



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

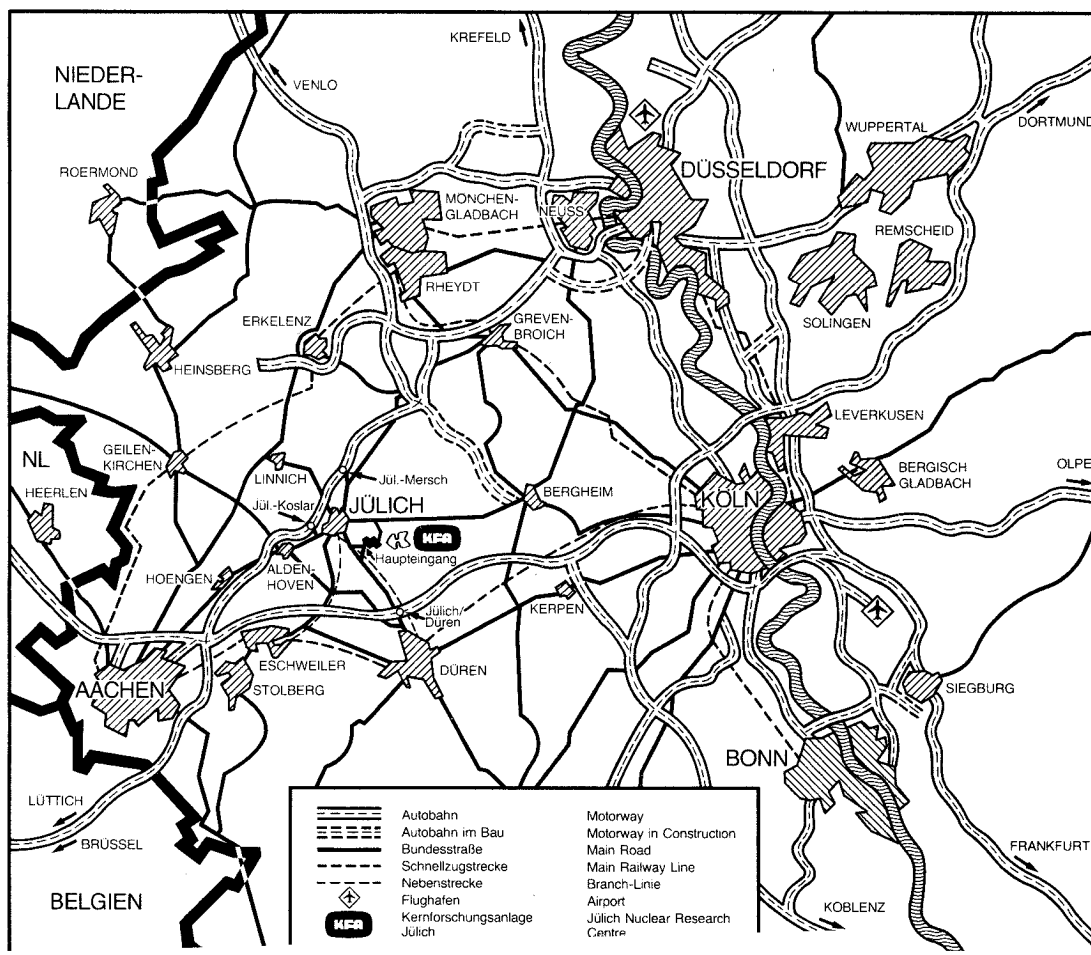
Institut für Biologische Informationsverarbeitung

**Experimente zur Dephosphorylierung
von Rhodopsin aus Stäbchen-
Außensegmenten (ROS) des Rindes**

von

Berthold Schiewe

**Jül - 2273
April 1989
ISSN 0366-0885**



Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2273

Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül – 2273

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 024 61/610 · Telex: 833556-0 kf d

Experimente zur Dephosphorylierung von Rhodopsin aus Stäbchen- Außensegmenten (ROS) des Rindes

von

Berthold Schiewe

Diss. T.H. Aachen

Inhaltsverzeichnis

	Summary	1
	Abkürzungen	4
1.	Einleitung	5
1.1	Einführung in die Signaltransduktion bei der Photorezeption von Vertebraten	5
1.2	Zielsetzung der Arbeit	8
2.	Material und Methoden	9
2.1	Versuchsobjekt	9
2.2	Präparation der Rinderretinen	9
2.3	Präparation der Stäbchen-Außensegmente	9
2.4	Extraktion löslicher Proteine aus Rinder- retinen (RE-G)	9
2.5	Extraktion löslicher Proteine aus Stäbchen- Außensegmenten (ROS)	10
2.5.1	Extraktion löslicher Proteine aus unbe- lichteten ROS (Dunkelextrakt)	10
2.5.1.1	Isotonisch lösliche Proteine (DE-1)	10
2.5.1.2	Hypotonisch lösliche Proteine (DE-2)	10
2.5.1.3	Gesamtextrakt löslicher Proteine (DE-G)	10
2.5.2	Extraktion löslicher Proteine aus be- lichteten ROS (Lichtextrakt)	11
2.6	Rhodopsinphosphorylierung	11
2.6.1	Vorbehandlung der ROS	11
2.6.2	ATP-Stammlösung	11
2.6.3	AT ³² P-Lösung	12
2.6.4	Phosphorylierung	12
2.6.5	Regeneration mit 11-cis-Retinal	12
2.6.6	Waschung des phosphorylierten Rhodopsins/Opsins	13
2.6.7	Bestimmung des durchschnittlichen Phosphory- lierungsgrades (PG)	13

2.7	Lipid-freie Rhodopsinpräparation	14
2.8	ROS-Lipid-Präparation	14
2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
2.9.1	Anfärbung der Gele	15
2.9.2	Aufbewahrung der Gele	15
2.9.3	Gel-Autoradiographie	15
2.10	Dephosphorylierungsversuche	15
2.11	Säulenchromatographie	18
2.11.1	Gel-Filtration	18
2.11.2	Anionen-Austausch-Chromatographie	18
2.11.3	Adsorptions-Chromatographie	19
2.11.4	Affinitäts-Chromatographie	19
2.12	Isoelektrische Fokussierung	20
2.12.1	Gelzusammensetzung	20
2.12.2	Fokussierbedingungen	20
2.12.3	Behandlung der Gele nach der Fokussierung	20
2.12.3.1	pH Gradient-Bestimmung	20
2.12.3.2	Anfärbung der Isoelektrischen Gele	21
2.12.3.3	Enzymaktivitätsfärbung	21
2.13	Anhang des methodischen Teils	22
3.	Ergebnisse	23
3.1	Vorversuche zur Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt bzw. Retinen-Extrakt	23
3.1.1	Phosphataseaktivität in Abhängigkeit vom verwendeten Detergenz	25
3.1.2	Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration (Octylglucosid)	26
3.2	Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt, "ganzen ROS" und Retinen-Extrakt	27
3.2.1	Dephosphorylierungsversuche mit ROS-Präparationen	28

3.2.1.1	Phosphataseaktivität in ROS	28
3.2.1.2	Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt (DE-G) in Abhängigkeit von der Extrakt-Konzentration	29
3.2.1.3	Dephosphorylierung verschiedener Rhodopsin- Formen durch ROS-Gesamt-Extrakt (DE-G)	31
3.2.1.4	Proteolyse-Kontrollversuche	33
3.2.1.5	Dephosphorylierung von Rhodopsin unterschied- licher durchschnittlicher Phosphorylierungsgrade	37
3.2.2	Phosphataseaktivität von "ganzen ROS"	38
3.2.2.1	Mögliche aktivitätsbeeinflussende Faktoren	40
3.2.2.1.1	Einfluß von lipid-freiem Rhodopsin auf die ROS- Extrakt-Phosphataseaktivität	41
3.2.2.1.2	Einfluß von ROS-Lipiden auf die ROS-Extrakt- Phosphataseaktivität	42
3.2.3	Dephosphorylierungsversuche mit Retinen-Extrakt	44
3.2.3.1	pH-Wert-Abhängigkeit der Phosphataseaktivität	46
3.2.3.2	Temperaturabhängigkeit der Phosphataseaktivität	48
3.2.3.3	Stabilisierung der Phosphataseaktivität	49
3.3	Versuche zur Aktivierung "latenter" Phosphatasen	50
3.3.1	2-Mercaptoethanol-Fällung	50
3.3.2	Ethanol-Fällung	52
3.4	Dephosphorylierung von phosphoryliertem Opsin mit unspezifischen Phosphatasen	54
3.5	Phosphatase-Reinigungsversuche	56
3.5.1	Gel-Filtration	56
3.5.2	Anionen-Austausch-Chromatographie	57
3.5.2.1	Vorversuche	57
3.5.2.2	Reinigungs-Versuche	58
3.5.3	Adsorptions-Chromatographie	59
3.5.3.1	Vorversuche	59
3.5.3.2	Reinigungs-Versuche	60
3.5.4	Affinitäts-Chromatographie	62
3.5.4.1	Vorversuche	62

3.5.4.2	Reinigungs-Versuche	63
3.5.4.3	Kombination der verschiedenen Reinigungsmethoden	68
3.6	Isoelektrische Fokussierung von Retinen-Extrakt	68
4.	Diskussion	71
4.1	Diskussion der Versuchsergebnisse	73
4.1.1.	Unterschiedliche Phosphatasequellen	73
4.1.2	"Detergenzaktivierung"	74
4.1.2.1	Detergenzeinfluß auf das Substrat	74
4.1.2.2	Detergenzeinfluß auf die Phosphatase	77
4.1.3	Dephosphorylierung verschiedener Substrat- konformationen	78
4.1.4	Inhibierung der Phosphataseaktivität durch NaPP und ATP	80
4.1.5	Reinigungsversuche	82
	Zusammenfassung	85
	Literaturverzeichnis	89

Summary

The light-activated phosphorylation of rhodopsin under in-vivo- and in-vitro-conditions is known since a long time.

