-Proben komplettieren sich zum IEF-Muster von Gesamtarrestin.

Außerdem sieht man, wenn aufeinanderfolgende Fraktionen eines FPLC-Laufes fokussiert und immunogelottet werden, unterschiedliche IEF-Muster der Fraktionen (Abb. 6). Das heißt, ein fraktionspezifisches Arrestin-Muster wird nicht artifiziell in das komplette Arrestin-Bandenmuster aufgespalten.

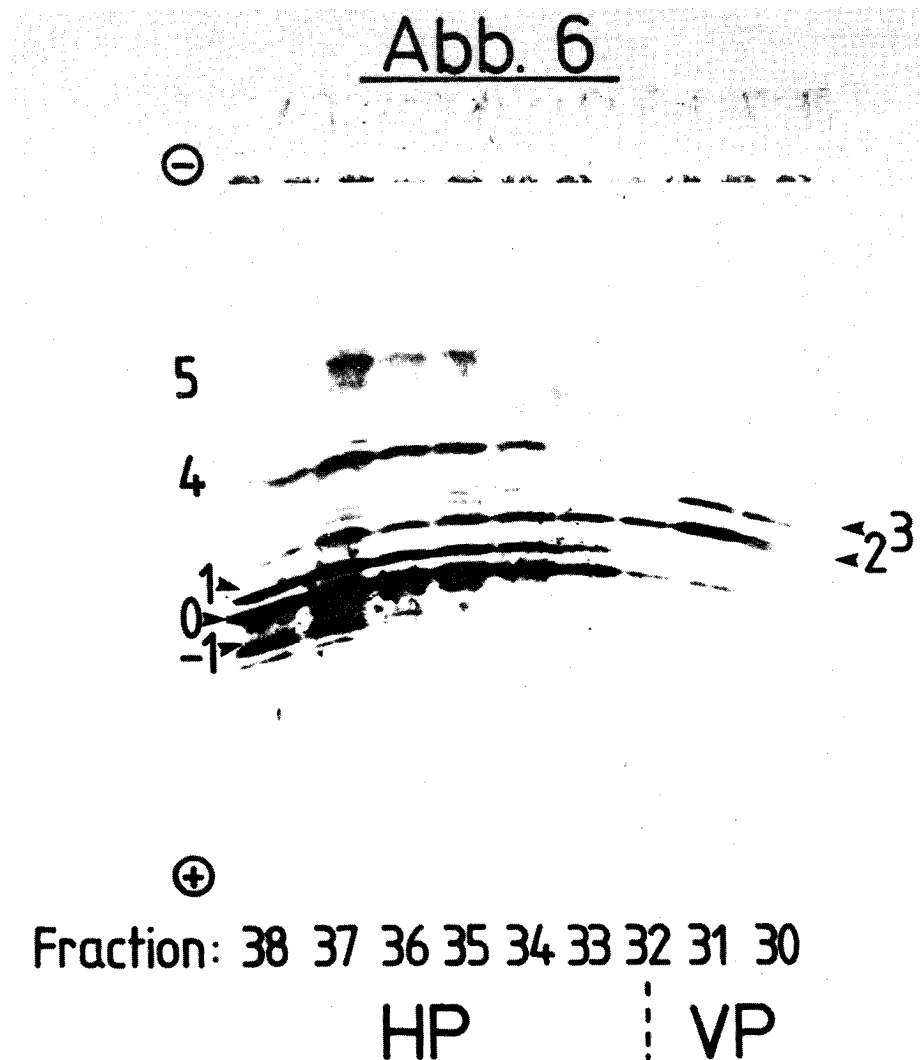


Abb. 6: Immunoblot von isoelektrisch fokussierten FPLC-Fraktionen einer Arrestinpräparation
Aliquots (10-20 µl) der Fraktionen 30-38 der in Abb. 3a gezeigten Mono Q- Arrestinpräparation wurden isoelektrisch fokussiert und Arrestin anschließend mit S6H8 identifiziert. Die Vorpeakfraktionen 30, 31 zeigen hauptsächlich Banden 2- und 3-Arrestin. Der in Abb. 3a gezeigte FPLC-Hauptpeak umfaßt die Fraktionen 32-38. Die Fraktionen 36-38 zeigen zunehmend die anodaleren Arrestinbanden. Man sieht, daß fraktionspezifische IEF-Muster existieren.

3.3 Phosphorylierung von Arrestin

Um die von Zuckerman et al. (65) postulierte ATP-Bindung am 48-kDa Protein zu überprüfen, führte ich auch Phosphorylierungsversuche mit isotonischen Licht- und Dunkel-Proteinextrakten aus Stäbchenaußensegmenten durch. Die Proteinextrakte wurden mit ROS-Membranen, gereinigtem Arrestin, zyklischen Nukleotiden, Ca^{2+} und AT^{32}P in verschiedenen Kombinationen inkubiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert.

Diese Versuche lieferten zwei Ergebnisse:

1. FPLC-gereinigtes Arrestin zeigte keine Autophosphorylierung und
2. Arrestin konnte nur dann phosphoryliert werden, wenn in den Versuchsansätzen belichtete ROS-Membranen und Ca^{2+} zugegen waren (cf. 3.3.1).

Aufgrund dieser Beobachtung wurde postuliert, daß Arrestin ein Substrat der Protein-Kinase C sei.

Zu gleicher Zeit wurde von Kapoor und Chader über eine Protein-Kinase-C Aktivität in Stäbchenaußensegmenten berichtet (61). Sie publizierten, daß mehrere ROS-Proteine phosphorylierbar seien, ohne diese identifiziert zu haben.

3.3.1 Phosphorylierungsversuche mit ROS-Proteinex-

trakten

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß Arrestin phosphoryliert wird, wurden Phosphorylierungsversuche mit Protein-Kinase-C haltigen Proteinextrakten durchgeführt. Da Protein-Kinase-C calciumabhängig an Phospholipide bindet (62), sollte sie mittels EGTA aus homogenisierten

Stäbchenaußensegmenten isotonisch extrahierbar sein. Abb. 7 zeigt die Strategie, nach der Extrakte und Membranen gewonnen wurden. Entsprechende "Kontrollextrakte" und "Kontrollmembranen" wurden in Abwesenheit von EGTA hergestellt; allerdings waren in diesem Fall die Membranen zweimal (statt dreimal) gewaschen worden.

Abb. 7: Schema zur Herstellung der Proteinextrakte und Membranen, die in den Phosphorylierungsversuchen eingesetzt wurden.

L-E1(E): lösliche Proteine (E1-Extrakte) aus belichteten ROS, in Anwesenheit von EGTA extrahiert
 D-E1(E): EGTA-extrahierte lösliche Proteine aus dunkelgehaltenen ROS
 L-E2(E)/ peripher-gebundene Proteine (E2-
 D-E2(E): Extrakt) aus belichteten/dunkelgehaltenen ROS, in Anwesenheit von EGTA extrahiert
 L-MP(E)/ dreimal mit EGTA-haltigem Puffer
 D-MP(E): gewaschene belichtete/dunkelgehaltene ROS-Membranen

P: Pellet; S: Überstand; MIS: Puffer mittlerer Ionenstärke; MIS-(E): dto., EGTA-haltig;
 LIS-(E): EGTA-haltiger Puffer niedriger Ionenstärke.

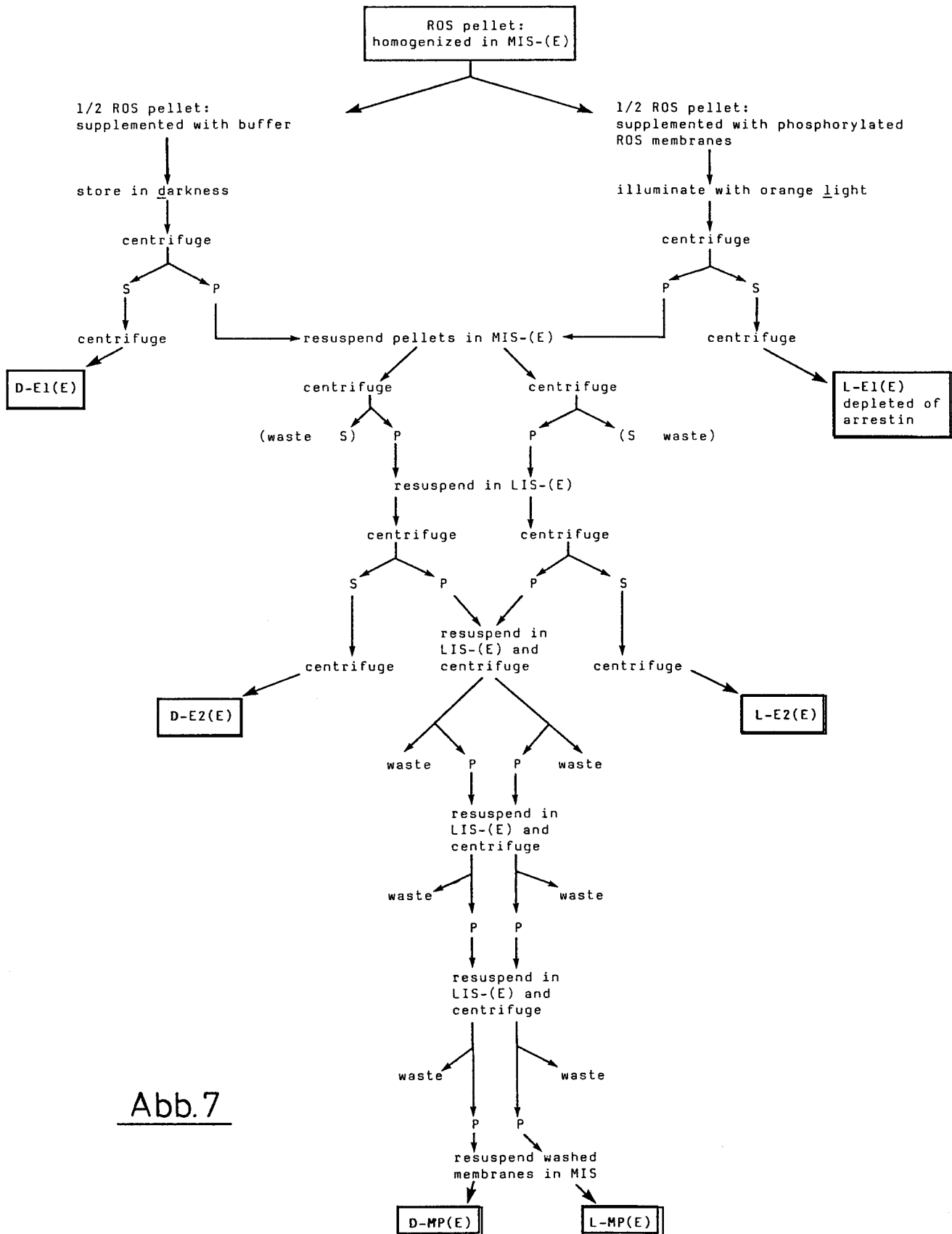


Abb.7

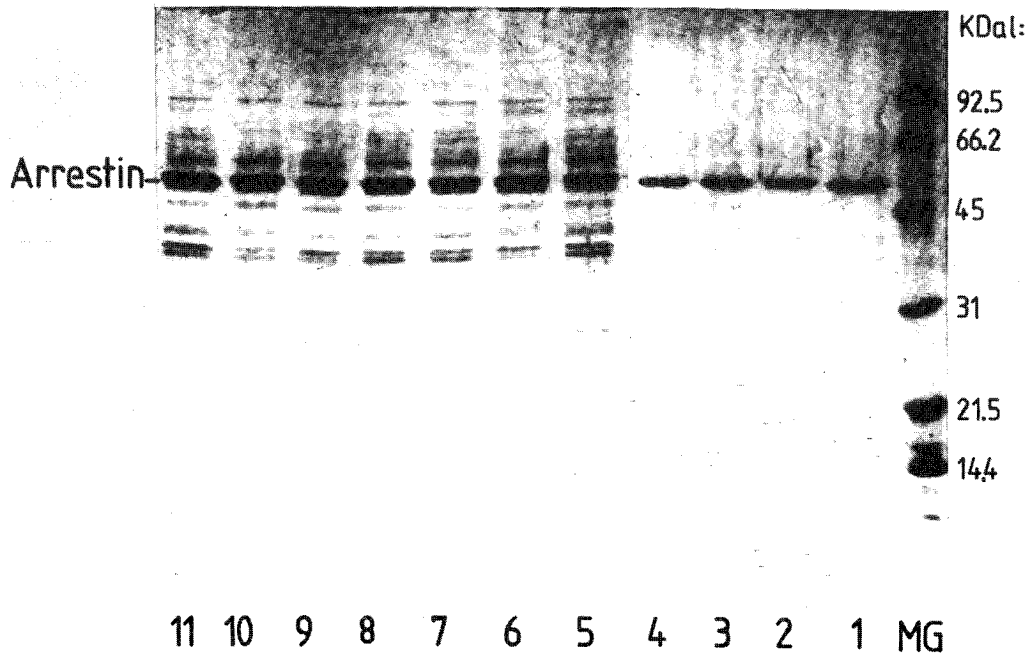
Abb. 8 a

Abb. 8a: Coomassie-angefärbte SDS-Gelelektrophorese von Phosphorylierungsüberständen

Die Proben 1-11 wurden nach der Phosphorylierung zentrifugiert, die Überstände mit SDS-Probenpuffer denaturiert und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Du/Li: Phosphorylierung im Dunkeln bzw. bei Licht. D-MP: dunkelgehaltene ROS-Membranen, ohne EGTA zweimal mit Puffer niedriger Ionenstärke gewaschen. Die Proben enthielten jeweils ca. 3.4 µg Arrestin.

Proben:

MG Molekulargewichtsmarker

- 1 Du: D-MP + Arrestin
- 2 Li: D-MP + Arrestin
- 3 Du: D-MP(E) + Arrestin
- 4 Li: D-MP(E) + Arrestin
- 5 Li: D-MP(E) + Arrestin + D-E1(E) - Ca^{2+}
- 6 Li: D-MP(E) + Arrestin + L-E1(E)
- 7 Li: D-MP(E) + Arrestin + D-E1(E)
- 8 Du: D-MP(E) + Arrestin + D-E1(E)
- 9 Li: D-MP(E) + Arrestin + D-E1
- 10 Du: D-MP(E) + Arrestin + D-E1
- 11 Li: Arrestin + D-E1(E)

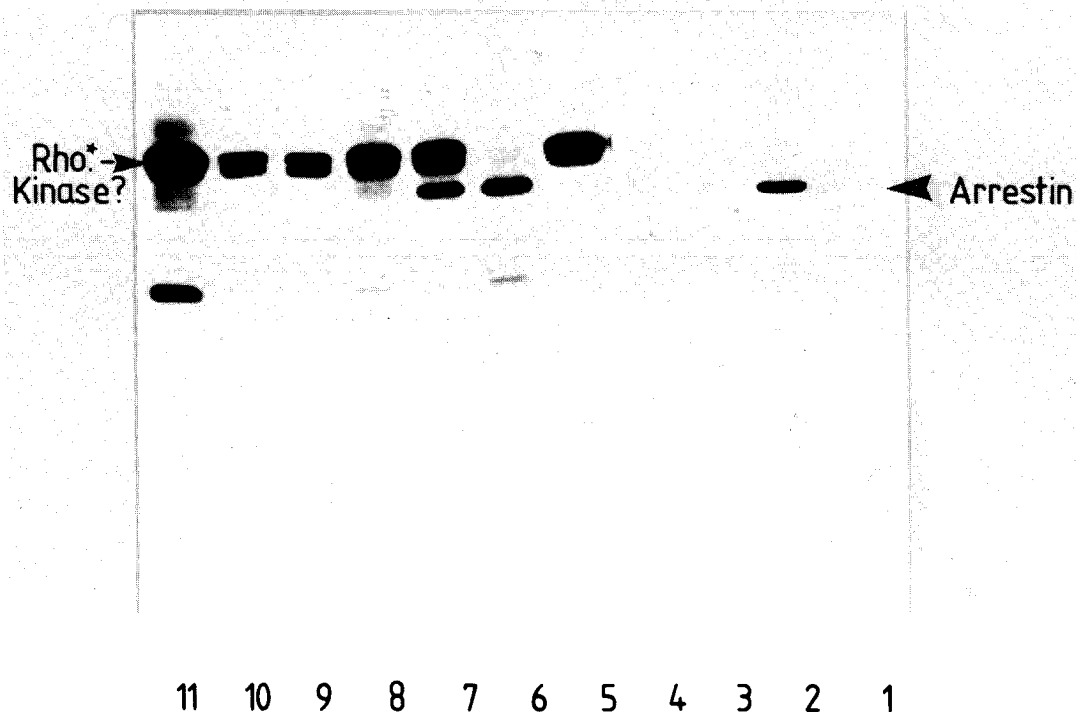
Abb. 8b

Abb. 8b: Autoradiographie der in Abb. 8a gezeigten Phosphorylierungsüberstände

	$\mu\text{M Ca}^{2+}$	$\mu\text{M EGTA}$	$\mu\text{M EDTA}$
1 Du: D-MP + Arrestin	290	5	86
2 Li: D-MP + Arrestin	290	5	86
3 Du: D-MP(E) + Arrestin	290	5	86
4 Li: D-MP(E) + Arrestin	290	5	86
5 Li: D-MP(E) + Arrestin + D-E1(E)	-	338	86
6 Li: D-MP(E) + Arrestin + L-E1(E)	570	283	86
7 Li: D-MP(E) + Arrestin + D-E1(E)	620	338	86
8 Du: D-MP(E) + Arrestin + D-E1(E)	620	338	86
9 Li: D-MP(E) + Arrestin + D-E1	290	5	86
10 Du: D-MP(E) + Arrestin + D-E1	290	5	86
11 Li: Arrestin + D-E1(E)	620	338	86

Die Banden oberhalb von Arrestin entsprechen m.E. der auto-phosphorylierten Rhodopsin-Kinase (78). Dafür sprechen 1. das Molekulargewicht dieser Banden, nämlich 67-70 kDa, und 2. ihre Abwesenheit im EGTA extrahierten isotonischen Licht-Extrakt (Probe 6).

Die bei Probe 11 deutliche Bande im Molekulargewichtsbereich von 30-40 kDa hat auf SDS-Gelen ein MG von ca. 36/37 kDa und liegt dicht unterhalb der β -Untereinheit von Transducin.

Das Ergebnis eines wie in 2.5.1 beschriebenen Phosphorylierungsversuchs ist in Abb. 8a, b zu sehen. Da in den meisten Proben Proteine und Membranen gleichzeitig vorlagen, wurden nach der Inkubation die Membranen durch Zentrifugation abgesondert, damit sich das Autoradiographiemuster phosphorylierter Membranen nicht mit dem der löslichen Proteine überlagerte. Die Phosphorylierungsmuster der Membranpellets wurden dann den Autoradiogrammen anderer SDS-Gele entnommen. Abb. 8a zeigt mit SDS-PAGE aufgetrennte Proteinmuster der Überstände.

Die korrespondierende Autoradiographie (Abb. 8b) ließ folgende Aussagen zu:

Wurde Arrestin mit gewaschenen Membranen unter Rotlichtbedingungen ("Du") inkubiert, so sah ich keine Phosphorylierung von Arrestin (1). Das gleiche Mißergebnis wurde auch mit EGTA-gewaschenen Membranen erhalten (3). Wurde Arrestin jedoch mit normal- bzw. EGTA-gewaschenen Membranen gemischt und anschließend bei Licht ("Li") inkubiert, konnte ich mit normal-gewaschenen Membranen eine deutliche, phosphorylierte Arrestinbande sehen (2), hingegen mit EGTA-gewaschenen Membranen nur eine äußerst schwache (4).

Wenn also durch die EGTA-Extraktion eine Proteinkinase von den Membranen in das Cytosol freigesetzt wird, dann sollten die komplementären EGTA-Extrakte Arrestin phosphorylieren können. Die Proben (6), (7), (8) geben darauf eine Antwort. Wird ein mit EGTA extrahierter El-Extrakt zu Arrestin und EGTA-gewaschenen Membranen gegeben und bei Licht inkubiert, dann wird Arrestin phosphoryliert, unabhängig davon, ob dieser El-Extrakt aus belichteten (6) oder dunkelgehaltenen (7) ROS stammt. Die gleiche Probe ergibt bei Dunkelinkubation mehr oder weniger keine phosphorylierte Arrestinbande (8). Die

Verwendung von standardextrahiertem El-Extrakt und EGTA-gewaschenen Membranen hingegen läßt weder nach Dunkel- (10) noch Lichtinkubation (9) eine Phosphorylierung am Arrestin erkennen.

Dies bedeutet, eine Arrestin phosphorylierende Proteinkinase wird mittels EGTA von den Membranen extrahiert. Wenn diese Proteinkinase zur Protein-Kinase-C Familie gehört, müßte die Phosphorylierung Calcium- und Phospholipidabhängig sein. Eine Phosphorylierung von Arrestin kann, wenn kein Ca^{2+} zum Phosphorylierungsansatz zugegeben wird, nicht beobachtet werden (5, vgl. 5 und 7). Die membranfreie Probe (EGTA-El-Extrakt und Arrestin) zeigt, daß für eine bemerkbare Phosphorylierung von Arrestin Membranen notwendig sind (11). Die Annahme, daß Arrestin ein Substrat für Protein-Kinase-C sei, schien richtig.

Auffällig ist, daß Arrestin lichtabhängig phosphoryliert wurde, unabhängig davon, ob die Kinaseaktivität in Form von EGTA-Extrakt zu EGTA-gewaschenen Membranen zugegeben wurde (8 vs. 7), oder ob ich sie in den normal-gewaschenen Membranen anbot (1 vs. 2).

Die Frage, die sich ergab, war die, warum Belichtung für eine Phosphorylierung benötigt wurde. Sollte etwa nur Arrestin, das nach Belichtung an Rhodopsin gebunden hat, phosphorylierbar sein? Die Frage stellte sich nicht nur, weil sie von funktioneller Bedeutung war, sondern auch deshalb, weil der Vergleich von phosphorylierter Arrestinbande mit phosphoryliertem Rhodopsin und autophosphorylierter Rhodopsin-Kinase ein schwaches Phosphorylierungsausmaß für Arrestin nahelegte. Andererseits lagen aber in diesen Versuchen schlechte Phosphorylierungsbedingungen für Rhodopsin vor (cf. (25)), so daß

dementsprechend auch nur wenig Arrestin hätte binden können. Um die Phosphorylierung von Rhodopsin abzuschätzen, wurden den Membranpellets von Phosphorylierungsproben kleine Aliquots entnommen und diese mit SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Anfärben der Gele wurden die Rhodopsinbanden ausgeschnitten, mit je 15 ml NCS-Cocktail versetzt und nach 26 Stunden die Radioaktivität gemessen. Die so erhaltenen pMol $AT^{32}P$ wurden auf das Pelletgesamt volumen hochgerechnet und ergaben für die Proben (6), (7), (8) (Abb. 8) folgende Phosphorylierungsgrade:

- (8) (D-E1(E) + M(E) + Arrestin, dunkel inkubiert): ca. 0.006 Mol Phosphat/Mol Rhodopsin
- (7) (D-E1(E) + M(E) + Arrestin, bei Licht inkubiert): ca. 0.16 Mol Phosphat/Mol Rhodopsin
- (6) (L-E1(E) + M(E) + Arrestin, bei Licht inkubiert): ca. 0.047 Mol Phosphat/Mol Rhodopsin

Man sieht, daß unter den hier noch günstigsten Bedingungen (7) Rhodopsin sehr schwach phosphoryliert ist. Allerdings wurde mit einem molaren Rhodopsin/Arrestin-Verhältnis von 55/1 gearbeitet.

Um gute Bedingungen für eine Bindung von Arrestin an Rhodopsin zu schaffen, wurden hochphosphorylierte, regenerierte ROS-Membranen (PG: > 5) eingesetzt. Damit sollte sich, sofern Bindung von Arrestin an Rhodopsin eine Voraussetzung für seine Phosphorylierung ist (30), eine bessere Phosphorylierung ermöglichen lassen.

Für diese Versuche wurden hochphosphorylierte Membranen dreimal gewaschen, die beiden ersten Waschungen in Anwesenheit von 1 mM EGTA. Es wurden parallel Phosphorylierungsversuche mit hochphosphorylierten und nicht phosphorylierten EGTA-gewaschenen Membranen (D-MP(E)) durchgeführt; die Autoradiogramme der Überstände und

Membranpellets zeigten keine Steigerung der Arrestinphosphorylierung bei Vorlage hochphosphorylierter Membranen. (Da die Autoradiogramme keinen sichtbaren Unterschied bezüglich der Arrestinphosphorylierung aufwiesen, habe ich die Arrestinbanden nicht ausgeschnitten und nicht die Radioaktivität bestimmt. Ich kann deshalb den Ausdruck "keine Steigerung" nicht besser definieren.)

Dieses überraschende Ergebnis veranlaßte, erneut nach der Bedeutung von Licht für eine Arrestinphosphorylierung zu fragen. Eine naheliegende Erklärung war, eine räumliche Annäherung von Substrat und Enzym ermöglicht zu haben. Durch die Bindung an Rhodopsin werden Arrestinmoleküle membrannah lokalisiert, d.h. nahe der Protein-Kinase-C.

Warum konnte dann bei Verwendung hochphosphorylierter Membranen keine Phosphorylierungssteigerung von Arrestin beobachtet werden? Wahrscheinlich, weil noch nicht unter optimalen Phosphorylierungsbedingungen gearbeitet wurde. Ich untersuchte deshalb die Phosphorylierung von Arrestin in einem weniger komplexen System, um bessere Bedingungen zu erarbeiten.

3.3.2 Phosphorylierungsversuche mit teilgereinigter ----- Protein-Kinase-C (PK-C) -----

In diesen Versuchen wurden zunächst ROS-Membranen eingesetzt, die dann durch Phosphatidylserinliposomen ersetzt wurden. Als Enzymquelle wurde eine aufgereinigte Protein-Kinase-C aus Hühnerovidukt (50) verwandt. Ich arbeitete aus zwei Gründen mit dieser Protein-Kinase-C:

1. Zu Beginn dieser Phosphorylierungsversuche war nicht bekannt, daß es nicht nur eine ubiquitäre Protein-Kinase-C, sondern eine Protein-Kinase-C Familie gibt, deren Mitglieder substrat- und gewebespezifisch sein können.

2. Durch die vorliegende teilgereinigte Protein-Kinase-C erübrigte es sich, zuallererst einmal Protein-Kinase-C aus ROS zu reinigen.

Die anfänglichen Versuche wurden unter Phosphorylierungsbedingungen in Anlehnung an Kikkawa (51) durchgeführt. Diese lieferten folgende Ergebnisse:

1. Die verwandte Protein-Kinase-C war auch nach monatelanger Lagerung bei -70° C noch aktiv. Ihre spezifische Aktivität lag zwischen 45 und 63 mU/mg Protein-Kinase-C. Die Berechnungen erfolgten auf der Grundlage einer ca. 23 % reinen PK-C-Präparation mit Histon-III-S als Substrat.
2. Proben, die Arrestin, EGTA-gewaschene Membranen und PK-C enthielten und bei Rotlicht phosphoryliert wurden, zeigten keine phosphorylierte Arrestinbande. Wurde diesen Proben Phosphatidylserin (PS) zugegeben, konnte eine Phosphorylierung von Arrestin beobachtet werden.
3. Erfolgte die Phosphorylierung bei Belichtung, wurde Arrestin auch in Abwesenheit von PS phosphoryliert.

Nachdem sich zeigte, daß Arrestin sowohl in Anwesenheit von Diskmembranen als auch Liposomen phosphoryliert wird, wurden bessere Phosphorylierungsbedingungen mit Phosphatidylserin ausgearbeitet. Es wurde der Einfluß der Konzentrationen von $AT^{32}P$ (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5 mM), $MgCl_2$ (2, 5, 10, 20 mM), $CaCl_2$ (0.05, 0.1, 0.25, 1 mM) sowie der Menge an PS (5, 10, 15, 30 μ g) untersucht. Ich habe nicht alle Kombinationen ausgetestet, da sich bald tendenzielle Aussagen über eine Phosphorylierungssteigerung ergaben.

Zuerst zeigte sich, daß die bisher verwandte CaCl_2 -Konzentration (1 mM) die Phosphorylierung beeinträchtigte; eine bessere Phosphorylierung wurde mit 100 μM Ca^{2+} -Überschuß über EGTA erzielt. Wurde statt 5 mM MgCl_2 2 mM MgCl_2 eingesetzt, dann wurde Arrestin schlechter phosphoryliert. Eine Erhöhung der MgCl_2 -Konzentration auf 10 mM bzw. 20 mM führte zu keiner Phosphorylierungserhöhung. Als wichtig erwies sich die Konzentration von AT^{32}P . AT^{32}P wurde fortan in einer Konzentration von 50 μM verwandt (statt 10 bzw. 20 μM). Eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung mit 100 oder 500 μM AT^{32}P konnte ich nicht beobachten.

Als Standardbedingungen für weitere Phosphorylierungsversuche wurden 100 μM Ca^{2+} , 5 mM Mg^{2+} , 50 μM AT^{32}P und 5 μg PS eingesetzt. Diese ergaben eine Phosphorylierung von ca. 0.1 Mol Phosphat/Mol Arrestin (Abb. 9*).

Dieses Phosphorylierungsmaß erhielt ich sowohl mit säulenchromatographisch gereinigtem Arrestin, als auch mit dem, welches über die lichtabhängige Bindung an Rhodopsin gereinigt worden war. Da dieser niedrige Phosphorylierungsgrad mit roh-gereinigtem Arrestin (also Gesamtarrestin) zustande kam, wurde zunächst FPLC-Hauptpeak- und FPLC-Vorpeak-Arrestin phosphoryliert, um einen Anhaltspunkt über eine unterschiedliche Phosphorylierbarkeit von Arrestin-Banden zu erhalten.