On contrary little is known about dephosphorylation. The quantitative dephosphorylation of highly phosphorylated bovine rhodopsin is not yet described.

I describe optimized conditions to dephosphorylate highly phosphorylated rhodopsin from bovine (PG 5 -6 mol/mol rhodopsin) quantitatively with different extracts from ROS or from the whole retina. Experiments, using "whole ROS" as a source for phosphatase(s) are shown.

Further first results of experiments to purify phosphatase(s) from retina-extracts are shown.

1) I found phosphatase-activity in different extracts from ROS and from retina and in "whole ROS". Phosphatase (s) from ROS is (are) isotonicly extracted, but hypotonic extracts contain slightly higher phosphatase-activity. About only 20 % of the activity remains in the pellets after extraction. Therefore phosphatase(s) seem(s) to be soluble protein(s) of the Rod Outer Segments.

Activity of hypotonic retina-extract is about 60 times higher than the activity of ROS-extract. I discuss the possibility of the existence of different phosphatases in these different extracts.

A quantitative dephosphorylation of rhodopsin with extracts from ROS or from retina occurs only in the presence of a nonionic detergent (Octylglucosid). In the absence of detergent phosphorylated rhodopsin is dephosphorylated to about 30 - 40 % only. I discuss increased activity in presence of detergent as a possible influence on the substrat or on the phosphatase(s) itself. The results indicate an influence of the detergent on the phosphatase(s) but not on the substrat.

The pH-optimum for the phosphatase-activity is at pH 5.7; therefore the phosphatase(s) is (are) adjoined to "acid phosphatases".

Depending on temperature a considerable loss of phosphatase-activity in the extracts was found during the experiments. The loss of activity is highly depressed in presence of DTT.

Several factors inhibit phosphatase-activity. An ionic strength of about 250 mM NaCl inhibits the activity half-maximal. Sodiumphosphat inhibits halfmaximal at a concentration of 10 mM and ATP inhibits about 90 % at a concentration of 5 mM.

Using "whole ROS" as a "phosphatase-source" I found in contrast to extracts no quantitative dephosphorylation of rhodopsin in the presence of detergent. "Whole

ROS" are assumed to contain inhibitory components, because dephosphorylation of rhodopsin is quenched using higher concentrations of ROS. Unphosphorylated rhodopsin and lipids, extracted from ROS can be excluded as possible inhibitory factors.

2) Dephosphorylation does not depend on the extent of rhodopsin phosphorylation.

3) Phosphorylated rhodopsin, regenerated with 11-cis-retinal is dephosphorylated in presence or absence of detergent in the same range as phosphorylated Opsin or Meta II or Meta III. These results indicate, that under in-vivo-conditions every tested form of rhodopsin is a possible substrat for the phosphatase(s). Because of these results I discuss a function of the phosphatase within the light activated enzyme-cascade as a possible mechanism to modulate the receptor response; a mechanism which perhaps effects directly, in an antagostic manner the kinase and thereby the binding of transducin or arrestin respectively. Therefore dephosphorylation of light activated rhodopsin may not only be a process to reconstitute the receptor to a perception-sensible state.

4) An acid phosphatase from potatoe dephosphorylates Opsin up to 50 % and a basic phosphatase from calf intestine dephosphorylates up to 40 %. Compared to the acid phosphatase (0,1 U) the use of an 100-fold higher enzyme-activity is necessary for the basic phosphatase. This non-specific dephosphorylation is not increased by detergent.

5) Mercaptoethanol- or ethanol-treatment, which is used to activate phosphatase(s) from other tissues, do not increase phosphatase-activity of ROS-or retina-extract, but even leads to a loss of activity. After this treatment no further activation of the phosphatases by detergent is found. These results do not confirm the results from Yang et al (1988), who postulate the existence of a "receptor-spezifisch-phosphatase" of type "latente phosphatase 2", which is activated by mercaptoethanol-treatment.

6) Isoelectric focussing of retina-extract and following enzyme-activity-staining leads to several phosphatase-activity bands within the gel. But this heterogeneity is not necessarily an evidence for different phosphatases in the retina-extract. A comparison to purified phosphatases from potatoe shows a similar pattern of stained bands. The isoelectric points of the different bands from retina and from potatoe are localized in a pH-range of pH 7.0 - 4.9.

7) Different methods to purify proteins were tested for usefulness to purify phosphatase(s) from retina-extract. The optimized conditions are described.

- Gel-filtration (Aca 44) leads to elution of phosphatase-activity in a MW- range of 100 kDa.
- Phosphatase(s) bind (s) to anion-exchanger (Q-Sepharose Fast-Flow) and is (are) eluted with approximately 400 mM NaCl.
- Adsorption-Chromatographie of retina-extract leads to binding of the phosphatase(s) to the matrix (Hydroxylapatit). The elution of the enzyme(s) is caused by a NaPP-concentration within a range of 50 - 100 mM.
- Affinity-chromatographie (Affi-Gel-Blue) leads to a separation of "non-phosphatase-proteins" of about 90 % (w/w) from phosphatase(s). The phosphatase(s) is (are) eluted at an ionic-strength of 500 mM NaCl.

Due to the high loss of activity during the purification steps it was not yet possible to obtain active homogenous phosphatase(s). For this purpose higher amounts of retina extract should be used.

On the base of my results for the different purification methods I propose a possible efficient sequence of different methods to purify the phosphatase(s).

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cpm	counts per minute
CMC	kritische Micellarkonzentration
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Hepes	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
PG	durchschnittlicher Phosphorylierungsgrad
PNPP	para-Nitrophenylphosphat
PDE	Phosphodiesterase
Rhod.	Rhodopsin
ROS	rod outer segment
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMLE	Sucrosemonolaurylester
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Signaltransduktion bei der Photorezeption von Vertebraten

Photorezeptorzellen sind spezialisierte Nervenzellen, welche in der Lage sind, Licht (Photonen) zu absorbieren und diesen "Außenreiz" in elektrische Impulse und damit in die "Sprache" des Nervensystems zu übersetzen (Stieve, 1986).

Die für das scotopische Sehen (Dämmerungssehen) der Vertebraten verantwortlichen Photorezeptorzellen sind die Stäbchen.

Die Stäbchenzellen sind sowohl morphologisch als auch funktionell in drei Abschnitte gegliedert:

- das Stäbchen-Außensegment (ROS)
- das Stäbchen-Innensegment
- ein Abschnitt mit Nervenfortsatz bis zur Synapse.

Die Stäbchen-Außensegmente, die den Ort der Photorezeption darstellen, enthalten dichtgepackt Membranstapel (Disks). Beim Rind enthält ein ROS etwa 500 bis 1000 Disks.

Der eigentliche Rezeptor für Licht ist das Rhodopsin. Dieses liegt als integrales Membranprotein in den Diskmembranen vor. Die Diskmembranen sind mit der Zellmembran unverbunden. Demnach ist das Rhodopsin topographisch von dieser separiert.

Die elektrophysiologisch meßbare Antwort der Zelle nach Belichtung besteht in einer Hyperpolarisation der Zellmembran: Im Dunkeln sind die spannungsunabhängigen Kationen-Kanäle des Außensegments geöffnet. Diese werden jedoch bei Belichtung geschlossen. Die Folge hiervon ist eine Abnahme des hauptsächlich von Natrium-Ionen getragenen Stromes. Der hiervon unbeeinflusste K^+ -Ausstrom aus dem Innensegment der Zelle in Richtung auf das K^+ -Gleichgewichtspotential führt zur Hyperpolarisation der Zelle.

Die funktionelle Koppelung (Signaltransduktion) von Rezeptor und Reizantwort erfolgt innerhalb einer "lichtaktivierten Enzymkaskade" über einen second-messenger. Als second-messenger fungiert das zyklische GMP (cGMP). Das cGMP hält im Dunkeln die Na^+ -Kanäle geöffnet (Koch & Kaupp, 1985; Fesenko et al., 1985; Yau & Fong, 1985).

Die cGMP-Konzentration innerhalb der Zelle wird über eine lichtaktivierte Enzymkaskade gesteuert. Diese Enzymkaskade beruht auf den spezifischen Wechselwirkungen zwischen belichtetem Rhodopsin und löslichen bzw. peripher gebundenen Membranproteinen des Stäbchenaußensegmentes (Pfister et al., 1983; Kühn, 1984; Stryer, 1987; Deterre et al., 1987).

Das Rhodopsin durchläuft nach Belichtung verschiedene spektroskopisch nachweisbare Zustände (Hofmann, 1986). Konformationsänderungen im Chromophorbereich (11-cis-Retinal geht über in all-trans-Retinal) bewirken Konformationsänderungen im peripheren cytoplasmatischen Bereich des Proteins.

Diese Konformationsänderungen ermöglichen peripheren und löslichen Proteinen (Enzymen) die "Unterscheidung" zwischen "unbelichtetem" und "belichtetem" Rhodopsin (Kühn, 1984; Stryer, 1987).

Transducin (T) (G-Protein) bindet an das photoaktivierte Rhodopsin (Godchaux et al., 1979; Kühn, 1980; Fung et al., 1981; Kühn et al., 1981; Baehr et al., 1982). Aufgrund dieser Bindung erfolgt an der α -Untereinheit des Transducins ein Nukleotidaustausch ($T\gamma\alpha\text{-GDP} \rightarrow T\gamma\beta + T\alpha\text{-GTP}$). Die nach dem Nukleotidaustausch+ aktivierte $T\alpha\text{-GTP}$ -Untereinheit des Transducins ist ihrerseits in der Lage eine Phosphodiesterase (PDE) durch Bindung einer inhibitorischen γ -PDE-Untereinheit (Yamazaki et al., 1983; Deterre et al., 1986; Deterre et al., 1988) zu aktivieren.

Die aktivierte PDE hydrolysiert den second-messenger (cGMP) zu 5'-Guanosinmonophosphat (5'-GMP). Die Abnahme der cGMP-Konzentration führt zum Schließen der Kationenkanäle im Stäbchenaußensegment.