Arrestin, das dem FPLC-Hauptpeak entstammte, wurde unter Standardbedingungen schlechter phosphoryliert (PG von 0.04 - 0.05: 3 Experimente) als Gesamtarrestin. Dem Konzept entsprechend, daß im FPLC-Vorpeak basisches Arrestin enthalten ist, wurde dieses etwas besser phosphoryliert (PG von ca. 0.15: 1 Experiment) als Gesamtarrestin.

Ca ²⁺ : μ M	Mg ²⁺ : mM	AT ³² P : μ M	PS : μ g	Mol AT ³² P/ Mol Arrestin
50	2	50	15	0.038
50	5	20	5	0.073
50	5	20	15	0.04
50	5	50	15	0.068
100	2	20	5	0.038
100	2	50	15	0.042
100	2	100	15	0.034
100	2	500	15	0.040
100	5	20	5	0.059
100	5	20	15	0.026
100	5	20	30	0.042
100	5	50	5	0.09 *
100	5	50	15	0.08
100	5	100	15	0.084
100	5	500	15	0.068
100	5	500	30	0.052
100	10	20	5	0.055
100	10	100	5	0.086
100	10	100	15	0.031
100	20	20	5	0.048
250	5	20	5	0.065
250	5	50	15	0.063
250	10	20	5	0.071

Abb. 9: Phosphorylierungsausmaß von Arrestin in Abhängigkeit von Ca²⁺, Mg²⁺, AT³²P und PS. Angegeben ist der Phosphorylierungsgrad von Arrestin (mol AT³²P/mol Arrestin), der bei den aufgelisteten Bedingungen erreicht wurde. Es wurde jeweils nach SDS-Gelelektrophorese die Arrestinbande ausgeschnitten und die eingebaute Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler gemessen. Der Berechnung zugrunde gelegt wurde ein Reinheitsgrad von ca. 80 % für rohgereinigtes Arrestin. Die gemessenen cpm-Werte wurden mit 1.25 multipliziert und daraus die übertragenen pMole AT³²P berechnet. Ca²⁺-Konzentration bedeutet Überschußkonzentration über der jeweiligen EGTA-Konzentration, die je nach Probe zwischen 81 und 84 μ M lag. Ferner enthielten alle Proben noch 50 μ M EDTA.

3.3.3 Isoelektrische Fokussierung von phosphoryliertem Arrestin

Um zu überprüfen, ob ^{32}P präferentiell in basische Arrestinbanden (d.h. Banden 2- und 3-Arrestin, siehe Abb. 5) inkorporiert wird, wurde Gesamtarrestin unter Standardbedingungen mit PK-C aus Hühnerovidukt phosphoryliert und anschließend isoelektrisch fokussiert. Die IEF-Versuche mit phosphoryliertem Arrestin führten zu keinem positiven Ergebnis, da die protein-gebundene Radioaktivität mehr oder weniger quantitativ in den Probentaschen der Gele vorzufinden war (Abb. 10c: Autoradiographie des IEF-Gels in Abb. 10a). Die Autoradiographie des IEF-Gels zeigt keine fokussierten ^{32}P -markierten Arrestinbanden.

Parallel dazu beobachtete ich, daß sich bei phosphoryliertem und unphosphoryliertem Arrestin unter einfachen Zentrifugationsbedingungen (30 sec, 10.000 rpm) Anteile aus der Lösung abzentrifugieren ließen (Abb. 10b: 3s, 3p: im Überstand (s) verbliebenes bzw. pelletiertes (p) Arrestin aus einer nicht phosphorylierten Probe).

In ^{32}P -phosphorylierten Proben ist der abzentrifugierbare Anteil an Arrestin (Abb. 10b, 5p) höher phosphoryliert als das im Überstand verbliebene (Abb. 10d, Autoradiographie: 5s, 5p; im Überstand verbliebenes (5s) bzw. abpelletiertes (5p) Arrestin). Weitere Versuche mit zweiminütiger Zentrifugation zeigten, daß 60 - 70 % der Arrestin-gebundenen Radioaktivität in ca. 10 % der eingesetzten Arrestinmenge abzentrifugiert wurde. Phosphorylierung scheint eine Aggregation von Arrestin zu begünstigen.

Die abzentrifugierten Arrestinanteile (Abb. 10b, 3p und 5p) ließen sich nicht mehr nativ solubilisieren; im korrespondierenden IEF-Gel sind deshalb keine Arrestinbanden zu sehen (Abb. 10a: 3p und 5p).

Da der phosphorylierte Arrestin-Anteil unlöslich ist, konnte ich diesem keine IEF-Banden zuordnen. Die IEF-Muster des in Lösung verbliebenen Arrestins (ca. 90 % des Gesamtarrestins) sind bei phosphoryliertem (Abb. 10a, 5s) und nicht-phosphoryliertem (Abb. 10a, 3s) Arrestin kongruent; d.h. auch ein Vergleich dieser Muster gibt keinen Hinweis darauf, ob bestimmte Arrestinbanden bevorzugt phosphoryliert werden.

Abb. 10a (IEF)

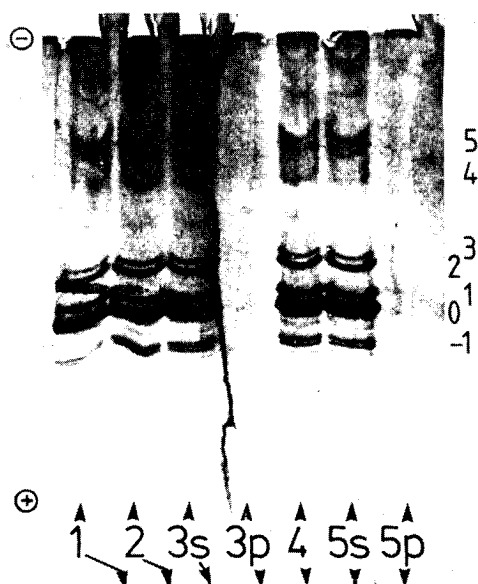


Abb. 10a: Silberangefärbte IEF der in b) gezeigten Proben

Aufgetragen wurde jeweils die nach SDS-PAGE verbliebene Hälfte eines Probenansatzes. Man sieht, daß die abzentrifugierten Arrestinanteile (3p, 5p) nicht solubilisiert und nicht in das Gel hineingewandert sind. Die IEF-Muster der nicht zentrifugierten Proben 2 (unphosphoryliertes Arrestin) und 4 (phosphoryliertes Arrestin) sind kongruent.

b: Silberangefärbte SDS-PAGE von phosphoryliertem und sedimentiertem Arrestin

1-3: Kontrollproben, die unphosphoryliertes Arrestin enthielten (ca. 2.4 µg Protein/slot)

1: nur Arrestin; 2: Phosphorylierungsansatz ohne $AT^{32}P$;

3 s,p: wie 2, nach der Inkubation in Überstand- und Pelletarrestin getrennt (30 sec, 10.000 rpm)

4,5: Proben mit phosphoryliertem Arrestin (ca. 2.4 µg Protein/slot)

4: Proteinmuster des Phosphorylierungsansatzes

5 s, p: wie 4, aber Trennung in Überstand- und Pelletarrestin

Abb. 10b (SDS-Gel)

Arrestin

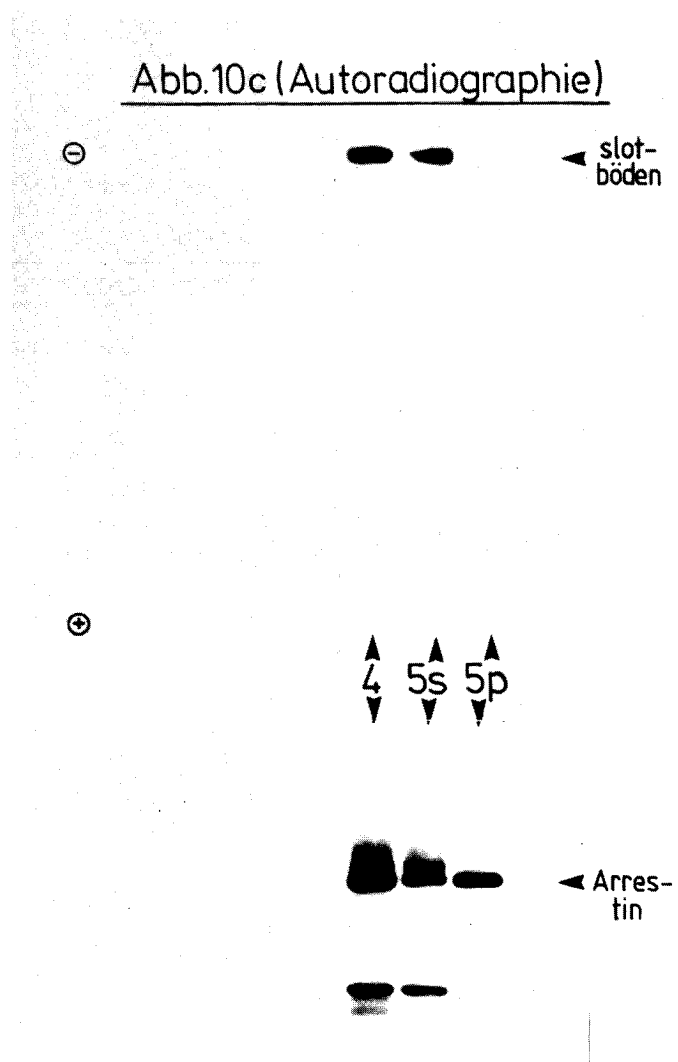


Abb.10d (Autoradiographie)

Autoradiographien des auf Seite 51 gezeigten IEF- und SDS-Gels.

3.4 Phosphatanalyse

Da das erhaltene niedrige Phosphorylierungsausmaß von ca. 0.1 Mol ^{32}P -Phosphat/Mol Gesamtarrestin durch eine Vorphosphorylierung von Arrestin bedingt sein konnte, wurde mit einem Phosphatetest (P_i -Test) untersucht, ob Arrestin-gebundenes Phosphat vorlag. Es wurde der P_i -Gehalt von FPLC- und auch roh-gereinigtem Arrestin nach TCA-Präzipitation bestimmt:

	Mol P_i /Mol Arrestin (Mol Protein) (Einzelwerte)	Mittelwert $\pm$ SDM
FPLC-gereinigtes Arrestin (Hauptpeak)	0.11, 0.16, 0.11	0.13 ± 0.029 ($\pm 22.3\%$)
säulenchromatographisch gereinigtes Arrestin	0.30, 0.25, 0.33	0.29 ± 0.04 ($\pm 13.8\%$)
roh-gereinigtes Arrestin nach (54)	0.14, 0.25, 0.31 *0.20, 0.22, 0.20	0.23 ± 0.086 ($\pm 37.4\%$) 0.21 ± 0.012 ($\pm 5.7\%$)

*Probe (3 nMol Protein) vor der 1. TCA-Präzipitation mit 1 % Octylglucosid inkubiert (5 min bei Raumtemperatur), dann präzipitiert.

Da roh-gereinigtes Arrestin (ca. 90 % rein) neben Arrestin noch andere Proteine in geringer Menge enthält, die phosphoryliert sein können, kann keine Aussage gemacht werden, ob die Mittelwertsunterschiede auf Vorpeak-Arrestin oder andere Proteine zurückzuführen sind. Der E_{660} -Mittelwert der FPLC-Proben betrug 0.0793 ± 0.0058 ($\pm 7.3\%$), der E_{660} -Mittelwert der Blindwerte 0.0598 ± 0.005 ($\pm 8.4\%$). Die Probenmeßwerte liegen m.E. erkennbar über den Blindmeßwerten, aber der Differenz- E_{660} -Mittelwert ergibt ein P_i /Arrestin-Ausmaß, das im Bereich

der Erfassungsgrenze dieses Tests liegt. Ich meine, man kann sagen, 1 Mol Arrestin enthält nicht mehr als ca. 0.1 Mol kovalent gebundenes Phosphat, möglicherweise aber auch weniger. Die substöchiometrische Phosphorylierbarkeit von Arrestin durch $AT^{32}P$ und Protein-Kinase-C kann damit nicht mit einer Vorphosphorylierung erklärt werden.

Das heißt:

1. Arrestin wird von Protein-Kinase-C nur substöchiometrisch phosphoryliert.
2. Die ladungsbedingte Heterogenität von Arrestin kann mit Phosphorylierung nicht erklärt werden. Phosphorylierung als Ursache für Teilheterogenität kann nicht ausgeschlossen werden, da jedes zehnte Arrestin ein proteingebundenes Phosphat enthalten kann.

3.5 Mikroheterogenität von Arrestin in Einzel- ----- retinen -----

Da die Phosphorylierungsversuche die Heterogenität nicht ausreichend erklären konnten, entwickelten sich folgende Fragestellungen:

1. Ist die Heterogenität von Arrestin möglicherweise auch durch Mechanismen, die auf der DNA- oder mRNA-Ebene stattfinden bedingt?
2. Ist die Heterogenität eventuell das Ergebnis zellulärer Alterungsprozesse (63, 64), d.h. nimmt die Komplexität des IEF-Musters mit dem Alter zu?

Als konzeptioneller Ansatz bot sich eine Analyse der IEF-Muster in einzelnen Kälber- und Rinderretinen an, die sowohl Hinweise auf eine ontogenetische Korrelation als auch unterschiedliche Arrestinphänotypen geben sollten.

Das Proteinmuster von 68 isotonischen Einzelretinaextrakten wurde durch IEF aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Isoelektrisch fokussiertes Arrestin wurde dann durch Immunoblotting mit dem monoklonalen anti-S-Antigen-Antikörper S6H8 identifiziert. Die Analyse der IEF-Muster mußte anhand der Immunoblots erfolgen, da im pH-Bereich von ca. 4 - ca. 7.5 neben Arrestin viele andere Retinaproteine fokussieren.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Jedes Individuum zeigt für sich schon eine Vielfalt von Arrestin-Banden. Die beiden Retinen eines Individuums zeigen immer identische IEF-Muster von Arrestin (Abb. 11).
2. Das IEF-Muster von Arrestin aus bisher 14 Kälbern und mindestens 15, höchstens 17 Rindern zeigt keine altersabhängige Zunahme der Heterogenität.
3. Das IEF-Muster von roh- und FPLC-gereinigtem Arrestin setzt sich zusammen aus den unterschiedlichen Heterogenitätsmustern einzelner Individuen. Der mengenmäßige Anteil der ladungsdifferenten Banden im gereinigten Arrestin ist das Ergebnis
 1. ihrer Intensität, d.h. ihrer Menge im individuellen IEF-Muster
 - und
 2. ihrer individuellen Vorkommenshäufigkeit.
4. Die Arrestin-Muster sind bisher in drei IEF-Phänotypen (s. Abb. 11, Muster I, II und III) klassifizierbar, die unterschiedlich oft vorkommen.

Der Immunoblot (Abb. 11) zeigt die drei IEF-Muster, in denen sich Arrestin darstellt. Die dominanten Banden des sog. Standardmusters I (Tiere 1, 3 und 5) sind Banden 0- und Banden 2-Arrestin. Muster II (Tier 4) weist als

Hauptbanden Banden 0-, 1-, 2- und 3-Arrestin auf. In Muster III (Tier 2) dominieren Banden 0-, 2-, 4- und (5)-Arrestin. (Bande 5 wurde eingeklammert, da sie nicht durchgehend bei Muster III auftrat.)

Inwieweit sich die IEF-Muster noch in Arrestin-Nebenbanden unterscheiden, ist schwer zu beurteilen, und wurde von mir bei der Klassifizierung auch vernachlässigt.

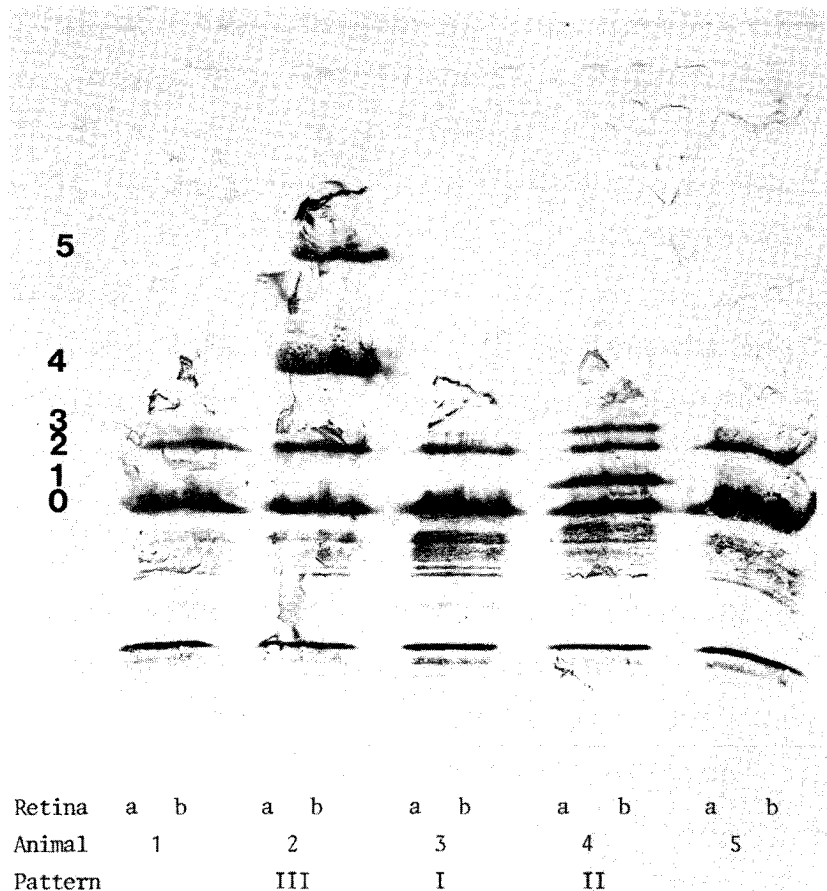


Abb. 11: Immunoblot von Einzelretinaextrakten
Gezeigt ist das IEF-Muster von Arrestin aus 5 Tieren (Tiere 1, 5: Rinderretinen; Tiere 2-4: Kälberretinen). Die beiden Retinen (a, b) eines Tieres zeigen identische IEF-Muster. Fokussiert wurde jeweils 15 µl dunkel-extrahierter Retinenextrakt (entspricht 1.5 % des gesamten Retinaextraktes). Die Identifizierung von Arrestin erfolgte mit S6H8 als primärem Antikörper. Die Arrestin-Hauptbanden der Muster sind.

Banden 0, 2 bei Muster I (Tiere 1,3,5)
Banden 0, 1, 2, 3 bei Muster II (Tier 4)
Banden 0, 2, 4, 5 bei Muster III (Tier 2)

Die Ergebnisse der IEF-Analysen von Einzelretinen sind in folgendem Schema bzw. als Säulendiagramme in Abb. 12 zusammengefaßt. Die Zahlen im Schema besagen nur, wie oft das IEF-Muster bzw. die einzelne Bande vorkommt und sagen damit nichts über die Intensität (= Proteinmenge) der Banden aus. Ich habe die in Prozent umgerechneten Zahlen als prozentuale Häufigkeit (s. Abb. 12) bezeichnet. Beispiel: Abb. 12 zeigt, daß Bande 0-Arrestin 37 % aller identifizierten Banden (= Durchschnitt) ausmacht, d.h. 37 von 100 vorhandenen Arrestinhauptbanden sind Bande 0.

Gesamtzahl Einzelretinen = 68
(aus mindestens 34, höchstens 41 Tieren)

	<u>Kalb</u>			<u>Rind</u>			<u>undefinierte</u> <u>Zuordnung*</u>			<u>Summe +</u> <u>Durchschnitts-</u> <u>werte</u>		
Retinen	27=100	%		31=100	%		10=100	%		68=100	%	
IEF-Muster I	12	44.4 %		25	80.6 %		7	70 %		44	64.7 %	
IEF-Muster II	11	40.7 %		4	12.9 %		3	30 %		18	26.5 %	
IEF-Muster III	4	14.8 %		2	6.5 %		/			6	8.8 %	

Verhältnis von												
Muster I : Muster II												
: Muster III	3 : 2.75 : 1			12.4 : 2 : 1						7.35 : 3 : 1		

Arrestin-Banden												
Bande 0	28	32.6 %		30	41.7 %		10	38.5 %		68	37 %	
Bande 1	12	13.9 %		4	5.5 %		3	11.5 %		19	10.3 %	
Bande 2	28	32.6 %		30	41.7 %		10	38.5 %		68	37 %	
Bande 3	12	13.9 %		4	5.5 %		3	11.5 %		19	10.3 %	
Bande 4	4	4.7 %		2	2.8 %					6	3.2 %	
Bande 5	2	2.3 %		2	2.8 %					4	2.2 %	

Banden 0 - 5	86=100	%		72=100	%		26=100	%		184=100	%	

* undefinierte Zuordnung heißt: die Augen wurden im Schlachthof gesondert entnommen, aber nicht als Kälber- bzw. Rinderaugen kenntlich gemacht.

Man sieht, daß IEF-Muster I (das sog. Standardmuster) am häufigsten vorkommt; ca. 65 % der Fokussiermuster entsprechen im Durchschnitt diesem Typus. 26 - 27 % der isoelektrisch fokussierten Retinaextrakte weisen Muster II und nur mehr 9 % das IEF-Muster III von Arrestin auf. Die drei Muster treten gemittelt über alle untersuchten Einzelretinen in einem Häufigkeitsverhältnis von 7.35 : 3 : 1 auf.

Differenziert man allerdings nach der Herkunft der Retinen, also ob aus Kalb resp. Rind, dann sind deutliche Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit der IEF-Muster zwischen diesen beiden Gruppen feststellbar. Die IEF-Muster I, II, III sind bei Kälbern eher gleichmäßig verteilt, die Muster I und II sogar mehr oder weniger entsprechend. Die Kälber-Retinen zeigen zu ca. 44 % Muster I, zu ca. 41 % Muster II und zu ca. 15 % Muster III. In den Rinder-Retinen hingegen gehören ca. 81 % dem IEF-Muster I an, ca. 13 % Muster II und 6 - 7 % Muster III (cf. Abb. 12).

Arrestin fokussiert also in Rindern überwiegend in Standardmuster I, d.h. in Banden 0- und 2-Arrestin. Das Verhältnis der IEF-Muster zueinander verhält sich bei Kälbern wie 3 : 2.75 : 1, bei Rindern aber wie 12.4 : 2 : 1. Die verhältnismäßige Expression von Arrestin in Muster II und III liegt bei Kälbern und Rindern also durchaus in der gleichen Größenordnung, die in Muster I aber zeigt einen deutlichen Unterschied.

In Abb. 12 sind die prozentualen Häufigkeiten der IEF-Muster I, II, III und der Arrestin-Banden 0 - 5 als Säulendiagramme aufgetragen. Es sind neben den mit Kälber- und Rinderretinen ermittelten Werten (K, R) die

durchschnittlichen Prozentwerte (D) angegeben, die auch die Werte von Retinen undefinierter Zuordnung beinhalten.

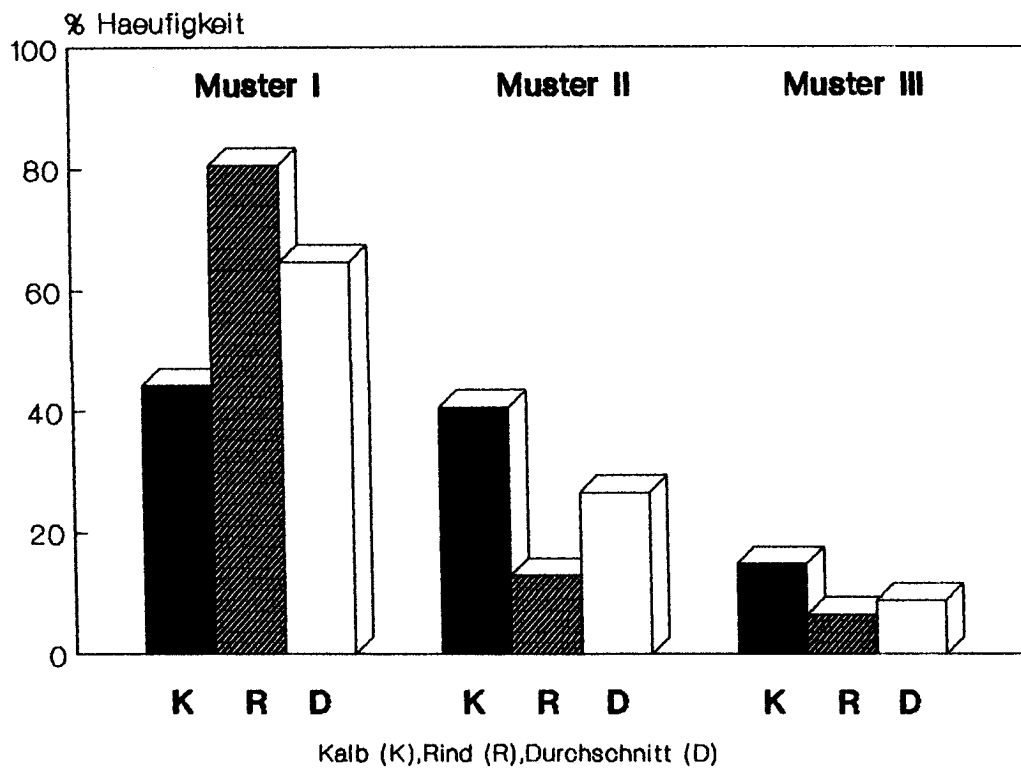
Die durchschnittliche prozentuale Häufigkeit der Arrestin-Banden sagt allerdings nichts über die mengenmäßige Verteilung von Arrestin innerhalb des Bandenmusters aus. Die Intensität der Banden 0 - 5 nimmt, wie gereinigtes Arrestin nach IEF zeigt, in der Reihenfolge 0 bis 5 ab (cf. Abb. 4). Banden 1- und 2-Arrestin zeigen in Coomassie-angefärbten IEF-Gelen mit roh-gereinigtem Arrestin ungefähr gleich starke Banden.

Immer wenn fokussierte Retinaextrakte das IEF-Muster II aufwiesen, war Bande 1-Arrestin sowohl im IEF-Gel als auch im Immunoblot fast so intensiv wie die Arrestinhauptbande 0 angefärbt. Bande 2-Arrestin hingegen liegt in den meisten der untersuchten Retinen in (wesentlich) geringerer Menge als Bande 0-Arrestin vor. (Meine Angabe zur Menge der Banden beruht auf der unterschiedlichen Farbintensität der Banden im Immunoblot.) Damit klärt sich der scheinbare Widerspruch zwischen prozentualer Häufigkeit der Arrestin-Banden und ihrer mengenmäßigen Verteilung im IEF-Gel auf.

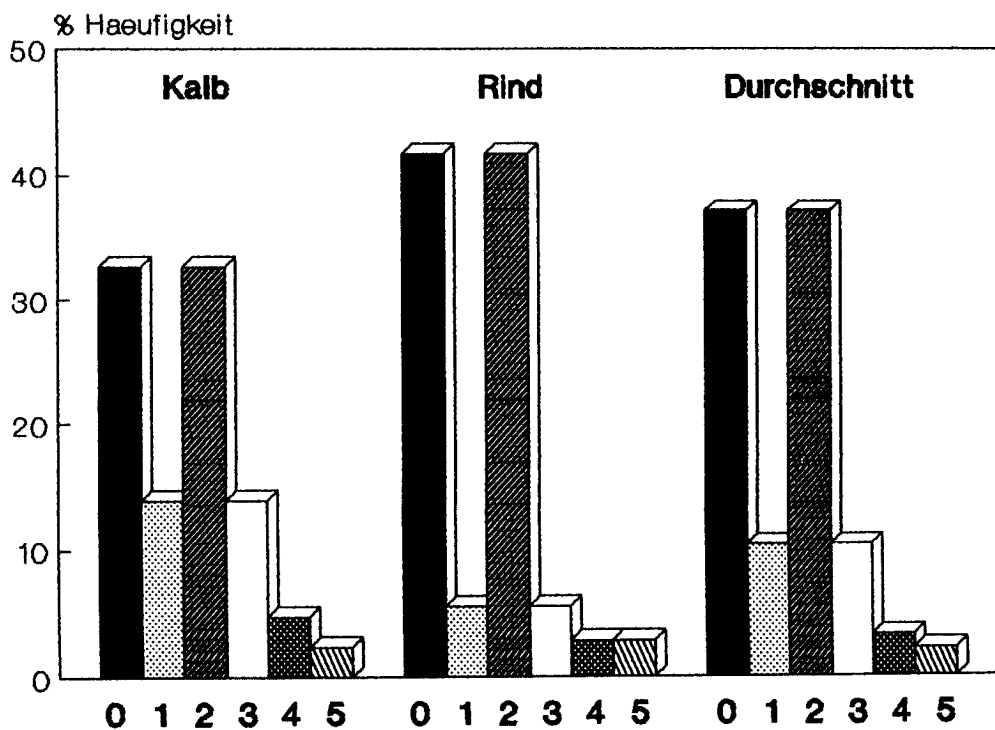
Das Auftreten individueller Fokussiermuster ist im Einklang mit der Möglichkeit, daß die Heterogenität von Arrestin nicht ausschließlich durch posttranslationale Modifikationen verursacht wird. Ist dies der Fall, dann könnte man Unterschiede in der Primärsequenz erwarten. Um die Aminosäurezusammensetzung von Arrestin-Subspezies zu bestimmen, müssen Arrestine präparativ voneinander getrennt vorliegen.