Die lichtaktivierte Enzymkaskade ist zweistufig verstärkt: Jedes lichtaktivierte Rhodopsin ist in der Lage, etwa 500 bis 1000 Transducine zu aktivieren.

Die aktivierten $T\alpha\text{-GTP}$ -Untereinheiten aktivieren stöchiometrisch die PDE.

Jede aktivierte PDE hydrolysiert etwa 2000-4000 cGMP zu 5'-GMP. Demnach werden pro lichtaktiviertem Rhodopsin größenordnungsmäßig etwa 10^6 Moleküle cGMP hydrolysiert.

Das lichtaktivierte Rhodopsin wird sowohl unter in vivo- als auch unter in vitro-Bedingungen von einer rhodopsinspezifischen Kinase phosphoryliert (Kühn & Dreyer, 1972; Kühn et al., 1973; Bownds et al., 1972; Kühn, 1974; Frank & Buzney, 1975; Weller et al., 1975; McDowell & Kühn, 1977; Wilden, 1981; Wilden & Kühn, 1982). Hierbei wird die γ -Phosphat-Gruppe des ATP kovalent an Serin bzw. Threonin gebunden (Kühn & Dreyer, 1972).

Sieben Phosphorylierungsstellen (Hargrave et al., 1980) befinden sich im Bereich des C-Terminus (Ser³³⁴ - Ser³⁴³). Weitere Phosphorylierungsstellen (ein Serin, vier Threonin) befinden sich im loop, der die Helices V und VI miteinander verbindet. Mindestens einer dieser Reste im loop ist einer Phosphorylierung zugänglich (McDowell et al., 1984).

Von entscheidender Bedeutung innerhalb der lichtaktivierten Enzymkaskade ist ein weiteres lösliches Protein, das Arrestin.

Das Arrestin bindet lichtabhängig an phosphoryliertes Rhodopsin und inhibiert somit kompetitiv die Bindung von Transducin ans lichtaktivierte Rhodopsin (Wilden et al., 1986).

In diesem Zusammenhang wird die Phosphorylierung des Rhodopsins nicht mehr verstanden als möglicher Mechanismus eines Adaptationsprozesses (Miller et al., 1975; Kühn & Bader, 1976; Kühn et al., 1977) sondern vielmehr als Abschaltmechanismus der lichtaktivierten Enzymkaskade (Wilden et al., 1985).

Im Gegensatz zur Phosphorylierung ist über die Dephosphorylierung des Rhodopsins recht wenig bekannt. Sowohl unter in vivo-Bedingungen (Kühn, 1974) als auch unter in vitro-Bedingungen (Miller & Paulsen, 1975; Miller et al., 1977) wurde für Frosch-Rhodopsin eine quantitative Dephosphorylierung des phosphorylierten Rhodopsins beschrieben.

Unter in vivo-Bedingungen wurde für die Dephosphorylierung von Frosch-Rhodopsin eine Halbwertszeit von etwa 13 min ermittelt (Kühn, 1974).

Für Rinderrhodopsin wurde unter in vitro-Bedingungen nur eine teilweise Dephosphorylierung (maximal 40 %) beschrieben (Wilden, 1981).

Aus den in-vivo-Versuchen ist abzuleiten, daß sowohl die Phosphorylierung als auch die Dephosphorylierung des Rhodopsins Teile der "lichtaktivierten Enzymkaskade" unter physiologischen Bedingungen sind.

Die Funktion der Dephosphorylierung liegt sicherlich darin, den Rezeptor wieder in den perzeptionssensiblen Zustand zurückzuführen. Möglicherweise spielt sie hierbei auch eine Rolle bei der Regeneration des Opsins mit 11-cis-Retinal. Es ist aber auch denkbar, daß darüber hinaus die Phosphatase regulativ den Phosphorylierungsgrad des Rhodopsins und damit indirekt die PDE-Aktivierung beeinflußt.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

In biochemisch isolierten Systemen ist eine komplette Dephosphorylierung hoch phosphorylierten Rinderrhodopsins bisher nicht gelungen. Die hierbei auftretenden Probleme liegen sicherlich begründet in der Schwierigkeit, die optimalen Bedingungen für die an der Dephosphorylierung beteiligten Phosphatasen zu finden.

In dieser Arbeit wurden folgende Probleme untersucht:

- Wo ist die Rhodopsin-Phosphatase lokalisiert?
- Welches sind die optimalen Testbedingungen in vitro?
- Gibt es eine "latente" Phosphatase, die aktivierbar ist?
- Welche Form des Rhodopsins (belichtet/unbelichtet) ist das optimale Substrat für die Phosphatase?

Auf der Basis optimierter Dephosphorylierungsbedingungen war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Strategie zur Reinigung der Phosphatase zu entwickeln. Aus diesem Grunde sollten verschiedene Protein-Reinigungsmethoden auf ihre Tauglichkeit zur Reinigung einer spezifischen Rhodopsinphosphatase getestet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsobjekt

Für die Versuche wurden Rinderaugen verwendet, welche von R. Esser vom Schlachthof beschafft wurden. Nach dem Schlachten wurden die Augen sofort den Augenhöhlen entnommen und unter Lichtabschluß auf Eis gelagert. Im Labor wurden die Augen sofort weiterverarbeitet.

2.2 Präparation der Rinderretinen

Die Retinen wurden von T. Derichs präpariert. Alle Arbeiten wurden bei schwachem Rotlicht und bei 0 °C (Eisbad) durchgeführt. Nach der Präparation wurden die Retinen in flüssigem Stickstoff eingefroren und dunkel verpackt bei -80 °C aufbewahrt.

2.3 Präparation der Stäbchen-Außensegmente (ROS)

Die ROS wurden von T. Derichs und E. Wüst nach einer Standardmethode über eine Dichtezentrifugation (Wilden und Kühn, 1982) präpariert. Alle Arbeiten wurden bei schwachem Rotlicht ausgeführt, wobei die Rinderaugen ständig auf Eis gehalten wurden. Alle Präparationsschritte wurden in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer (KP-P) durchgeführt (100 mM Kalium-Phosphat; 1 mM $MgCl_2$; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT; pH 7.0). Die Pellets der gereinigten ROS wurden mit Argon überspült, in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit Alufolie lichtdicht verpackt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4 Extraktion löslicher Proteine aus Rinderretinen (RE-G)

Lösliche Proteine aus Rinderretinen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von U. Wilden (1986) extrahiert. Hierzu wurden die eingefrorenen Retinen im Dunkeln bei Raumtemperatur aufgetaut und mit hyptonischem Puffer versetzt (1 ml/Retina). Für verschiedene Fragestellungen wurden unterschiedliche Puffer eingesetzt: Tris-HCl-Puffer, Hepes-Puffer, Na-Acetat-Puffer (20 mM Puffer, 1 mM DTT). Die in verschiedenen Versuchen je nach Fragestellung verwendeten Puffer sind im Ergebnisteil angegeben. Die Retinen wurden auf Eis stehend 30 min sehr langsam gerührt. Die Suspension wurde dann 30 min bei 50.000 g zentrifugiert (Beckman JA 20 Rotor). Der Überstand wurde erneut für 30 min zentrifugiert. Der endgültige Retinen-Gesamtextrakt (RE-G) wurde in Aliquots (0,5 ml) aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

In den Dephosphorylierungsversuchen wird die Enzym-Aktivität des Extraktes bezogen auf die Rhodopsinkonzentration bei der Extraktpräparation. Hierbei bin ich in einer groben Abschätzung, da aus ganzen Retinen die Protein-Extraktion sicher unvollständiger als vergleichbar bei der Extraktion aus ROS ist, von einer Rhodopsinkonzentration von 1 mg pro Retina ausgegangen. Tatsächlich liegt die Rhodopsinkonzentration in einem Bereich der etwa um einen Faktor 1,5 höher liegt.

2.5 Extraktion löslicher Proteine aus Stäbchenaußensegmenten (ROS)

2.5.1 Extraktion löslicher Proteine aus unbelichteten ROS (Dunkelextrakt) (Kühn, H. 1981)

2.5.1.1 Isotonisch lösliche Proteine (DE-1)

Die ROS-Pellets wurden bei schwachem Rotlicht aufgetaut und in isotonischem Puffer (10 mM Hepes bzw. 10 mM Tris/HCl, 120 mM mM NaCl, 1 mM MgCl, 1 mM DTT, pH 7.0) aufgenommen. Die Rhodopsinkonzentration betrug 5 mg Rhodopsin/ml Puffer. Die Suspension wurde auf Eis stehend homogenisiert, 15 min auf Eis belassen und anschließend zentrifugiert (Beckman-Rotor JA-20, 50.000 g, 4 °C, 30 min).

Der Überstand wurde unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der endgültige Überstand (DE-1) wurde abgenommen und in Portionen von 0,5 - 1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.1.2 Hypotonisch lösliche Proteine (DE-2)

Das verbleibende Pellet der isotonischen Extraktion wurde in hypotonischem Puffer (10 mM Hepes bzw. 10 mM Tris/HCl, 1 mM MgCl, 1 mM DTT, pH 7.0) aufgenommen, erneut bei 0 °C homogenisiert, 15 min auf Eis belassen und anschließend erneut zentrifugiert (Beckman-Rotor JA-20, 50.000 g, 4 °C, 30 min).

Der Überstand wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (Beckman-Rotor JA-20, 50.000 g, 4 °C, 30 min) und der endgültige hypotonische Überstand (DE-2) in Portionen von 0,5 - 1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.1.3 Gesamtextrakt löslicher Proteine (DE-G)

Frische ROS-Pellets wurden nach dem Auftauen sofort in hypotonischem Puffer aufgenommen (Kühn et al., 1981). Die Präparation des Gesamt-Extraktes (DE-G) erfolgte entsprechend 2.5.1.2.