Abb. 12

Prozentuale Häufigkeit der IEF-Muster von Arrestin



Prozentuale Häufigkeit der Arrestinbanden 0 - 5



3.6 Versuche zur Trennung von Arrestin-Subspezies ----- mittels FPLC-Chromatofokussierung -----

Zur Isolierung unterschiedlich geladener Arrestine verwendete ich die FPLC-Chromatofokussierung. Roh-ge-reinigtes Arrestin, das bei pH 7.1 an die Säule band, wurde in einem pH-Intervall von pH 7 - 5 eluiert. Das aufgetragene Arrestin wurde in drei Elutionspeaks wie-dergefunden, und zwar in den pH-Bereichen pH 5.4 - 5.28, 5.1 - 5.07 und 5.06 - 4.95. Arrestin wurde nicht ent-sprechend den pI-Werten seiner Hauptbanden im pH-Bereich von 5.8 - 6.1 eluiert, sondern erst unter niedrigeren pH-Werten, die seine Ablösung von der Säulenmatrix er-möglichten. Das "ungehinderte" Wanderungsverhalten von Arrestin im IEF-Gel bis zu einer Position, an dem seine Nettoladung ± 0 ist, kann sicher nicht mit der "einge-schränkten" Wanderung über einer Säule verglichen wer-den, an die es aufgrund ionaler Bindung und möglicher-weise zusätzlicher Wechselwirkungen reversibel bindet.

Abb. 13a zeigt ein FPLC-Chromatofokussier-Elutions-diagramm mit den Peaks 1, 2 und 3, die Arrestin ent-halten. Das korrespondierende IEF-Gel (Abb. 13b) zeigt die Zugehörigkeit der Arrestinbanden zu diesen Elutions-peaks. Peak 1 enthält Banden 2- und 4-Arrestin, Peak 2 überwiegend Banden 1- und etwas Banden 0-Arrestin, Peak 3 fast ausschließlich Banden 0-Arrestin. Die Arrestin-Subspezies werden entsprechend ihrer Nettoladung nach-einander von der Säule eluiert.

Die Menge an Arrestin, die in den Proteinpeaks wieder-gefunden wird, entspricht, wie auch im Falle der FPLC-Mono-Q Säule, 50 - 60 % der eingesetzten, d.h. auf die Säule aufgegebenen Arrestinmenge. Eine derartige Re-covery wird auch von anderen Autoren nach FPLC-Anionen-austauschchromatographie angegeben (55).

Eine quantitative Trennung der Arrestinbanden voneinander ist zwar noch nicht erfolgt, erscheint aber greifbar. Ich habe zur Gewinnung der Arrestinbanden ja immer mehrere FPLC-Fraktionen gepoolt und anschließend konzentriert. Arrestin aus Peak 1 entstammt den Fraktionen 40-45, Peak 2-Arrestin aus den Fraktionen 60-64 und Arrestin des Peaks 3 aus den Fraktionen 65-72. Es ist offensichtlich, daß durch geeignete Fraktionsauswahl die Arrestin-Banden noch besser voneinander getrennt werden können. Banden 3-Arrestin konnte bisher nicht in den Elutionspeaks in adäquater Menge identifiziert werden, wofür ich keine plausible Erklärung habe.

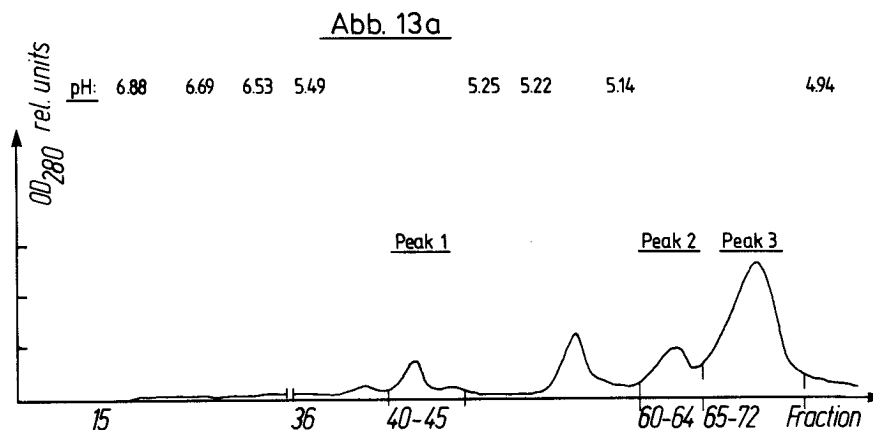


Abb. 13a: Elutionsdiagramm von FPLC-chromatofokussiertem Arrestin

Roh-gereinigtes Arrestin (ca. 0.9 mg) wurde isokratisch in 25 mM bis-Tris/HCl, pH 7.1 aufgetragen und anschließend mit 1 : 10 verdünntem Polybuffer 74 (Pharmacia), pH 5.0 eluiert.

Elutionsvolumen: 64 ml; Flußrate: 0.5 ml/min; OD = 0.32

Die jeweiligen Peakfraktionen wurden vereinigt, mit Centricon-30 konzentriert und die Konzentrate dreimal mit H₂O bidest. gewaschen. Die Proteinbestimmung ergab für

Peak 1 (Fraktionen 40-45): 40 µg Arrestin

Peak 2 (Fraktionen 60-64): 100 µg Arrestin

Peak 3 (Fraktionen 65-72): 340 µg Arrestin

Die vereinigten Fraktionen 52-57 enthielten kein meßbares Protein (Bestimmung nach Bradford).

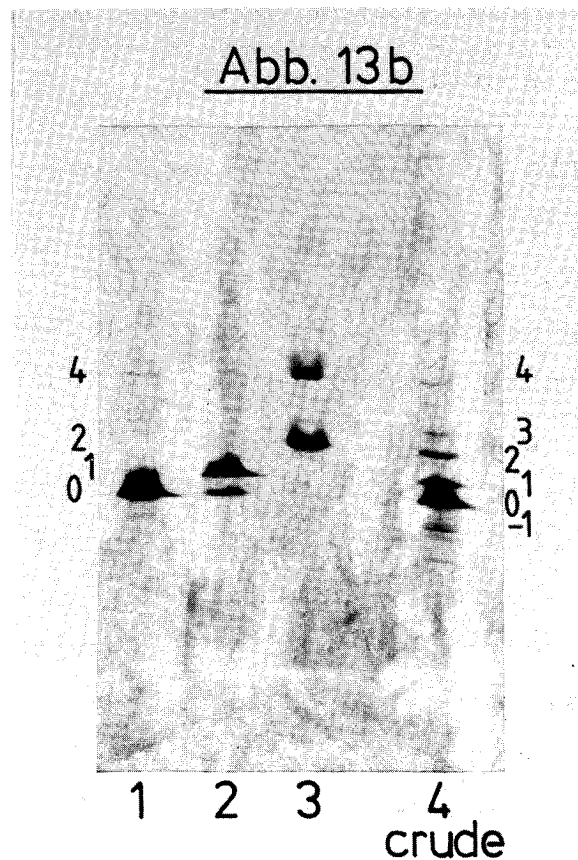


Abb. 13b: Coomassie-angefärbtes IEF-Gel mit FPLC-chromatofokussiertem Arrestin
Es wurden jeweils 20 μ g Protein isoelektrisch fokussiert.

Probe 1: Arrestin aus FPLC-Peak 3 (Abb. 13a)

Probe 2: Arrestin aus Peak 2

Probe 3: Arrestin aus Peak 1

Probe 4: roh-gereinigte Arrestin-Präparation, deren Elutionsdiagramm in Abb. 13a gezeigt ist.

Die fokussierten Arrestinbanden stellen Bande 0 (Probe 1), Banden 0 und 1 (Probe 2), sowie Banden 2 und 4 (Probe 3) dar.

4. Diskussion

4.1 Warum wurden Phosphorylierungsversuche mit ----- Arrestin durchgeführt? -----

Arrestin (48-KDa Protein, S-Antigen) besitzt innerhalb der visuellen Signaltransduktionskette eine Schlüssel-funktion, da durch seine Kompetition mit Transducin am aktivierten, phosphorylierten Rezeptor eine schnelle "Abschaltung" der zellulären Reizantwort ermöglicht wird (43).

Wilden et al. (43) haben gezeigt, daß die Aktivität der cGMP-PDE aus ROS durch Arrestin reguliert wird, unabhängig davon, ob roh- oder FPLC-gereinigtes Arrestin eingesetzt wurde. Roh- bzw. FPLC-Hauptpeak-Arrestin unterscheiden sich in den basischen Banden 2 und 3, die nach FPLC-Mono Q-Reinigung nur mehr in sehr geringer Menge im Hauptpeak-Arrestin (s. Abb. 5) vorliegen. Die mit roh- und FPLC-Hauptpeak-Arrestin durchgeführten cGMP-PDE-Funktionstests (43) zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der regulierenden Fähigkeit von Arrestin. Die Funktion von Arrestin schien damit an das Vorhandensein der anodaleren Hauptbanden gekoppelt zu sein, die im Roh-Arrestin und im FPLC-Hauptpeak gleichermaßen vorhanden sind.

Die Funktion vieler Proteine in neuronalen Zellen wird durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen reguliert (60). Eine naheliegende Idee war also, zu untersuchen, ob Phosphorylierung als Ursache für die Heterogenität von Arrestin in Frage kommt, zumal ich eine Phosphorylierung am Arrestin beobachtet hatte.

Die Versuche mit isotonischen ROS-Proteinextrakten, ROS-Membranen und gereinigtem Arrestin zeigten, daß Arrestin unter geeigneten Bedingungen ein Substrat für Protein-Kinase-C ist. Besonders interessant war, daß die Phosphorylierung von Licht, d.h. von aktiviertem Rhodopsin abhing.

Die Aktivität der Protein-Kinase-C wird unter physiologischen Bedingungen durch Diacylglycerol reguliert, welches neben Inositoltrisphosphat (IP_3) das Abbauprodukt des Rezeptor-vermittelten Phosphatidylinositol-stoffwechsels darstellt (62, 66). Darüberhinaus wurde nachgewiesen (67), daß tumorauslösende Agenzien (e.c. Phorbolester) ihre Wirkung auf die Zelle über die endogene Protein-Kinase-C als Phorbolesterrezeptor ausüben. Man nimmt daher an, daß Protein-Kinase-C bedeutende Funktionen sowohl innerhalb der physiologischen als auch malignen Situation von Zellen innehat (68).

Die Annahme einer Protein-Kinase-C abhängigen Phosphorylierung von Arrestin war daher außerordentlich attraktiv, da sie eine rezeptorvermittelte Regulierung einer regulatorischen Komponente innerhalb der G-Protein vermittelten Signaltransduktionskette dargestellt hätte. Der aktivierte Rezeptor hätte also nicht nur die Übersetzung des Reizes in eine zelluläre Antwort eingeleitet, sondern gleichzeitig auch eine schnelle Regulationsmöglichkeit dieser Reizübersetzung (cf. (69)). Funktioneller Träger dieses feed-back Mechanismus wäre damit das phosphorylierte bzw. dephosphorylierte Arrestin.

Das Konzept einer Protein-Kinase-C vermittelten Regulation von Informationsübertragung ist keineswegs spekulative "l'art pour l'art". So werden einige Rezeptoren durch Protein-Kinase-C negativ moduliert (70), beispielsweise der Insulinrezeptor oder auch der EGF-Rezeptor. Darüberhinaus wird eine Protein-Kinase-C abhängige Funktionsregulation von G-Proteinen diskutiert (71, 72).

4.2 Diskussion der Phosphorylierungsexperimente

In den Phosphorylierungsversuchen konnte Arrestin nur substöchiometrisch ^{32}P -phosphoryliert werden, bestenfalls bis zu einem Phosphorylierungsgrad von 0.15 Mol P_i /Mol Arrestin. Für die meisten Phosphorylierungsexperimente wurde eine teilgereinigte Protein-Kinase-C aus Hühnerovidukt eingesetzt. Die Verwendung dieser Protein-Kinase-C veranlaßte mich zuerst anzunehmen, daß ein inadäquates Enzym vorlag, d.h. daß bei Einsatz der endogenen Protein-Kinase-C Arrestin stöchiometrisch phosphoryliert werden würde. Diese Annahme war berechtigt, da sich das Konzept einer ubiquitären Protein-Kinase-C nicht mehr als richtig erwies (73, 74).

Mittels synthetischer Peptide haben Woodgett et al. (75) untersucht, welche Aminosäuresequenz für eine Phosphorylierung durch Protein-Kinase-C vorliegen muß. Es zeigte sich, daß präferentiell die Sequenz - Ser/Thr- X_{aa} -Lys/Arg - von Protein-Kinase-C phosphoryliert wird (X_{aa} ist normalerweise eine ungeladene Aminosäure). Diese Sequenz kann in der Primärstruktur von Rinder-Arrestin (39) viermal identifiziert werden, nämlich in den Aminosäuren (AS) 78-81, 169-171, 233-236 und 365-367.

Neben diesen 4 potentiellen Phosphorylierungsstellen könnten vielleicht auch noch die Aminosäuren 199-201, 230-232 und 310-313 als schlechtere Akzeptor-sites für Protein-Kinase-C dienen. Demnach schien, bezogen auf die Primärstruktur von Arrestin, eine Phosphorylierung möglich. Allerdings kann eine aus Peptidstudien (75) ermittelte Phosphorylierungssequenz sicherlich nur begrenzt auf ein Protein übertragen werden, da eine derartige Sequenz innerhalb der dreidimensionalen Struktur nicht notwendigerweise der Kinase frei zugänglich sein muß.

Aber auch die endogene Protein-Kinase-C aus ROS erbrachte unter den in 3.3.2 beschriebenen Bedingungen keine Phosphorylierungserhöhung. Diesen Kontrollversuch habe ich mit einem konzentrierten EGTA-El-Extrakt (cf. 2.1.1.1b) durchgeführt und nicht im Ergebnisteil beschrieben, da ich keine Phosphorylierungssteigerung erzielen konnte. Die Bestimmung der Arrestin-gebundenen Radioaktivität ergab einen PG von (nur) 0.04 Mol Phosphat/Mol Arrestin. Dieser PG liegt noch unter dem, den ich mit PK-C aus Hühnerovidukt erhielt. Die niedrige Phosphorylierung von Arrestin kann deshalb vermutlich nicht mit einer "falschen" PK-C (= Hühnerovidukt-PK-C) erklärt werden. (Ich habe allerdings unter Bedingungen phosphoryliert, die für Hühnerovidukt-PK-C optimiert waren.)

Welche Ursachen hätten also für eine derartig niedrige Phosphorylierung zutreffen können? Folgende Möglichkeiten bieten sich an:

1) Der Versuchsansatz ist kompartmentalisiert, d.h. Enzym und Substrat sind lokal voneinander getrennt, so daß keine oder nur wenige "Kontakte" zustande kommen. Diese Möglichkeit schien mir ziemlich unwahrscheinlich, da in einem gut gemischten und ultrabeschallten Versuchsansatz aus Liposomen, PK-C (< 5 pMol) und Arrestin (50 pMol) mehr als 10 % (bedenke: ca. 0.1 Mol Phosphat/Mol Arrestin) der Arrestinmoleküle mit Protein-Kinase-C zusammentreffen sollten.

Diese Annahme gilt nur, wenn Protein-Kinase-C weiterhin mit Arrestinmolekülen interagieren kann, also nicht durch den Substratkontakt ihre katalytische Aktivität eingebüßt hat. Mochly-Rosen und Koshland (76) berichten, daß in Gegenwart von reichlich vorhandenem Substrat, nämlich ab ca. 1 μ M Histon III-S, eine signifikante Inhibition der PK-C-Autophosphorylierung stattfindet, was eine verminderte Aktivität der PK-C zur Folge hat.