2.5.2 Extraktion löslicher Proteine aus belichteten ROS (Lichtextrakt) (Kühn, H. 1981)

Nach Auftauen und Homogenisieren der ROS in den entsprechenden Puffern (5 mg Rhodopsin/ml Puffer) wurden die Suspensionen zur Gewinnung der löslichen Proteine aus belichteten ROS (LE-1, LE-2, LE-G) im Wasserbad auf 20 °C temperiert (3 min) und anschließend im Wasserbad auf ein Plexiglasfilter ($\lambda > 540$ nm) belichtet (5 min) (OSRAM concentra R 125, 30 cm Abstand). Anschließend wurden die Proben bei Raumlicht für 15 min auf Eis gehalten und im folgenden präpariert wie für die Dunkelextrakte beschrieben (2.5.1.1 - 2.5.1.3).

2.6 Rhodopsinphosphorylierung

Ausgehend von ROS-Pellets wurde Rhodopsin nach einer Standardmethode (Wilden & Kühn, 1982) phosphoryliert.

2.6.1 Vorbehandlung der ROS

Eingefrorene ROS-Pellets wurden aufgetaut in Na-Phosphat-Puffer (100 mM Na-Phosphat, 1 mM MgCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.2 - 7.3) aufgenommen, und auf eine Endkonzentration von etwa 0,5 mg Rhodopsin/ml Puffer eingestellt. Die Suspension wurde auf Eis stehend homogenisiert und Aliquots zur genauen Rhodopsinkonzentrationsbestimmung entnommen. Die Rhodopsinkonzentration wurde spektralphotometrisch über die Extinktion bei 500 nm ($\epsilon = 40.000$) in Gegenwart von 1 % Emulphogen und 50 mM Hydroxylamin) bestimmt (Kühn, 1978).

2.6.2 ATP-Stammlösung

Eine nicht radioaktiv markierte ATP-Stammlösung wurde nach Molekulargewicht berechnet und angesetzt (pH 7.0). Die genaue ATP-Konzentration wurde spektralphotometrisch (OD-260, molarer Extinktionskoeffizient: 15.400) bestimmt. Die Konzentration der verschieden verwendeten ATP-Stammlösungen lag immer im Bereich zwischen 200 und 300 mM.

2.6.3 AT^{32}P -Lösung

Die nicht radioaktiv markierte ATP-Stammlösung wurde mit frisch gelieferter AT^{32}P -Lösung (NEN Research Products) versetzt, die Radioaktivität (cpm) bestimmt (TRI-CARB 2000 CA, Packard).

Die spezifische Aktivität (cpm/nMol ATP) errechnet sich aus der gemessenen Aktivität und der ATP-Konzentration. Die spezifische Aktivität lag in Abhängigkeit von der zu phosphorylierenden Rhodopsinmenge im Bereich zwischen 8.000 und 15.000 cpm/nmol ATP.

2.6.4 Phosphorylierung

Die Rhodopsinsuspension (siehe 2.6.1) wurde mit AT^{32}P -Lösung versetzt und auf eine Gesamt-ATP-Konzentration von 3 mM ATP gebracht. Die Suspension wurde zur Durchmischung vorsichtig umgeschüttelt und anschließend eine Minute beschallt (Ultramat III). Die Suspension wurde im Dunkeln ins Wasserbad überführt und zur Temperierung weitere 5 Minuten darin belassen. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Einschalten der Beleuchtung (OSRAM concentra R 125, 30 cm Abstand) gestartet.

Um einen möglichst hohen durchschnittlichen Phosphorylierungsgrad (PG) zu erreichen wurde die Suspension bei gelegentlichem leichten Umschütteln für drei Stunden belichtet. Wurden niedrigere durchschnittliche Phosphorylierungsgrade angestrebt, wurden Aliquots entnommen und die Phosphorylierungsreaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe eines 4-fachen molaren Überschusses EDTA (12 mM) gestoppt. "Durch EDTA wird für den enzymatischen Prozess der Phosphorylierung notwendiges Mg^{2+} chelatartig gebunden und somit die Phosphorylierung gestoppt" (Wilden, 1981).

2.6.5 Regeneration mit 11-cis-Retinal

Nach der Inkubation wurde die gesamte gebleichte ROS-Suspension (phosphoryliertes Rhodopsin) oder entsprechend kleinere Aliquots im Dunkeln mit einem 4-fachen molaren Überschuß an 11-cis-Retinal über Rhodopsin versetzt. Die Proben wurden leicht geschüttelt, eine Minute im Ultraschallbad (Ultramat III) beschallt und über Nacht im Dunkelkasten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nicht zu regenerierendes Opsin wurde entsprechend den zu regenerierenden Proben über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Am folgenden Morgen wurden den regenerierten Proben nach Schütteln Aliquots entnommen und die Rhodopsinkonzentration spektralphotometrisch bestimmt (Kühn, 1978). In allen Fällen wurde eine Regeneration im Bereich zwischen 97 % und 105 % erzielt. (Regeneration oberhalb von 100 % spiegeln eine "Vorbleichung" des Rhodopsins wieder.)

2.6.6 Waschung des phosphorylierten Rhodopsins/Opsin

Nach der Regeneration wurden die phosphorylierten Membranen (phosphoryliertes Rhodopsin/Opsin) in einer Beckman-Zentrifuge (Beckman-Rotor JA-20, 50.000 g, 4 °C, 45 min) pelletiert. Die Überstände wurden abdekantiert. Die Pellets wurden in hypotonischem Puffer (20 mM Hepes; 1 mM DTT; pH 7.2 bzw. 20 mM Na-Acetat; 1 mM DTT; pH 5.7) aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen in der Pipette resuspendiert und erneut zentrifugiert (Beckman-Rotor JA-20, 50.000 g, 4 °C, 60 min).

Diese hypotonischen Waschungen wurden zur Entfernung nicht-kovalent gebundenen ^{32}P und zur Entfernung peripher gebundener Proteine insgesamt viermal durchgeführt. Die Entfernung des nicht gebundenen ^{32}P wurde durch Abnahme von Aliquots der Überstände (300 μl) und Bestimmen der Aktivität derselben verfolgt. Nach der dritten Waschung konnte in den Überständen praktisch keine Restaktivität mehr nachgewiesen werden.

Die gewaschenen Pellets wurden in Puffer (20 mM Hepes; 1 mM DTT; pH 7,2 bzw. 20 mM Na-Acetat; 1 mM DTT; pH 5,6) aufgenommen (Rhodopsinkonzentration etwa 1 mg/ml) homogenisiert, und die genaue Rhodopsinkonzentration der regenerierten Proben spektralphotometrisch ermittelt. Eine Ermittlung der Rhodopsinkonzentration der nicht-regenerierten Proben (phosph. Opsin) ist spektralphotometrisch nicht möglich. Aus diesem Grunde wurde den nicht-regenerierten Proben nach dem Homogenisieren Aliquots entnommen (50 μl), in Szintillationscocktail überführt und die Aktivität bestimmt. Bei bekanntem durchschnittlichen Phosphorylierungsgrad (siehe 2.6.7) läßt sich die Rhodopsinkonzentration errechnen.

Die Proben wurden aliquotiert (0,5 ml bzw. 1 ml) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die regenerierten Proben wurden in Alufolie lichtdicht verpackt. Aufbewahrt wurden die Proben bei -80 °C.

2.6.7 Bestimmung des durchschnittlichen Phosphorylierungsgrades (PG)

Den phosphorylierten Suspensionen (regeneriert/nicht regeneriert) wurden Aliquots entnommen (50 μl) und in jeweils 1,2 ml Präzipitationslösung (25 % Trichloressigsäure, 5 mM H_3PO_4) gefällt. Die gefällten Proteine wurden drei Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge pelletiert und der Überstand dekantiert. Die Proben wurden, um nicht-kovalent gebundenes ^{32}P vollständig zu entfernen, dreimal mit Waschlösung (10 % Trichloressigsäure, 5 mM H_3PO_4) nachgewaschen (Zentrifugation jeweils 2 min). Im Anschluß wurden die Proben mit jeweils 1,2 ml Szintillationscocktail (Instagel, 10 % NCS-Gewebelöser, Amersham) versetzt, auf dem Vortex kurz

geschüttelt und auf dem Eppendorf-Schüttler bis zur vollständigen Auflösung des Pellets geschüttelt.

Im Szintillationszähler (TRI-CARB 2000 CA, Packard) wurde die Aktivität der einzelnen Proben bestimmt.

Der Phosphorylierungsgrad der einzelnen Proben errechnet sich aus der folgenden Gleichung:

$$\frac{\text{nmol Phosphat}}{\text{nmol Rhod.}} = \frac{\text{gemessene cpm} \times 41}{\text{spez. Akt.} \times \mu\text{g Rhod.}} \quad \frac{[\text{cpm} \times \text{nmol} \times \mu\text{g}]}{[\text{cpm} \times \text{nmol} \times \mu\text{g}]}$$

In den Phosphorylierungsversuchen wurden maximale durchschnittliche Phosphorylierungsgrade im Bereich zwischen 5,0 - 6,0 Mol Phosphat/Mol Rhodopsin erreicht.

2.7 Lipid-freie Rhodopsinpräparation

Die Lipid-freien Rhodopsinpräparationen wurden von U. Wilden durchgeführt.

Die Präparation erfolgte über Affinitätschromatographie (Concanavalin A-Sepharose) (Wilden, 1981).

Das Lipid-freie Rhodopsin (2,7 mg/ml) wurde in folgendem Puffer von der Säule eluiert: 2 mM Hepes, pH 7,2; 200 mM Methylmannosid, 1 % Zwittergent 3-12.

2.8 ROS-Lipid-Präparation

Chloroform - extrahierte ROS-Lipide wurden von U. Wilden präpariert.

Hierzu wurden ROS-Suspensionen in Puffer aufgenommen mit Chloroform versetzt und die Lipide im Schütteltrichter "ausgeschüttelt". Nach Phasentrennung wurden die in Chloroform gelösten Lipide von der wässrigen Phase abgetrennt und das Chloroform abgedampft (persönliche Information U. Wilden).

2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophoresen wurden nach Laemmli (1970) auf Plattengelen (180 x 130 x 1,5 mm) (Länge: 11 cm, Durchmesser: 0,5 cm) durchgeführt. Die Polyacrylamid-Konzentration betrug einheitlich 10 %. Die Denaturierung der Proben erfolgte normalerweise nach Zugabe von Laemmli-Probenpuffer bei 37 °C für 5 Minuten. (Abweichungen hiervon sind im Ergebnisteil angegeben.)

Die genaue Zusammensetzung der für die Gelelektrophorese verwendeten Lösungen ist im Anhang des methodischen Teils aufgeführt.

2.9.1 Anfärbung der Gele

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Proteinbanden mit Coomassie Brillant Blue sichtbar gemacht. Für Färbung und Entfärbung der Gele verwendete Lösungen: siehe Anhang des methodischen Teils.

2.9.2 Aufbewahrung der Gele

Angefärbte Plattengele wurden auf Papier (Whatman 3) getrocknet (BioRad, Gel Slab Dryer).

2.9.3 Gel-Autoradiographie

Getrocknete Plattengele wurden in einer Kodak X-OMATIC Kassette auf Hyperfilm-MP Röntgenfilm (Amersham) exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte mit handelsüblichen Röntgenfilm-Fotochemikalien.

2.10 Dephosphorylierungsversuche

Der Versuchsablauf ist in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt.

Die Dephosphorylierungsansätze (0,5 ml - 1,5 ml) wurden vorbereitet und bis zum Versuchsbeginn auf Eis gehalten.

Die Dephosphorylierungsansätze enthielten:

- ROS- bzw. Retinen-Extrakt

Als Maß für die eingesetzte Enzymmenge wird im Ergebnisteil die bei der Präparation zu Grunde liegende Rhodopsinmenge angegeben.

- Puffer

Es werden Versuche unter etwa physiologischen pH-Werten im Bereich von pH 7,1-7,3 und Versuche in einem für die Phosphatase optimalen sauren pH-Bereich von etwa 5,7 beschrieben. (Im Ergebnisteil ist der jeweilig verwendete Puffer (Tris/HCl; Hepes, Na-Acetat-Puffer) und der pH-Wert angegeben.

- Aktivierende bzw. inhibierende Faktoren

Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe des Substrates. Als Substrat wurde entweder ^{32}P -markiertes phosphoryliertes regeneriertes Rhodopsin oder ^{32}P -markiertes phosphoryliertes Opsin verwendet (siehe hierzu 3.2.1.3).

Nach Zugabe des Substrates (^{32}P -markiertes phosph. Rhodopsin bzw. Opsin) zu den Dephosphorylierungsansätzen, wurden diese auf einem Vortex kurz geschüttelt. Als Referenzproben wurden sofort zwei Aliquots (100 μl) entnommen und in 1 ml Präzipitationslösung (25 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA), 5 mM H_3PO_4) überführt. Die verbleibenden Dephosphorylierungsansätze wurden in ein Wasserbad (30 $^{\circ}\text{C}$) überführt. Zu verschiedenen Zeiten wurden nach kurzem Schütteln auf einem Vortex jeweils zwei weitere Aliquots entnommen und in Präzipitationslösung pipettiert. Die präzipitierten Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 $^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Im Anschluß wurden die präzipitierten Proben in einer Eppendorff-zentrifuge (3 min) pelletiert. Der Überstand, der das durch die Phosphataseaktivität hydrolysierte Phosphat enthält, wurde dekantiert und die Probe anschließend noch drei mal mit 1,2 ml Waschlösung (10 % (w/v) Trichloressigsäure, 5 mM H_3PO_4) gewaschen. Zur Bestimmung der verbliebenen kovalent gebundenen Radioaktivität wurde das Pellet mit 1,2 ml Szintillationscocktail (Instagel, 10 % NCS-Gewebelöser (Amersham)) versetzt. Zur Loslösung des Pellets von der Gefäßwand wurden die Proben auf einem Vortex bei maximaler Energie und anschließend auf einem Eppendorf-Schüttler bis zur vollständigen Auflösung des Pellets (30 - 60 min) geschüttelt.

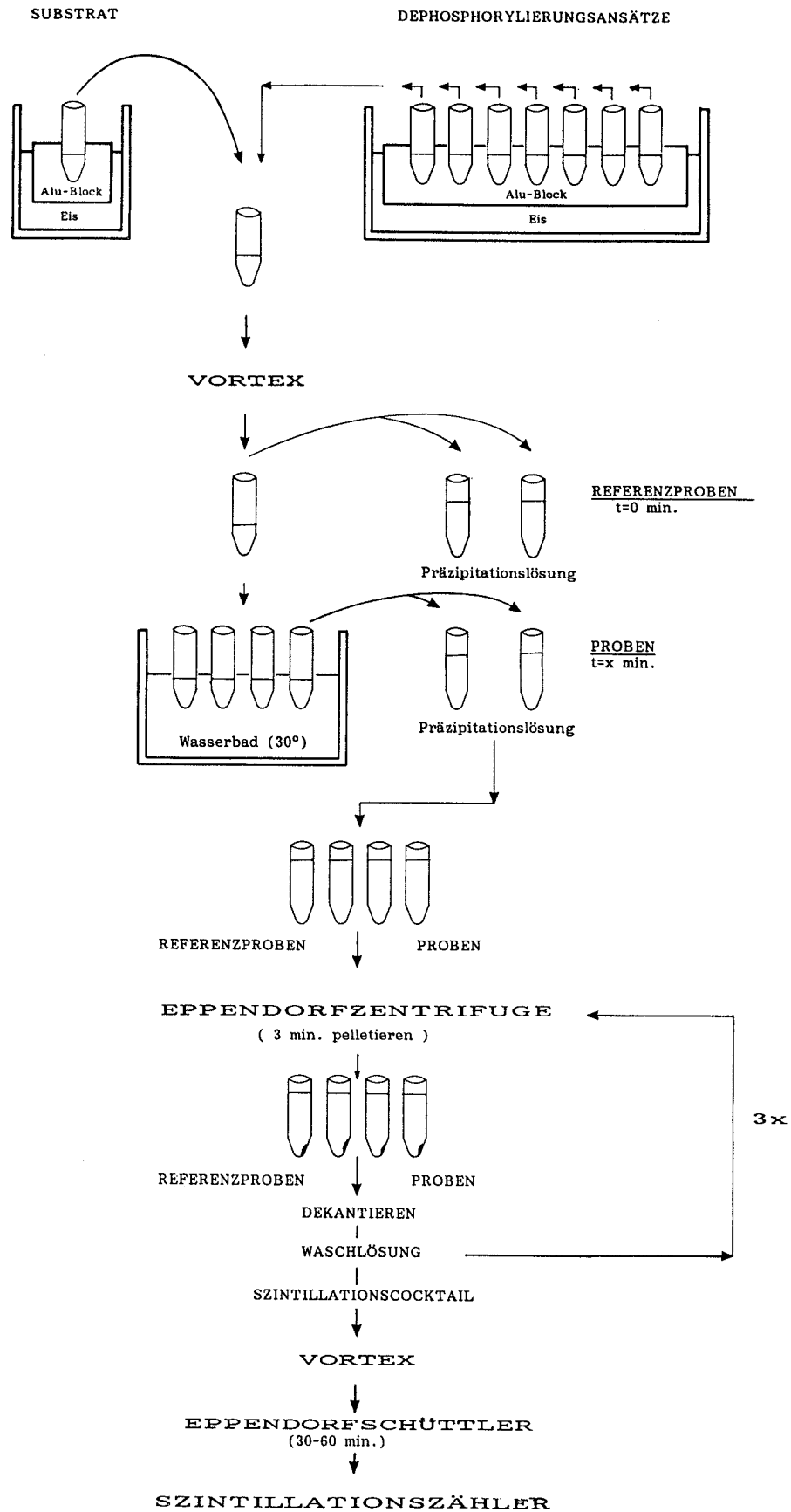
Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Szintillationszähler (TRI-CARB 2000 CA, Packard) bestimmt. Die aus den Parallelproben (jeweils zwei Proben) bestimmten Werte wurden miteinander verglichen und bei einer Abweichung kleiner als 5 % jeweils der Mittelwert bestimmt. Parallelproben mit Abweichungen größer als 5 % wurden bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Im Normalfall lagen die Abweichungen jedoch in einem Bereich kleiner 3 %.

Die Phosphataseaktivität verschiedener Dephosphorylierungsansätze wurde bestimmt als Differenz (Mittelwerte) der Radioaktivität (cpm) zwischen Referenzprobe und den zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben.

Die Phosphataseaktivität wird entweder angegeben als:

- % dephosphoryliertes Substrat nach einer definierten Zeit
- hydrolysiertes Mol Phosphat pro Mol Substrat
- spezifische Aktivität verschiedener Säulenfraktionen (pMol hydrolysiertes Phosphat pro μg Protein der verschiedenen Fraktionen).

Schematische Darstellung des Ablaufs der Dephosphorylierungsversuche



2.11 Säulenchromatographie

Es wurden Versuche zur Auftrennung der Retinengesamtextrakt-Proteine über verschiedene Säulenchromatographische Reinigungsverfahren durchgeführt. Alle Versuche wurden bei 4 °C (Kühllabor, Arbeitskühlschrank) durchgeführt.

2.11.1 Gel-filtration

Die Gel-Filtrationsversuche wurden auf einer Ultrogel-Aca 44-Säule (LKB) durchgeführt. Die Säule (75 x 2,5 cm) wurde in Puffer (20 mM Tris/HCl, 100 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, pH 7,2) equilibriert. Die Flußrate lag in verschiedenen Versuchen im Bereich zwischen 1,2 - 1,5 ml/min. Zur Eichung der Säule wurden Dextran-blue (MW 2×10^6 (Ausschlußgrenze)), Rinderserumalbumin (MW 67 kD), Ovalbumin (MW 43 kD) und Myoglobin vom Pferd (MW 17 kD) in Säulenpuffer gelöst und nach Aufgabe auf die Säule das Elutionsvolumen der verschiedenen Proteine bestimmt.