Die von mir eingesetzte Arrestinkonzentration war 0.5 μ M, damit zweimal kleiner als der in (76) angegebene "Substratschwellenwert" von 1 μ M (Histon III-S). In Anlehnung an die Abschätzung von Kelleher und Johnson (77) hätten bei quantitativer Extraktion der PK-C aus ROS, was ich wohlgerne nicht sicher weiß, 5 pMol PK-C in den Versuchsansätzen vorgelegen. Versuche mit Histon III-S (ca. 3 μ M) hatten mir gezeigt, daß EGTA-extrahierter El-Extrakt eine spezifische Aktivität von mindestens 25 mU/mg PK-C besaß, so daß 5 pMol PK-C mehr als 10 pMol 32 P/min in Histon inkorporieren konnten. Demnach hätte ich, wenn Arrestin nur 1-fach phosphoryliert werden würde, bei 0.5 μ M Substratkonzentration mehr als 10 % phosphorylierte Arrestinmoleküle erwartet; denn, 10 % phosphorylierte Arrestinmoleküle entsprechen einer Inkorporationsleistung von nur ca. 0.3 pMol 32 P/Inkubationsminute. Das heißt, Arrestin ist ein viel schlechteres Substrat für PK-C als Histon III-S.

Vielleicht hätte ich einen höheren Phosphorylierungsgrad mit längeren Phosphorylierungszeiten (z.B. 60 min) erreicht. Dies habe ich nicht gemacht, da 10 bzw. 20 min lange phosphoryliertes (mit ROS-PK-C) Arrestin im Autoradiogramm keinen großen Unterschied in der Intensität der Banden zeigte. Einen deutlichen Unterschied sah ich, wenn ich 2 bzw. 10 min lange phosphoryliertes Arrestin miteinander verglich; die Arrestinbande war nach 2 min schwach, nach 10 min sehr deutlich auf dem Röntgenfilm zu sehen. Da kein großer Unterschied zwischen dem 10 bzw. 20 min lange phosphoryliertem Arrestin zu sehen war, habe ich 15 min lange phosphoryliert. (In der Literatur fand ich oft für PK-C abhängige Phosphorylierung Phosphorylierungszeiten zwischen 5 und 15 min; z.B. (71, 77).)

2) Ein grundsätzlich anderes Erklärungskonzept beruhte darauf, daß Arrestin infolge einer in vivo Vorphosphorylierung im Assay nicht höher phosphoryliert werden kann. Der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat hing damit von einer vorherigen Dephosphorylierung des phosphorylierten Arrestins durch eine "Arrestin-Phosphohydrolase" ab. In den rekonstituierten Phosphorylierungsexperimenten war eine derartige Phosphatase nur bedingt zu erwarten, allenfalls als eine Verunreinigung der roh-gereinigten Arrestinpräparationen oder in Form einer Spezies- und Substratfremden Phosphatase aus der teilgereinigten Protein-Kinase-C. Aber, wie schon erwähnt, konnte auch mit isotonischen ROS-Proteinextrakten keine Phosphorylierungssteigerung erzielt werden. Man kann dagegen halten, die adäquate Phosphatase habe in den ROS-El-Extrakten gefehlt, da sie zu den peripher-gebundenen Proteinen gehöre. Experimente von Schiewe (IBI,

Jülich) zeigten, daß die in ROS befindliche(n) Phosphataseaktivität(en), getestet mit phosphoryliertem Rhodopsin und 4-Nitrophenylphosphat, annähernd quantitativ isotonisch extrahierbar ist. Würde eine Arrestinphosphatase existieren, so sollte man sie in den verwendeten EGTA-E1-Extrakten vermuten.

Die zur Überprüfung einer Arrestin-Vorphosphorylierung durchgeführte Phosphatanalyse ergab ein Verhältnis von nur ca. 0.1 Mol Phosphat/Mol Hauptpeak-Arrestin. Vor jeder Phosphatanalyse wurden die Proben einem dreimaligen Präzipitations- und Solubilisierungszyklus unterzogen, so daß die Phosphat/Protein-Werte kovalent gebundenem Phosphat entsprechen sollten. Auch wenn rohgereinigtes Arrestin vor der 1. TCA-Präzipitation mit Detergenz versetzt wurde, erhielt ich nahezu identische P_i /Protein-Mittelwerte. Zugegebenermaßen, die in 3.4 aufgeführten Meßwerte für rohgereinigtes Arrestin schwanken von 0.14 bis 0.33 mol P_i /mol Protein, aber die für FPLC-gereinigtes Arrestin zeigen klar ein niedriges Ausmaß von Phosphat am Protein an. Es ist offensichtlich, daß das niedrige Ausmaß der *in vitro* Phosphorylierung von Arrestin nicht mit einer *in vivo* Vorphosphorylierung, d.h. einer Besetzung von Phosphorylierungsstellen, erklärt werden kann.

Eigenartig ist, daß gerade phosphoryliertes Arrestin besonders leicht aggregiert, wie die IEF-Versuche von phosphoryliertem Arrestin zeigten. Es müssen recht große Aggregate entstehen, da einfache Zentrifugationsbedingungen ihre Sedimentation erlauben. Arrestin besteht zu einem relativ hohen Anteil aus nichtpolaren Aminosäuren (ca. 43 mol %, (46)), und neigt zu Aggregationen.

Vorstellbar ist, daß durch eine sozusagen "gewaltsam" herbeigeführte Phosphorylierung die Konformation der phosphorylierten Arrestine verändert wird und als Folge diese mit anderen phosphorylierten und unphosphorylierten Arrestinen leichter aggregieren. Die Tatsache, daß bevorzugt ^{32}P -phosphoryliertes Arrestin ausfällt, spricht m.E. schon gegen eine physiologische Bedeutung der Phosphorylierung von Arrestin.

Die Alternative einer funktionell bedeutsamen Aggregation (dann besser: Polymerisation) durch Phosphorylierung erscheint mir nicht so einleuchtend, denn dann sollten vermutlich mehr als 10 % der Moleküle phosphorylierbar sein. Polymerisation aus Proteinmonomeren ist beispielsweise bei Cytoskelettkomponenten (e.c. Actin-filamente/Mikrotubuli) realisiert. Es gibt keine konkreten Hinweise darauf, daß Arrestin eine Cytoskelettkomponente sein könnte. Ich kann allerdings nicht ausschließen, daß die Aggregation/Polymerisation von Arrestin vielleicht doch eine Funktion hat. Immerhin wird Arrestin in Gegenwart von ROS-Membranen lichtabhängig phosphoryliert. Eine triviale Erklärung ist, daß erst über die lichtabhängige Bindung an das Rhodopsin Arrestin Kontakt zur PK-C bekommt, so daß die Phosphorylierung stattfinden kann. Das hieße aber, je mehr Arrestin an Rhodopsin binden kann, um so mehr Arrestin sollte phosphoryliert werden. Meine Versuche mit hochphosphorylierten, regenerierten Diskmembranen und PK-C aus ROS sowie aus Hühnerovidukt (Versuche hier nicht beschrieben) sprechen eindeutig dagegen. Unabhängig davon, ob wenig oder viel Arrestin an die Membranen bindet, wird nur ein Teil (ca. 10 %) des Arrestins lichtabhängig phosphoryliert, das dann möglicherweise polymerisiert. Vielleicht gewinnt dadurch dieser Arrestin-Anteil eine Funktion, deren Bedeutung noch völlig unklar ist.

Ich glaube allerdings eher, daß Arrestin (leider) kein physiologisches Substrat für Protein-Kinase-C ist.

Neben Arrestin wurden bisher zwei andere Stäbchen-Proteine identifiziert, die von Protein-Kinase-C phosphoryliert werden, nämlich Rhodopsin (77) und die GDP-beladene α -Untereinheit von Transducin (72). In beiden Fällen aber wird das Substrat substöchiometrisch phosphoryliert: bestenfalls ca. 0.15 Mol P_i /Mol Rhodopsin (77) bzw. Zick et al. geben als Phosphorylierungsausmaß für α -Transducin "not stoichiometric" an. Für eine physiologische Relevanz dieser Phosphorylierungen gibt es bis jetzt keine konkreten Beweise.

4.3 Diskussion der Mikroheterogenität

Die vorliegende Arbeit enthält m.E. ausreichend Hinweise für eine nichtartifizielle Mikroheterogenität von Arrestin: so ist das IEF-Muster unabhängig von diversen IEF-Bedingungen (siehe 2.3). Das Muster entwickelt sich auch nicht im Laufe einer Proteinpräparation (z.B. durch Deamidierung von Asparagin oder Glutamin), sondern existiert als solches in Retina-Proteinextrakten (s. 3.5). Deamidierung würde ja beinhalten, daß Arrestin-bandensaurer werden, d.h. gereinigtes Arrestin müßte gegenüber Arrestin aus Retina-Rohextrakten ein um saure Banden angereichertes IEF-Muster zeigen. Dies ist nicht der Fall. Außerdem lassen sich Arrestin-Subspezies sowohl auf der FPLC-Mono Q-Säule (teilweise) als auch auf der FPLC-Mono P-Säule voneinander trennen. Ein gewichtiges Argument ist, daß individuelle IEF-Muster in Einzeltieren existieren und beide Retinen eines Tieres identische Fokussiermuster zeigen. Die Annahme einer hauptsächlich phosphorylierungsbedingten Ladungs-

heterogenität von Arrestin erwies sich als falsch, da Arrestin nicht einmal einfach stöchiometrisch, geschweige denn mehrfach von Protein-Kinase-C phosphoryliert wird.

Heterogenität von S-Antigen wurde schon vor einiger Zeit beobachtet (79) und mit bisher spärlichen Erklärungsversuchen (s. Tabelle 1) bedacht.

Man sieht, die Frage nach der Ursache der Heterogenität ist im Grunde genommen unbeantwortet, denn Arrestin sollte nicht glykosyliert sein und Sialinsäurereste tragen, da es ein cytoplasmatisches Protein ist.

Neuerdings berichten Shinohara et al. (40), daß Arrestin aus Rinderretinen geringe Carbohydratanteile trägt, nämlich 4 Mol/Mol Arrestin ("Mannose and other carbohydrates"). Es existieren zwei Akzeptorsequenzen für eine N-linked Glykosylierung, nämlich die Aminosäuren 228-230 und 271-273. Shinohara et al. finden keine Sialinsäurereste, so daß ihre Beobachtung auch nicht die Heterogenität erklären kann.

Tabelle 1

Arrestin	IEP(s)	discussed reason for heterogeneity of arrestin	Ref.

human	5.5-5.8; 5.7 (PAGE)	no explanation: isoelectric points were ob- tained with 2 different methods IEF in sucrose den- sity gradient-ampholine column and IEF-PAGE	(79)
bovine	5.3-5.7; 5.8 (PAGE)		
rabbit	5.3-5.9; 5.5 (PAGE)		
guinea pig	4.4-5.7; 5.3 (PAGE)		

bovine	5.5	no heterogeneity discussed: but PAS positive and Sudan black negative TLC revealed sugars and hexoamines	(80)

human	5.4, 5.8	no explanation: but 0.2-0.25 mol of "lipid phosphorus/mol protein"	(81)
bovine	5.6-6.4 (6 bands)		
rabbit	6.0, 6.2	neutral sugars and sialic acid negative	(46)
guinea pig	5.2-6.2 (6 bands)		

bovine	5.5	no heterogeneity mentioned: but positive reaction with PAS; no sialic acid; negative reaction with Sudan black	(82)

human	5.7	no heterogeneity mentioned: devoid of carbohydrate including sialic acid	(83)

human	5.6, 5.9	presence of carbohydrate detected with radioiodinated Lens culinaris lectin and PAS	(84)
bovine	broad band at 5.9		
porcine	5.2, 5.3, 5.5, 5.6		
rat	5.0, 5.2, 5.3, 5.4		

4.4 Arrestin-Heterogenität in einzelnen Retinen

Um weitergehendere Aussagen zur Arrestin-Heterogenität machen zu können, wurde eine andere Versuchsstrategie angewandt, die Analyse von Einzelretinaextrakten durch IEF. Dieses Konzept basierte auf folgenden Überlegungen:

1. Die Heterogenität von Arrestin könnte nicht nur durch posttranslationale Modifikationen verursacht werden, sondern durch Mechanismen, die auf der DNA und/oder m-RNA Ebene erfolgen.
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der IEF-Vielfalt und der Ontogenese, z.B. im Rahmen einer altersabhängigen differentiellen Arrestinexpression oder vielleicht als Folge "gealterter" Proteine (cf. 63, 64)? Es ist bekannt, daß Deamidierung von Asparagin- und Glutaminresten oder Maillardreaktionen (nichtenzymatischer Glukoseeinbau über Schiff'sche Base) altersabhängig stattfinden.

Die Einzelretina-Analysen zeigten folgende wichtige Ergebnisse:

1. Beide Retinen eines Tieres geben identische Arrestin-IEF-Muster.
2. Es gibt charakteristische Unterschiede im Arrestin-Muster zwischen verschiedenen Individuen.
3. Arrestin läßt sich in 3 verschiedene IEF-Muster klassifizieren.

Die Einzelretina-Analysen zeigten also, daß das Heterogenitätsmuster von gereinigtem Arrestin nicht in seiner gesamten Komplexität in der einzelnen Retina realisiert war. Das IEF-Muster von gereinigtem Arrestin ist vielmehr der Mittelwert verschiedener IEF-Muster aus beispielsweise 150 Retinen, die für eine Arrestinpräparation eingesetzt wurden.

Eine altersbedingte Zunahme der IEF-Komplexität konnte ich nicht beobachten, so daß Alterungsprozesse als Ursache für die Mikroheterogenität unwahrscheinlich sind. Ich konnte keine Arrestinbanden ausschließlich jungen oder alten Tieren zuordnen; vielmehr, Arrestin trat in drei verschiedenen IEF-Mustern auf.

Diese 3 Muster kommen bei Kälbern und Rindern vor, allerdings, dies ist bemerkenswert, in unterschiedlicher Häufigkeit. 81 % der Rinderretinen wiesen das Standardmuster (IEF-Muster I) auf, aber nur 44 % der Kälberretinen. Es sieht danach aus, als ob mit zunehmendem Alter eine "Umverteilung" der IEF-Muster zugunsten Muster I stattfindet, was einer altersbedingten Abnahme der Komplexität entspräche. Arrestin tritt also bei Rindern weniger oft als Bande 1-, 3-, 4- und 5-Arrestin auf als bei Kälbern.

Ich habe bisher 27 Kälber- und 31 Rinderretinen untersucht; die Unterschiede im Verteilungsmuster erscheinen mir schon evident. Es ist nun nicht so, daß Muster I die beiden sauersten Hauptbanden 0 und 1 enthält, so daß man doch behaupten könnte, altersabhängig werden basische Hauptbanden in azidure umgewandelt (e.c. durch Deamidierung). Die anodal zur Hauptbande 0 gelegenen Arrestin-Nebenbanden sollten dann auch an Intensität zunehmen bzw. neue Banden im Bereich kleiner pH 5.8 entstehen. Das habe ich nie beobachtet.