Die eigentliche Gelfiltration von Retinen-Extrakt wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Nach Aufgabe von Retinen-Extrakt auf die Säule wurden in unterschiedlichen Versuchen Fraktionen von 1,5 ml bis 2,5 ml in Eppendorf-caps aufgefangen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Fraktionen wurden bis zum anschließenden Phosphataseaktivitätstest (siehe 2.10) bei -80 °C aufbewahrt.

2.11.2 Anionen-Austausch-Chromatographie

Als Matrix für die Anionen-Austausch-Chromatographie wurde Q-Sepharose Fast-Flow (Pharmacia) verwendet. Diese Matrix wurde ausgewählt aufgrund ihrer hohen Proteinbindungskapazität (0,18 - 0,25 mmol/ml), was auch bei kleiner Dimensionierung der Säule eine quantitative Bindung der Proteine aus hochkonzentrierten Proteinlösungen wie z. B. Retinen-Extrakt gewährleistet.

Die Säule (0,7 x 13 cm) wurde mit der Matrix-Suspension gefüllt und nach dem Absetzen der Matrix mit einem 10-fachen Gelbettvolumen Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5) equilibriert. Die Flußrate wurde während des gesamten Ablaufs über eine Peristaltic-Pumpe konstant gehalten (0,45 ml/min). Nach dem Gießen wurde die Säule im Arbeitskühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Phosphatasereinigung wurde Retinen-Extrakt (0,4 ml/min) aufgetragen. Nach dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit 20 ml Puffer nachgewaschen. Die Proteine wurden anschließend entweder über einen Salzgradienten oder über verschiedene Salzstufen von der Säule eluiert. Der Salzgradient wurde mit einem in der

Werkstatt des Instituts angefertigten Gradientenmischer eingestellt. Die "Endreinigung" der Säule erfolgte schließlich mit einer Salzstufe (1000 mM NaCl).

Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden Fraktionen aufgefangen und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu den anschließenden Phosphataseaktivitätstests bei -80 °C aufbewahrt.

2.11.3 Adsorptions-Chromatographie

Als Adsorptionsmatrix wurde HA-Ultrogel (LKB) verwendet. Die Matrix wurde durch leichtes Schütteln suspendiert und auf die Säule (0,7 x 13 cm) gegossen (Gelbettvolumen 5 ml). Im Anschluß wurde die Säule mit dem dreifachen Gelbettvolumen mit Säulenpuffer (10 mM NaPP, pH 6,8; 1 mM DTT) equilibriert, wobei die Flußrate (0,24 ml/min) konstant gehalten wurde.

Zur Phosphatasereinigung wurde Retinen-Extrakt auf eine NaPP-Konzentration von 10 mM gebracht und bei einer Versuchstemperatur von 4 °C auf die Säule aufgetragen (Flußrate 0,2 ml/min).

Die Säule wurde mit Säulenpuffer nachgewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte stufenweise mit unterschiedlichen NaPP-Konzentrationen. Die Endreinigung der Säule erfolgte mit 500 mM NaPP bei Raumtemperatur. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt (Bradford) und die Fraktionen anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.11.4 Affinitäts-Chromatographie

Affi-Gel-Blue (BioRad) wurde als Säulenmatrix verwendet. Die Säule (0,7 x 11 cm) wurde nach Suspendierung der Matrix in Säulenpuffer gegossen. Nach dem Absetzen der Matrix wurde die Säule bei 4 °C mit Säulenpuffer (20 mM Hepes; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT) equilibriert. Die Flußrate wurde konstant gehalten (0,2 ml/min).

Nach Aufgabe von Retinen-Extrakt auf die Affi-Gel-Blue-Säule wurde die Säule mit einem mehrfachen des Gelbettvolumens mit Säulenpuffer nachgewaschen. Die an die Matrix gebundenen Proteine wurden in verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Elutionsmitteln eluiert: verschiedene NaCl-Stufen bzw. NaCl-Gradient; ATP (10 mM). Während der Versuche wurde die Elution durch Proteintests (Bradford) verfolgt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu den Phosphataseaktivitätstests bei -80 °C aufbewahrt.

2.12 Isoelektrische Fokussierung

Die Fokussierungen wurden in Rundgelen durchgeführt (Länge: 11 cm, Durchmesser: 0,5 cm). Die Glasröhrchen wurden zur Entfernung etwaiger Detergenzrückstände im Chromschwefelsäurebad gereinigt und anschließend mit H_2O bidest gespült.

2.12.1 Gelzusammensetzung

Die Acrylamidkonzentration betrug 5,5 % (w/v), der pH-Gradient wurde mit Ampholinen (LKB) des pH-Bereichs 3,5-10 eingestellt (Ampholin-Endkonzentration: 5 % (v/v)).

2.12.2 Fokussierbedingungen

Die Gele wurden bei 4 °C in die Versuchsanordnung eingebracht und mit 100 µl verdünntem Probenpuffer (10 % (w/v) Sucrose, 0,6 % (v/v) Ampholin (pH 3,5-10), 16 mM Tris/HCl, pH 7.2) überschichtet. (Elektrodenlösungen: 20 mM NaOH (kathodal), 50 mM H_3PO_4 (anodal).)

Zur Einstellung des pH-Gradienten wurden die Gele bei einer Leistung von 0,5 Watt/Gel und offener Stromstärke bzw. Spannung eine Stunde präfokussiert. Die Gele wurden im Anschluß wiederum mit verdünntem Probenpuffer überschichtet (15 % (w/v) Sucrose, 1,2 % (v/v) Ampholin (pH 3,5-10), 33 mM Tris/HCl, pH 7.2) und die Proben (1 : 1 verdünnt) in Probenpuffer (60 % (w/v) Sucrose, 4 % (v/v) Ampholin pH 3,5-10, 100 mM Tris/HCl, pH 7.2) unterschichtet. Die Gele wurden im Kühlraum (4 °C) sieben Stunden fokussiert (offene Stromstärke bzw. Spannung, Leistung limitierend mit 0,5 Watt/Gel). Als Spannungsquelle diente ein LKB 2197 Power Supply.

2.12.3 Behandlung der Gele nach der Fokussierung

2.12.3.1 pH Gradient-Bestimmung

Einzelne Rundgele wurden den Glasröhrchen entnommen, mit einem Skalpell in 0,5 cm lange Stücke geschnitten und zur Elution der Ampholine in jeweils 1 ml 100 mM NaCl Lösung überführt. Die Proben wurden auf dem Eppendorf-Schüttler eine Stunde geschüttelt und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Am folgenden

Morgen wurden die Proben auf dem Vortex geschüttelt und der pH-Wert in den einzelnen Proben bestimmt. Die Mittelwerte aus drei Parallelproben wurden zur Festlegung des pH-Gradienten herangezogen. Die Abweichungen zwischen den Parallelproben war in keinem Fall größer als 3 %.

2.12.3.2 Anfärbung der Isoelektrischen Gele

Zum Auswaschen der Ampholine und zur Fixierung der Proteine wurden die Gele nach der Fokussierung in 20 % (w/v) Sulfosalicylsäure überführt und hierin über Nacht, bei leichtem Rühren belassen. Im Anschluß an die Sulfosalicylsäurebehandlung wurden die Gele mehrere Stunden in Coomassie-Färbelösung angefärbt und anschließend in Essigsäure/Ethanol-Lösung entfärbt (siehe Anhang des methodischen Teils).

2.12.3.3 Enzymaktivitätsfärbung

Die Substrat-Lösung für den Phosphatase-Aktivitätsnachweis wurde nach einer Vorschrift von Harris & Hopkins (1976) erstellt, wobei der verwendete Puffer und der pH-Wert auf optimale Bedingungen einer sauren Phosphatase abgeändert wurde. Hierzu wurden sowohl O-dianisidine tetrazotized (Sigma) als auch β -Naphthyl acid phosphat in einer Konzentration von 0,5 mg/ml getrennt in Puffer (20 mM Na-Acetat, pH 5,7) frisch angesetzt. Beide Lösungen wurden kurz vor Versuchsbeginn zusammengegeben. Die Gele wurden den Glasröhrchen entnommen, in die Substratlösung überführt und für 12 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Bei Substratumsatz durch eine Phosphatase bildet sich ein schwerlösliches, dunkel-rot bis violettes Endprodukt.

2.13 Anhang des methodischen Teils

Proteinbestimmung:

Die Proteinbestimmungen wurden in BioRad Protein-Reagenz nach Bradford (1976) durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde Rinder-Serumalbumin verwendet.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970).

Verwendete Lösungen:

Trenngel Puffer:

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

0,4 % SDS

Sammelgel-Puffer:

0,5 M Tris/HCl

0,4 % SDS

Acrylamid/Bis-Lösung:

30 % Acrylamid

0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid in H₂O bidest.

Ammonium-peroxodisulfat-Lösung (APS):

10 % (NH₄)₂ S₂O₈ in H₂O bidest.

Trenngel:

10 ml Trenngel-Puffer

13,33 ml Acrylamid/Bis-Lösung

16,52 ml H₂O bidest.

125 µl APS

25 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramthylethylendiamin)

Sammelgel:

2,5 ml Sammelgel-Puffer

1 ml Acrylamid/Bis-Lösung

6,5 ml H₂O bidest.