Über die Ursache der individuellen Heterogenitätsmuster kann man momentan nur spekulieren. Möglicherweise existieren primärstrukturell verschiedene Arrestine, die im Laufe der Individualentwicklung differentiell exprimiert werden. Dies setzt Regulationsmechanismen auf Transkriptions- und/oder Translationsebene voraus. Immerhin besteht das menschliche S-Antigen(Arrestin)-Gen zu etwa

96 % aus Introns und nur zu etwa 3-4 % aus Exons (86). Denkbar ist also, daß aus dem primären messenger-RNA-Transkript verschiedene reife messenger-RNA's entstehen, je nachdem wie die Intron-Bereiche aus der primären m-RNA herausgeschnitten und die Exon-Bereiche miteinander kombiniert werden ("alternate m-RNA-splicing"). Die Translation der verschiedenen m-RNA's ergäbe damit primärstrukturell unterschiedliche Arrestine. Für ein Protein, dessen einzige Aufgabe darin besteht, an phosphoryliertes und lichtaktiviertes Rhodopsin zu binden, erscheint dies recht aufwendig. Es gibt bis jetzt keine Hinweise, daß Arrestinbanden differentiell an unterschiedlich hochphosphoryliertes Rhodopsin binden (Versuche hier nicht beschrieben). Läßt man bei voller Bleichung Arrestin an phosphorylierte ROS-Membranen (durchschnittlicher PG: 0.65, 1.74, 6.62 Mol P_i /Mol Rhodopsin) binden und analysiert die IEF-Muster von gebundenem und nichtgebundenem Arrestin, so sieht man keine Unterschiede im IEF-Pattern. Würden bestimmte Arrestin-Banden bevorzugt an unterschiedlich phosphoryliertes Rhodopsin binden, dann hätte ich, trotz Verwendung durchschnittlich phosphorylierter Rhodopsine, bei so unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden wie 0.65, 1.74 und 6.62 Unterschiede im IEF-Muster von gebundenem und nichtgebundenem Arrestin gesehen, die sich komplementär ergänzen müßten.

Andererseits kann man natürlich nicht aus bisher einer festgestellten Funktion ableiten, das Protein besitze darüberhinaus keine weitere(n) und müsse primärstrukturell homogen sein. Es wurden deshalb mit FPLC-Vorpeak- und Hauptpeak-Arrestin (cf. Abb. 5) Aminosäureanalysen (jeweils 3) durchgeführt (Buse; Physiologische Chemie, Aachen). Diese ergaben, daß sich Vor- und Hauptpeak in

der Menge an Serin, Valin und Isoleucin unterschieden: HP-Arrestin enthielt 8.8 Mol% Serin, 7.5 Mol% Valin und 3.5 Mol% Isoleucin, VP-Arrestin 7.7 Mol% Serin, 8.9 Mol% Valin und 4.3 Mol% Isoleucin. Die Aminosäureanalysen basieren allerdings jeweils auf der Analyse mindestens zweier Arrestinbanden (s. Abb. 5), so daß die Aminosäuren-Unterschiede noch nichts darüber sagen, ob beispielsweise Bande 0-Arrestin eine andere Primärsequenz als Bande 1-Arrestin hat. Aussagen über eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung kann ich erst dann machen, wenn präparativ voneinander getrennte Arrestine (cf. 3.6) auf ihre Aminosäurezusammensetzung untersucht werden. Erwähnen möchte ich, daß beim Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Rinder S-Antigen, das von zwei Gruppen mit verschiedenen Methoden isoliert wurde (81), Unterschiede in der mengenmäßigen Verteilung von Aminosäuren (e.c. Arginin, Serin, Valin) festzustellen sind.

Auffällig ist auch, daß die von der cDNA deduzierte Aminosäuresequenz von Rinder-Arrestin sich in fünf Aminosäuren von der unterscheidet, die mittels Aminosäureanalyse sequenziert wurde (40): D48-S60-S86-A135-L324 (cDNA) versus S48-D60-D86-E135-Q324 (Edman-Abbau). Im Falle von Asparaginsäure (D)/Serin(S) und Leucin(L)/Glutamin(Q) müßten immerhin jeweils 2 Basen bei der DNA-Sequenzierung falsch bestimmt worden sein. Ich glaube deshalb, daß sich das von der cDNA abgeleitete Arrestin wirklich in der Primärsequenz von dem Arrestin unterscheidet, das die Autoren (40) aus Rinderretinen gereinigt und dann im Aminosäureanalysator sequenziert haben. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Lochrie et al. (90) Unterschiede in der Primärsequenz

von α -Transducin feststellten, als sie die von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz mit der eines durch Edman-Abbau sequenzierten 23 kDa-Peptids von α -Transducin verglichen. Die Sequenz des 23 kDa-Peptids von ROS- α -Transducin unterschied sich in vier Aminosäuren von der, die von einer cDNA-Genbank aus Rinderretinen abgeleitet wurde. Dies war ein Hinweis auf primärstrukturell verschiedene α -Transducine, was zur Entdeckung von α_2 -Transducin in Zapfenzellen führte. Einen weiteren Hinweis auf primärstrukturell verschiedene Arrestine gibt auch die Sequenzanalyse von menschlichem retinalem S-Antigen (85). Drei von neun Klonen, die die komplette cDNA enthielten, wiesen verschiedene HaeIII-Schnittstellen auf; das heißt, die von HaeIII erkannten Nukleotidsequenzen liegen an verschiedenen Stellen innerhalb der cDNA. Die eingesetzte menschliche cDNA library stammte aus mehreren Retinen. Die Autoren deuten an, daß menschliches S-Antigen ein polymorphes Protein sei, so daß verschiedene Arrestine in Individuen exprimiert werden könnten.

Wie schon erwähnt (siehe 1.1), kommt Arrestin in der gesamten Stäbchenzelle sowie in Zapfenzellen vor (32). Es ist völlig unklar, ob Arrestin eine Funktion im Bereich der Synapse besitzt und vielleicht strukturell verschieden ist von dem, das aus Stäbchenaußensegmenten isoliert wird. Ebenso ist nichts über eine Funktion und die Struktur von Arrestin bekannt, das in Zapfenzellen vorkommt. Abhängig vom Zapfentyp könnten beispielsweise verschiedene Arrestine existieren. Jedoch, die Analyse von einzelnen Retinen zeigt, daß Individuen sich im Arrestin-IEF-Muster unterscheiden. Unabhängig davon, daß verschiedene Arrestine in Stäbchen und Zapfen vorkommen können, müssen also noch andere Ursachen für die

Arrestinheterogenität existieren. (Denn, die verwendeten frischen Retinen sollten alle 1. Zapfen und Stäbchen sowie 2. eine vergleichbare Anzahl Photorezeptorzellen enthalten.) Ferner zeigt auch isotonischer Dunkel-Extrakt aus Stäbchenaußensegmenten nach IEF ein Arrestin-IEF-Muster, das die Hauptbanden 0 bis 4 und die anodaleren Nebenbanden (-1, -2) enthält (Versuche hier nicht beschrieben). Das heißt, schon in Stäbchenaußensegmenten existieren unterschiedliche Arrestine. Dies ist ein starkes Indiz dafür, daß die beobachtete Heterogenität nicht auf verschiedenen Arrestinen aus unterschiedlichen Zelltypen beruht, sondern in einem Zelltyp verschiedene Arrestine exprimiert werden.

4.5 Ausblick

Die Isolierung einzelner Arrestin-Subspezies durch FPLC-Chromatofokussierung wird eine Antwort auf einige Fragen ermöglichen. Sobald ausreichende Mengen voneinander getrennter Arrestin-Banden vorliegen, können diese für Funktionstests, Aminosäureanalysen und Kristallisationsexperimente eingesetzt werden.

Bisher wurde Arrestin nur in einigen zellulären Strukturen (Stäbchen, Zapfen, Pinealorgan, Plexus choroideus) identifiziert. Benovic et al. (45) haben nun gezeigt, daß in Hamsterlungenzellen ein cytoplasmatisches Protein existiert, dessen Funktion durch Arrestin aus Rinderretina (zumindest teilweise) ersetzt werden kann. Die Zugabe von Arrestin zu phosphoryliertem β_2 -adrenergen Rezeptor aus Lungenzellen führte zu einer deutlichen Verminderung der Agonist-stimulierten GTPase-Aktivität des stimulatorischen G-Proteins. Es ist insofern wahrscheinlich, daß Arrestin bzw. Arrestin-ähnliche Proteine noch in anderen als den bisher identifizierten Zellen existieren.

5. Zusammenfassung

1. Arrestin (48-kDa Protein, S-Antigen) aus Rinderretina wurde säulenchromatographisch roh-gereinigt. Nahezu reines Arrestin wurde durch anschließende FPLC-Anionenaustauschchromatographie erhalten. Roh- und FPLC-gereinigtes Arrestin zeigen eine ladungsbedingte Heterogenität, die durch isoelektrische Fokussierung und Immunoblotting mit einem monoklonalen anti-S-Antigen-Antikörper (S6H8) nachgewiesen wurde.
Das IEF-Muster von gereinigtem Arrestin besteht aus 2-4 Hauptbanden und mindestens 5-10 Nebenbanden; die isoelektrischen Punkte liegen zwischen pH 5.5 - 6.1. Arrestin-Subspezies wurden durch FPLC-Anionenaustauschchromatographie teilweise voneinander getrennt; die basischeren Hauptbanden 2 und 3 (pH 6.0 - 6.1) werden in einem sog. Vorpeak eluiert, wohingegen im Hauptpeak Banden 0- und 1-Arrestin (pH 5.8 - 5.9) sowie die anodaleren Nebenbanden (pH < 5.75) vorzufinden sind. Eine fast vollständige Trennung einzelner Arrestin-Subspezies voneinander habe ich durch FPLC-Chromatofokussierung erreicht.
2. Um einen postulierten lichtabhängigen ATP/ADP-Austausch am Arrestin zu überprüfen, habe ich Nukleotidaustausch- und Bindungsexperimente im rekonstituierten System, d.h. gereinigtes Arrestin + ROS-Membranen $\pm$ Licht, durchgeführt. Ich konnte keine lichtabhängige ATP-Bindungskapazität am Arrestin nachweisen, fand aber eine lichtabhängige Phosphorylierung am Arrestin.
3. Ich untersuchte, ob Arrestin von einer ROS-Protein-Kinase stöchiometrisch phosphoryliert wird und inwieweit die ladungsbedingte Heterogenität von Arrestin durch Phosphorylierung erklärt werden kann.

Arrestin wird von Protein-Kinase-C (PK-C) phosphoryliert, allerdings nur substöchiometrisch (PG: 0.04 Mol Phosphat/Mol Arrestin). Die Phosphorylierung ist in Gegenwart von Diskmembranen lichtabhängig, außer wenn zusätzliche Phosphatidylserin-Vesikel zugegeben werden. Mit einer teilgereinigten PK-C und PS-Vesikel wurden die Phosphorylierungsbedingungen optimiert: bei 5 mM MgCl_2 , 100 μM Ca^{2+} -Überschuß, 50 μM ATP und 5 μg PS werden maximal 0.1 - 0.15 Mol Phosphat/Mol Arrestin eingebaut.

Um zu überprüfen, ob diese niedrige Phosphatinkorporation vielleicht durch eine in vivo Vorphosphorylierung verursacht ist, habe ich Phosphatanalysen mit gereinigtem Arrestin durchgeführt.

Diese ergaben ein Verhältnis von ca. 0.1 Mol kovalent gebundem Phosphat/Mol Arrestin. Das bedeutet:

1. die substöchiometrische Phosphorylierung durch PK-C kann nicht mit besetzten Phosphorylierungsstellen erklärt werden.
2. die ladungsbedingte Heterogenität von Arrestin kann nicht allein durch Phosphorylierung erklärt werden.

Eine Zuordnung von phosphoryliertem Arrestin in das IEF-Muster war nicht möglich, da phosphoryliertes Arrestin sehr leicht aggregiert. Eine eventuelle Bedeutung einer phosphorylierungsvermittelten Aggregation (Polymerisation?) von Arrestin wird diskutiert, da die Phosphorylierung durch PK-C in Anwesenheit von Diskmembranen lichtabhängig ist.

4. Um zu untersuchen, ob die ladungsbedingte Heterogenität
 1. durch zelluläre Alterungsprozesse zustande kommt
 2. eventuell durch Mechanismen auf DNA- und/oder RNA-Ebene verursacht wird,

habe ich die Arrestin-Heterogenität in einzelnen Kälber- und Rinderretinen untersucht.

Die Einzelretina-Analysen zeigten:

1. Beide Retinen eines Tieres geben identische Arrestin-IEF-Muster.
2. Es gibt charakteristische Unterschiede im Arrestin-Muster zwischen verschiedenen Individuen.
3. Arrestin läßt sich in 3 verschiedene IEF-Muster (Muster I, II, III) klassifizieren.

Diese Muster zeigen als dominante Arrestin-Banden: Banden 0 und 2 bei I; Banden 0, 1, 2, 3 bei II; Banden 0, 2, 4, 5 bei III. Muster I, II und III kommen bemerkenswert unterschiedlich oft bei Kälbern und Rindern vor. 81 % der Rinder-Retinen zeigten das sog. Standardmuster (Muster I, nur 2 Hauptbanden), aber nur 44 % der Kälber-Retinen. Das Auftreten individueller Fokussiermuster begünstigt eine Annahme primärstrukturell verschiedener Arrestine, die möglicherweise im Laufe der Individualentwicklung differentiell exprimiert werden.