100 µl APS

10 µl TEMED

SDS-Probenpuffer:

100 mM Tris/HCl pH 6,8

5 % SDS

5 % 2-Mercaptoethanol

15 % (v/v) Glycerin

0,004 % Bromphenolblau

Elektrodenpuffer:

25 mM Tris/HCl, pH 8,3

192 mM Glycin

0,1 % SDS

Coomassie-Färbelösung:

0,2 % (w/v) Coomassie-Brillant Blue R 250

50 % (v/v) Ethanol

7 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

20 % (v/v) Ethanol

8 % (v/v) Essigsäure

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt bzw. Retinen-Extrakt

Unter in vitro-Bedingungen ist eine quantitative Dephosphorylierung hoch phosphorylierten Rhodopsins bisher nicht beschrieben. Ein erstes vordringliches Ziel meiner Arbeit war es, herauszufinden, welche die geeignetsten Präparationsbedingungen für die Phosphatase sind und unter welchen Versuchsbedingungen das Enzym unter in-vitro-Bedingungen optimal arbeitet, das heißt phosphoryliertes Rhodopsin möglichst quantitativ dephosphoryliert.

Zu Beginn dieser Arbeit konnte ich zurückgreifen auf die Versuche von U. Wilden (1981), aus denen sich folgende Aussagen zu optimalen Dephosphorylierungsbedingungen oder Phosphataseaktivität ableiten lassen:

- Das Inkubationsmedium sollte kein Phosphat und möglichst wenig ATP enthalten.
- Die Dephosphorylierung erfolgt unabhängig von den Belichtungsverhältnissen.
- EDTA in einer Konzentration von 10 mM beeinflusst die Dephosphorylierung nicht; zweiwertige Kationen scheinen demnach nicht erforderlich zu sein.
- Die Dephosphorylierung ist abhängig von der Ionenstärke des Inkubationsmediums: eine hohe Ionenstärke hemmt die Dephosphorylierung.

Diese Ergebnisse wurden mit ROS-Suspensionen als Phosphatasequelle gewonnen. Als Substrat diente hoch phosphoryliertes Rhodopsin. Da die Phosphatase möglicherweise ein lösliches Protein ist, kommt als Phosphatasequelle neben "ganzen ROS" auch ROS-Extrakt oder Retinen-Extrakt als Phosphatasequelle in Frage.

In ersten Dephosphorylierungsversuchen habe ich sowohl ROS-Extrakt als auch Retinen-Extrakt eingesetzt. Die Dephosphorylierung des eingesetzten Substrates von maximal 30 - 40 % entspricht größenordnungsmäßig den Ergebnissen mit ROS-Suspensionen als Phosphatasequelle (U. Wilden, 1981). Die Phosphatase liegt demnach sehr wahrscheinlich nicht membrangebunden vor. Eine Erhöhung der Aktivität von Phosphatasen aus verschiedenen Geweben durch Zugabe zweiwertiger Kationen (Ca, Mg, Mn, Zn) ist vielfach in der Literatur beschrieben.

Weder in ROS- noch in Retinen-Extrakt ließen sich die Phosphataseaktivitäten durch Zugabe zweiwertiger Kationen (Ca, Mg, Mn, Zn) aktivieren. Dieses Ergebnis entsprach aufgrund der Versuche von U. Wilden (1981) der Erwartung.

Für Frosch-Rhodopsin ist in der Literatur (Miller & Paulsen, 1975) eine quantitative Dephosphorylierung des Substrates bei Verwendung von Retinen-Extrakt als Phosphatasequelle in Anwesenheit von Detergenz (DTAB) beschrieben.

Abb. 1 zeigt die Ergebnisse von Dephosphorylierungsversuchen mit hoch-phosphoryliertem Rinderrhodopsin als Substrat und ROS- bzw. Retinen-Extrakt als Phosphatasequelle in An- und Abwesenheit von Detergenz (Octylglucosid).

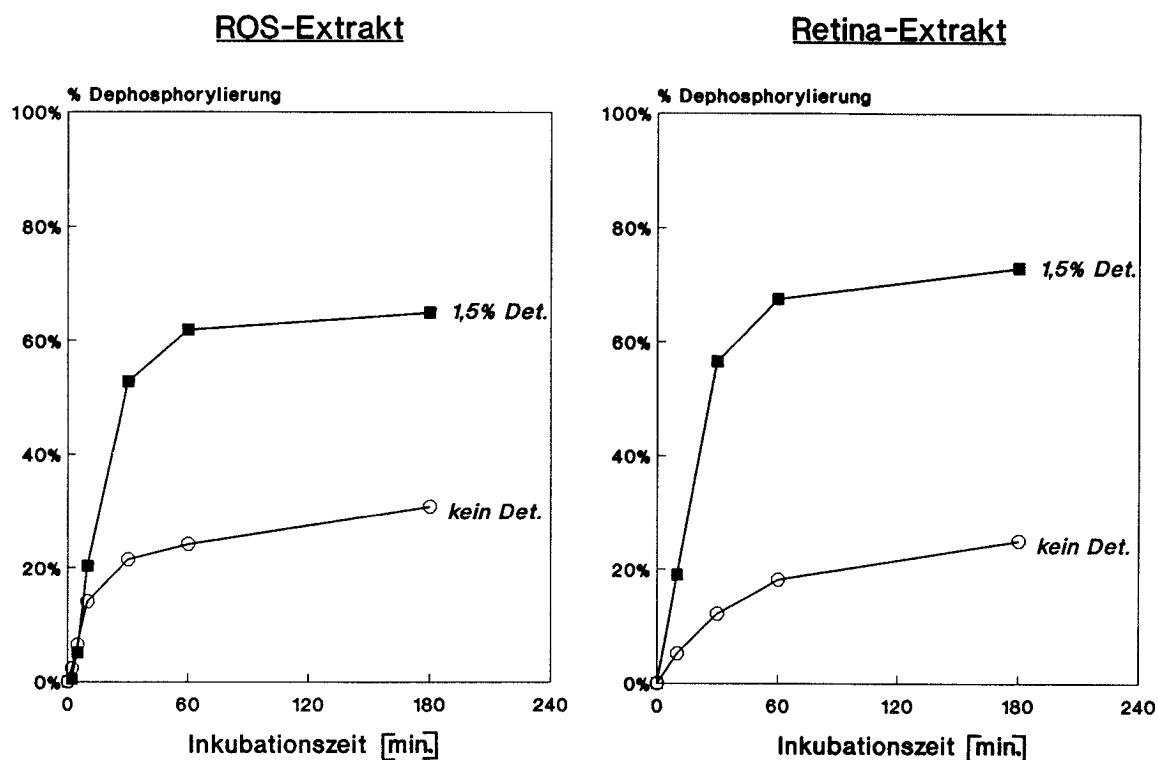


Abb.1a

Abb.1b

Abb. 1

Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt (DE-G) (Abb. 1a) bzw. von Retinen-Extrakt (RE-G) (Abb. 1b) in Abhängigkeit von Detergenz im Dephosphorylierungsansatz:

Abb. 1a

Dephosphorylierungsansatz:

19 μ M DE-G (Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5)).

6 μ M phosp. Rhodopsin (PG: 5,97)

20 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,66; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; + 1,5 % Octylglucosid

Abb. 1b

Dephosphorylierungsansatz:

0,25 μ M RE-G (Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.4)).

6,5 μ M phosp. Rhodopsin (PG: 5,97)

20 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,66; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; + 1,5 % Octylglucosid.

Offensichtlich wird durch das Detergenz die Phosphataseaktivität erheblich gesteigert. Dies gilt sowohl für die aus ROS als auch für die aus ganzen Retinen extrahierte Phosphatase.

In Anwesenheit von Detergenz wird, abhängig von der eingesetzten Menge Extrakt und weiterer optimierter Versuchsbedingungen (siehe nachfolgende Kapitel) eine quantitative Dephosphorylierung des Substrates erreicht.

Die "Aktivierbarkeit" der Phosphatase durch Detergenz war Grundlage sich anschließender Versuche zur Optimierung der Dephosphorylierungsbedingungen.

3.1.1 Phosphataseaktivität in Abhängigkeit vom verwendeten Detergenz

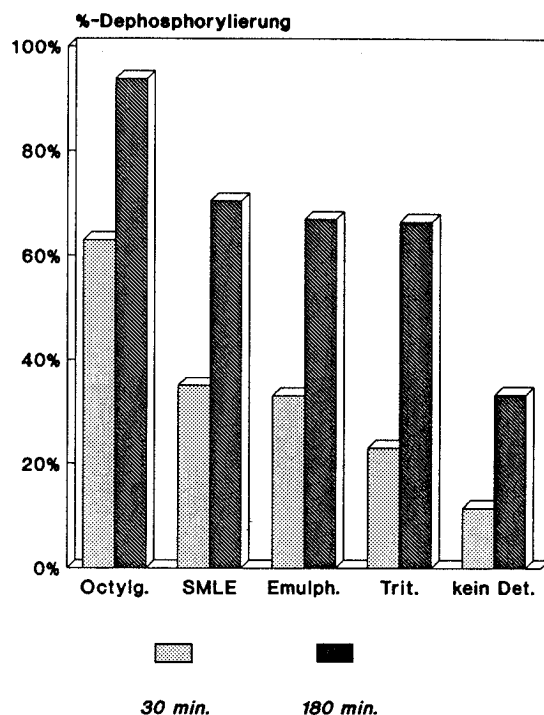
Eine maximale Dephosphorylierung phosphorylierten Rhodopsins wurde in Anwesenheit von Detergenz in den Versuchsansätzen erreicht.

Mit verschiedenen nichtionischen Detergenzien ist die Phosphatase in unterschiedlichem Maße zu "aktivieren". (Abb. 2 zeigt die Phosphataseaktivität (%-Dephosphorylierung) in Anwesenheit verschiedener Detergenzien im Vergleich zu Versuchen ohne Detergenz nach einer Reaktionszeit von 30 bzw. 180 min.