4. Das Arrestin-IEF-Muster wird nicht altersabhängig komplexer; eher einfacher, da Muster I öfters in Rinder- als in Kälber-Retinen auftrat.
5. Bindungs-Vorversuche mit Arrestin und unterschiedlich hochphosphorylierten ROS-Membranen ergaben bisher aus der IEF-Analyse von gebundenem und nichtgebundenem Arrestin keine Hinweise für ein unterschiedliches Bindungsverhalten einzelner Arrestin-Banden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Hudspeth, A.J., MacLeish, P.R., Margolis, F.L., Wiesel, T.N. (Eds.) (1987). Discussions in Neurosciences: Sensory Transduction. FESN, Geneva, 4 (3)
- (2) Stieve, H. (Ed.). (1986). The molecular mechanism of photoreception. Dahlem Workshop LS Report 34. Springer-Verlag, Berlin
- (3) Schnapf, J.L., Baylor, D.A. (1987). How photoreceptor cells respond to light. Scientific American 256 (4), 32-39
- (4) Pugh Jr., E.N., Cobbs, W.H. (1986). Visual transduction in vertebrate rods and cones: a tale of two transmitters, calcium and cyclic GMP. Vision Res. 26, 1613-1643
- (5) 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
- (6) Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S., Lyubarsky, A.L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. Nature 313, 310-313
- (7) Yau, K.W., Nakatani, K. (1985). Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment. Nature 317, 252-255
- (8) Pfister, C., Kühn, H., Chabre, M. (1983). Interaction between photoexcited rhodopsin and peripheral enzymes in frog retinal rods. Eur. J. Biochem. 136, 489-499
- (9) Kühn, H. (1984). Interactions between photoexcited rhodopsin and light-activated enzymes in rods. In: Osborne, N.N., Chader, G.J. (Eds.). Prog. Retinal Res. Pergamon Press, Oxford, 3, pp. 123-156
- (10) Stryer, L. (1987). The molecules of visual excitation. Scientific American 257 (1), 32-40

- (11) Deterre, P., Pfister, C., Bigay, J., Chabre, M. (1987). The retinal phototransduction process: enzymatic cascade and regulation. *Biochimie* 69, 365-370
- (12) Godchaux, W., Zimmermann, W.F. (1979). Membrane-dependent guanine nucleotide binding and GTPase activities of soluble protein from bovine rod cell outer segments. *J. Biol. Chem.* 254, 7874-7884
- (13) Kühn, H. (1980). Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. *Nature* 283, 587-589
- (14) Fung, B.K.K., Hurley, J.B., Stryer, L. (1981). Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 152-156
- (15) Kühn, H., Bennett, N., Michel-Villaz, M., Chabre, M. (1981). Interactions between photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein: kinetic and stoichiometric analyses from light-scattering changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6873-6877
- (16) Baehr, W., Morita, E.A., Swanson, R.J., Applebury, M.L. (1982). Characterization of bovine rod outer segment G-protein. *J. Biol. Chem.* 257, 6452-6460
- (17) Veen van, T., Östholm, T., Gierschik, P., Spiegel, A., Somers, R., Korf, H.W., Klein, D.C. (1986). α -transducin immunoreactivity in retinae and sensory pineal organs of adult vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 912-916
- (18) Deretic, D., Hamm, H.E. (1987). Topographic analysis of antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies to the photoreceptor guanyl nucleotide binding protein, transducin. *J. Biol. Chem.* 262, 839-847
- (19) Gilman, A.G. (1987). G-Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annual Rev. Biochem.* 56, 615-549
- (20) Yamazaki, A., Stein, P.J., Chernoff, N., Bitensky, M.W. (1983). Activation mechanism of rod outer segment cGMP phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 258, 8188-8194

- (21) Deterre, P., Bigay, J., Robert, M., Pfister, C., Kühn, H., Chabre, M. (1986). Activation of retinal rod cyclic GMP-phosphodiesterase by transducin: characterization of the complex formed by phosphodiesterase inhibitor and transducin α -subunit. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 1, 188-193
- (22) Deterre, P., Bigay, J., Forquet, F., Robert, M., Chabre, M. (1988). The cGMP phosphodiesterase of retinal rods is regulated by two inhibitory subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in press
- (23) Kühn, H., Dreyer, W.J. (1972). Light dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP. *FEBS Lett.* 20, 1-6
- (24) Kühn, H., Cook, J.H., Dreyer, W.J. (1973). Phosphorylation of rhodopsin in bovine photoreceptor membranes. A dark reaction after illumination. *Biochemistry* 12, 2495-2502
- (25) Kühn, H. (1974). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin in living frogs. *Nature* 250, 588-600
- (26) Wilden, U., Kühn, H. (1982). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites. *Biochemistry* 21, 3014-3022
- (27) Ho, A.K., Somers, R.L., Klein, D.C. (1986). Development and regulation of rhodopsin kinase in rat pineal and retina. *J. Neurochem.* 46, 1176-1179
- (28) Sitaramayya, A. (1986). Rhodopsin kinase prepared from bovine rod disk membranes quenches light activation of cyclic GMP phosphodiesterase in a reconstituted system. *Biochemistry* 25, 5460-5468
- (29) Kühn, H. (1978). Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* 17, 4389-4395
- (30) Kühn, H., Hall, S.W., Wilden, U. (1984). Light-induced binding of 48 kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.* 176, 473-478

- (31) Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, V.V., deKozak, Y., Faure, J.P., Kühn, H. (1985). Retinal S antigen identified as the 48 K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* 228, 891-893
- (32) Mirshahi, M., Faure, J.P., Brisson, P., Falcon, J., Guerlotte, J., Collins, J.P. (1984). S-antigen immunoreactivity in retinal rods and cones and pineal photosensitive cells. *Biol. Cell* 52, 195-198
- (33) Mirshahi, M., Boucheix, C., Collenot, G., Thillaye, B., Faure, J.P. (1985). Retinal S-antigen epitopes in vertebrate and invertebrate photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 1016-1021
- (34) Uusitalo, H., Lehtosalo, J.I., Gregerson, D.S., Uusitalo, R., Palkama, A. (1985). Ultrastructural localization of retinal S-antigen in the rat. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 222, 118-122
- (35) McKechnie, N.M., Al-Mahdawi, S., Dutton, G., Forrester, J.V. (1986). Ultrastructural localization of retinal S antigen in the human retina. *Exp. Eye Res.* 42, 479-487
- (36) Collin, J.P., Mirshahi, M., Brisson, P., Falcon, J., Guerlotte, J., Faure, J.P. (1986). Pineal-retinal molecular relationships: distribution of "S-antigen" in the pineal complex. *Neuroscience* 19, 657-666
- (37) Veen van, T., Elofsson, R., Hartwig, H.G., Gery, I., Mochizuki, M., Cena, V., Klein, D.C. (1986). Retinal S-antigen: immunocytochemical and immunochemical studies on distribution in animal photoreceptors and pineal organs. *Exp. Biol.* 45, 15-25
- (38) Oliver, J., Herbuté, S., Mirshahi, M., Faure, J.P., Brisson, P., Collin, J.P. (1987). Identification d'une protéine apparentée à l'antigène-S dans les plexus choroïdes de la caille. *C.R. Acad. Sci. Paris* 305, 485-491
- (39) Yamaki, K., Takahashi, Y., Sakuragi, S., Matsubara, K. (1987). Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 904-910

- (40) Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J., Tao, R. (1987). Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48 kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6975-6979
- (41) Broekhuysse, R.M., Tolhuizen, E.F.J., Janssen, A.P.M., Winkens, H.J. (1985). Light induced shift and binding of S-antigen in retinal rods. *Current Eye Res.* 4, 613-618
- (42) Mangini, N.J., Pepperberg, D.R. (1987). Localization of retinal "48" (S-antigen) by electron microscopy. *Jpn. J. Ophthalmol.* 31, 207-217
- (43) Wilden, U., Hall, S.W., Kühn, H. (1986). Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1174-1178
- (44) Zuckerman, R., Cheasty, J.E. (1986). A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes. *FEBS Lett.* 207, 35-41
- (45) Benovic, J.L., Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987). Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48K protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8879-8882
- (46) Wacker, W.B., Donoso, L.A., Kalsow, C.M., Yankeelov, J.A., Organisciak, D.T. (1977). Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J. Immunol.* 119, 1949-1958
- (47) Gregerson, D.S., Obritsch, W.F., Fling, S.P., Cameron, J.D. (1986). S-antigen-specific rat T cell lines recognize peptide fragments of S-antigen and mediate experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis. *J. Immunol.* 136, 2875-2882

- (48) Merryman, C.F., Donoso, L.A., Sery, T.W., Scuitto, E., Bauer, A., Shinohara, T. (1987). S-antigen adoptive transfer of experimental autoimmune uveitis following immunization with a small synthetic peptide.
Arch. Ophthalmol. 105, 841-843
- (49) Kühn, H. (1982). Light-regulated binding of proteins to photoreceptor membranes and its use for the purification of several rod cell proteins.
Methods in Enzymology 81, 556-564
- (50) Horn, F., Gschwendt, M., Marks, F. (1985). Partial purification and characterization of the calcium-dependent and phospholipid-dependent protein kinase C from chick oviduct.
Eur. J. Biochem. 148, 533-538
- (51) Kikkawa, U., Minakuchi, R., Takai, Y., Nishizuka, Y. (1983). Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) from rat brain.
Methods in Enzymology 99, 288-298
- (52) Faure, J.P., Mirshahi, M., Dorey, C., Thillaye, B., deKozak, Y., Boucheix, C. (1984). Production and specificity of monoclonal antibodies to retinal S antigen.
Current Eye Res. 3, 867-872
- (53) Dorey, C., Cozette, J., Faure, J.P. (1982). A simple and rapid method for isolation of retinal S antigen.
Ophthalmic Res. 14, 249-255
- (54) Wilden, U., Wüst, E., Weyand, I., Kühn, H. (1986). Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin.
FEBS Lett. 207, 292-295
- (55) Zigler, J.S., Mochizuki, M., Kuwabara, T., Gery, I. (1984). Purification of retinal S-antigen to homogeneity by the criterion of gel electrophoresis silver staining.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 25, 977-980
- (56) Buss, J.E., Stull, J.T. (1983). Measurement of chemical phosphate in proteins.
Methods in Enzymology 99, 2-14

- (57) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.
Nature 227, 680-685
- (58) Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.
Biochemistry 10, 2606-2617
- (59) 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
- (60) Nestler, E.J., Greengard, P. (1984). Protein phosphorylation in the nervous system.
John Wiley & Sons, Inc., New York
- (61) Kapoor, C.L., Chader, G.J. (1984). Endogenous phosphorylation of retinal photoreceptor outer segment proteins by calcium phospholipid-dependent protein kinase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1397-1403
- (62) Bell, R.M. (1986). Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers.
Cell 45, 631-632
- (63) Zigler, J.S., Russell, P., Takemoto, L.J., Schwab, S.J., Hansen, J.S., Horwitz, J., Kinoshita, J.H. (1985). Partial characterization of three distinct populations of human α -crystallins.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 26, 525-531
- (64) Cerami, A., Vlassara, H., Brownlee, M. (1987). Glucose and aging.
Scientific American 256 (5), 82-88
- (65) Zuckerman, R., Buzdygon, B., Liebman, P. (1984). Characterization of the 48 kilodalton protein of retinal rod outer segments as a light-dependent ATP-binding protein.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Suppl. 25 (3), 112
- (66) Berridge, M.J. (1986). Intracellular signalling through inositol triphosphate and diacylglycerol.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 447-456

- (67) Parker, P.J., Stabel, S., Waterfield, M.D. (1984). Purification to homogeneity of protein kinase C from bovine brain - identity with phorbol ester receptor.
EMBO J. 3, 953-959
- (68) Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C.
Science 233, 305-312
- (69) Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1987). Cross-talk between cellular signalling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation.
Nature 327, 67-70
- (70) Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987). Regulation of transmembrane signalling by receptor phosphorylation.
Cell 48, 913-922
- (71) Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S., Jakobs, K.H. (1985). Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase.
Eur. J. Biochem. 151, 431-437
- (72) Zick, Y., Sagi-Eisenberg, R., Pines, M., Gierschik, P., Spiegel, A.M. (1986). Multi-site phosphorylation of the alpha subunit of transducin by the insulin receptor kinase and protein kinase C.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9294-9297
- (73) Ohno, S., Kawasaki, H., Imajoh, S., Suzuki, K., Inagaki, M., Yokokura, H., Sakoh, T., Hidaka, H. (1987). Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit protein kinase C.
Nature 325, 161-166
- (74) Brandt, S.J., Niedel, J.E., Bell, R.M., Young, W.S. (1987). Distinct patterns of expression of different protein kinase C mRNAs in rat tissues.
Cell 49, 57-63
- (75) Woodgett, J.R., Gould, K.L., Hunter T. (1986). Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements.
Eur. J. Biochem. 161, 177-184

- (76) Mochly-Rosen, D., Koshland, D.E. (1987). Domain structure and phosphorylation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262, 2291-2297
- (77) Kelleher, D.J., Johnson, G.L. (1986). Phosphorylation of rhodopsin by protein kinase C in vitro. *J. Biol. Chem.* 261, 4749-4757
- (78) Lee, R.H., Brown, B.M., Lolley, R.N. (1982). Auto-phosphorylation of rhodopsin kinase from retinal rod outer segments. *Biochemistry* 21, 3303-3307
- (79) Dorey, C., Faure, J.P. (1977). Isolement et caractérisation partielle d'un antigène rétinien responsable de l'uvéa-rétinite autoimmune expérimentale. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 128 C, 229-232
- (80) Dorey, C., Tuyen, V.V., Cozette, J., Faure, J.P. (1979). Isolation and properties of retinal S antigen. In: Silverstein, A.M., O'Connor, G.R. (Eds.). *International symposium on the immunology and immunopathology of the eye*. Masson, New York, pp. 110-112
- (81) Wacker, W.B. (1981). Isolation of retinal S antigen and its role in experimental ocular autoimmunity. In: Sears, M.L. (Ed.). *New directions in ophthalmic research*. Yale University Press, New Haven & London, pp. 5-29
- (82) Borthwick, G.M., Forrester, J.V. (1983). Purification of retinal S-antigen by ion-exchange chromatography and chromatofocusing. *Exp. Eye Res.* 37, 613-625
- (83) Beneski, D.A., Donoso, L.A., Edelberg, K.E., Magargal, L.E., Folberg, R., Merryman, C. (1984). Human retinal S-antigen: isolation, purification, and characterization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 686-690
- (84) Banga, J.P., Kasp, E., Suleyman, S., Brown, E., Ellis, B.A., Sanders, M.D., Dumonde, D.C. (1987). Comparative biochemical analysis of purified S-antigen from human, bovine, porcine and rat retina. *Exp. Eye Res.* 44, 199-207

- (85) Yamaki, K., Tsuda, M., Shinohara, T. (1988). The sequence of human retinal S-antigen reveals similarities with α -transducin.
manuscript submitted
- (86) Yamaki, K., Shinohara, T. (1988). Structural analysis of human S-Antigen and its gene.
J. Cell Biochem. Suppl. 12B, p. 226
- (87) Zuckerman, R., Buzdygon, B., Philp, N., Liebman, P., Sitaramayya, A. (1985). Arrestin: An ATP/ADP exchange protein that regulates cGMP phosphodiesterase activity in retinal rod disk membranes (RDM).
Biophys. J. 47, 37a
- (88) Righetti, P.G. (1983). Isoelectric focusing: Theory, methodology, and applications.
Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
- (89) Heukeshoven, J., Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver stain.
Electrophoresis 6, 103-112
- (90) Lochrie, M.A., Hurley, J.B., Simon, M.I. (1985). Sequence of the alpha subunit of photoreceptor G-protein: Homologies between transducin, ras, and elongation factors.
Science 228, 96-99

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung der Kernforschungsanlage Jülich angefertigt.

Ich möchte Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Kühn für die Überlassung des Themas und ausgesprochen großzügige Förderung meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. H. Stieve danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern des Instituts für ihre Unterstützung, besonders bei Frau R. Derichs für ihre Hilfe im Labor und die Durchführung von Arrestin-Präparationen.

Mein Dank gilt Frau D. Höppner-Heitmann für die fotografischen Aufnahmen, Frau A. Eckert für das Tippen des Manuskripts und Herrn B. Schiewe für die schöne Darstellung der Abb. 1 und 12 sowie das Bereitstellen unterschiedlich hochphosphorylierter ROS-Membranen.

Herrn Dr. F. Horn (DFKZ Heidelberg) danke ich für die gereinigte Protein-Kinase-C; Herrn Dr. J.-P. Faure und seinem Labor (Paris, Inserm U 86) für die Überlassung monoklonaler anti-S-Antigen-Antikörper.

Herr Priv.-Doz. Dr. H. Kühn verunglückte am 29. 3. 1988.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Stieve und Herrn Prof. Dr. H. Zahn für die Übernahme des Referats bzw. Korreferats.