Die Versuchsansätze enthielten jeweils 2 % (w/v bzw. v/v) des entsprechenden Detergenz. Damit unterscheiden sich die Versuchsansätze hinsichtlich der Detergenzkonzentration. Diese lag aber in allen Fällen weit oberhalb der kritischen Micellarkonzentration, so daß die Versuche miteinander vergleichbar sind. Als Substrat wurde in diesem Fall phosphoryliertes Opsin eingesetzt (siehe Legende zu Abb. 2). Die Versuchsergebnisse sind hiervon unbeeinflusst, da die Phosphatase unterschiedliche Substratformen des Rhodopsins gleichermaßen dephosphoryliert (siehe 3.2.1.3).

Alle Versuche mit Detergenzien zeigen im Vergleich zu Versuchen ohne Detergenz eine erhöhte Phosphataseaktivität. Die höchsten Dephosphorylierungen wurden bei Verwendung von Octylglucosid erreicht.

Aus diesem Grunde wurden alle weiteren Dephosphorylierungsversuche in Anwesenheit von Octylglucosid durchgeführt.

**Abb. 2**

Vergleich verschiedener nichtionischer Detergenzien

Dephosphorylierungsansätze:

1,25 μ M Retinen-Extrakt (RE-G)

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.4))

5,0 μ M phosph. Opsin (PG 6,09)

10 mM Tris/HCl pH 7,3; 1 mM DTT; 1 mM MgCl, Detergenz:

2 % (w/v) Octylglucosid; 2 % (w/v) SMLE (Sucrosemonolaurylester);

2 % (v/v) Emulphogen; 2 % (v/v) Triton-X-100

3.1.2 Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration (Octylglucosid)

Zur weiteren Optimierung der Dephosphorylierungsbedingungen wurde die Detergenz-Konzentrationsabhängigkeit der Phosphataseaktivität bestimmt. Die kritische Micellarkonzentration (CMC) von Octylglucosid liegt in einem Bereich von 20 - 25 mM (Rosevear, 1980).

Versuche mit unterschiedlichen Octylglucosid-Konzentrationen zeigen (s. Abb. 3), daß für eine optimale Phosphataseaktivität eine Octylglucosid-Konzentration oberhalb der kritischen Micellarkonzentration notwendig ist. Konzentrationen unterhalb der CMC bewirken eine leichte Aktivitätsabnahme.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in weiteren Versuche jeweils eine Detergenzkonzentration von etwa 50 mM verwendet (1,5 % (w/v)), was etwa der doppelten CMC entspricht.

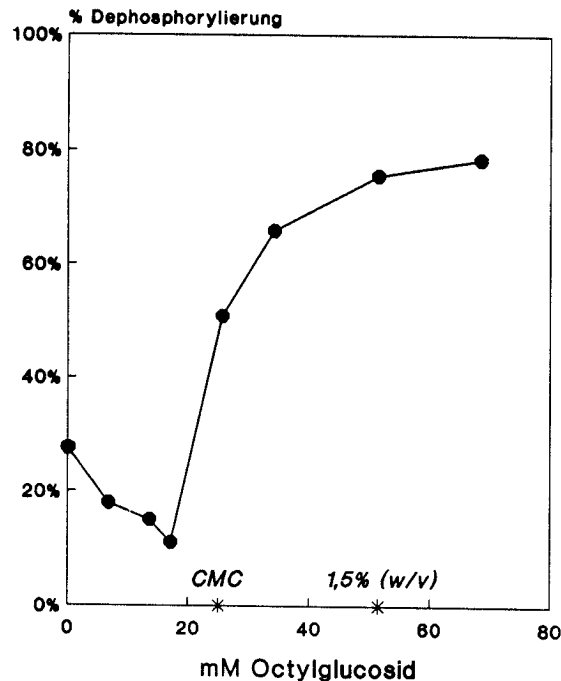


Abb. 3

Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der Octylglucosid-Konzentration.

Angegeben ist die Phosphataseaktivität als % Dephosphorylierung nach einer Reaktionsdauer von 30 min.

Dephosphorylierungsansätze:

0,625 μ M RE-G

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.4))

4,9 μ M phosp. Opsin

20 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 0 mM - 68,5 mM Octylglucosid.

3.2 Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt, "ganzen ROS" und Retinen-Extrakt

Eine Rhodopsin-spezifische Phosphatase ist in der Nähe ihres physiologisch wirksamen Ortes (phosphoryliertes Rhodopsin bzw. Opsin) zu erwarten.

Die bisher geschilderten Ergebnisse deuten darauf hin, daß die ROS-Phosphatase überwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß ein Teil der Phosphatase membranassoziiert vorliegt. Weiterhin lassen die Vorversuche erkennen, daß im Extrakt der gesamten Retina eine deutlich höhere Phosphatase-Aktivität vorhanden ist als im ROS-Extrakt.

Im Hinblick auf die angestrebten Reinigungsversuche sollte zunächst die geeignetste Phosphatasequelle bestimmt werden.

Aus diesem Grunde wurden folgende "Phosphatasequellen" auf ihre Phosphataseaktivität getestet:

- ROS-Extrakte (3.2.1)
- "ganze ROS" (3.2.2)
- Retinen-Extrakte (3.2.3)

3.2.1 Dephosphorylierungsversuche mit ROS-Präparationen

3.2.1.1 Phosphataseaktivität in ROS

Getestet wurde die Phosphatase-Aktivität im isotonischen (DE-1), hypotonischen (DE-2) und Gesamt- (DE-G) Extrakt (vgl. 2.5). Die bei der Extrakt-Präparation anfallenden Pellets (DE-2-Pellet bzw. DE-G-Pellet) wurden in Puffer homogenisiert und ebenfalls auf Phosphatase-Aktivität getestet (Abb. 4).

Die Ergebnisse dieser Versuche können wie folgt zusammengefaßt werden:

- In den Gesamt-Extrakten (DE-G) wurde eine maximale Phosphataseaktivität gefunden.
- Ein Großteil der Phosphataseaktivität ist jedoch schon isotonisch (DE-1) löslich. Nach der isotonischen Extraktion läßt sich ein Teil der verbleibenden Restaktivität hypotonisch extrahieren (DE-2).
- Die Extraktion der Phosphatase ist jedoch unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig, da auch noch in den verbleibenden Pellets nach Auflösung in Detergenz noch eine geringe Phosphataseaktivität nachgewiesen werden kann.
- Ein deutlicher Unterschied bezüglich Licht- bzw. Dunkel-Extrakten (hier nicht gezeigt) konnte nicht nachgewiesen werden, wenn auch die Dunkelextrakte in der Regel geringfügig aktiver zu sein schienen als die entsprechenden Lichtextrakte. Diese Unterschiede waren jedoch sehr gering.

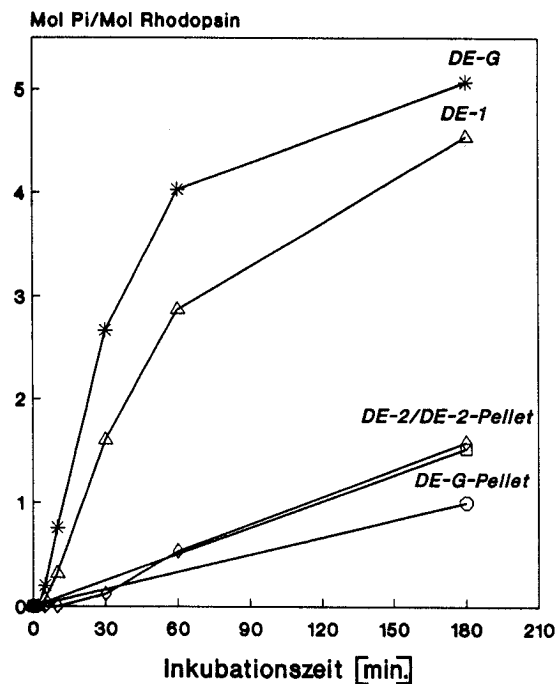


Abb. 4

Phosphataseaktivität verschiedener ROS-Extrakte (DE-G; DE-1; DE-2) bzw. der verschiedenen ROS-Pellets (DE-G-Pellet; DE-2-Pellet). (Phosphataseaktivität angegeben als hydrolysierte Mol Pi/Mol Rhodopsin.)

Dephosphorylierungsansätze: Extrakte (DE-G; DE-1; DE-2)

75 μ M Extrakt

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5)).

4,8 μ M phosp. Rhodopsin (PG 5,9)

10 mM Tris/HCl pH 7,2; (DE-1: 120 mM NaCl) 1 mM DTT; 1 mM MgCl₂;

1,5 % (w/v) Octylglucosid

Dephosphorylierungsansätze: "Pellet" (DE-G/DE-2-Pellet)

72,5 μ M Pellet (Rhodopsinkonzentration)

4,8 μ M phosp. Rhodopsin (PG 5,9)

10 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl₂;

1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.2.1.2 Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt (DE-G) in Abhängigkeit von der Extrakt-Konzentration

Aus den bisher beschriebenen Versuchen mit ROS-Extrakt als Phosphatasequelle geht hervor, daß zur Dephosphorylierung auch unter optimierten Bedingungen (Detergenz) ein erheblicher Überschuß an Extrakt (bezogen auf die Rhodopsinkonzentration) über das Substrat notwendig ist (siehe Legende zu Abb. 4).

Zur Standardisierung der Versuchsbedingungen und als Basis für einen Vergleich mit weiteren Phosphatasequellen (siehe 3.2.3), wurden die Zeitverläufe der Dephosphorylierung mit unterschiedlichen Extraktkonzentrationen aufgenommen.

Abb. 5a zeigt die zeitabhängige Dephosphorylierung von phosphoryliertem Rhodopsin in Abhängigkeit von der ROS-Extrakt-Konzentration.

Abb. 5b zeigt Dephosphorylierung von phosphoryliertem Rhodopsin nach einer Reaktionszeit von 60 min in Abhängigkeit von der ROS-Extrakt-Konzentration. Der Abb. 5b ist zu entnehmen, daß eine halbmaximale Dephosphorylierung (50 %) des Substrates ($5,1 \mu\text{M}$) etwa bei einem 10-fachen Überschuß von Extrakt ($47 \mu\text{M}$) über das Substrat erfolgt.

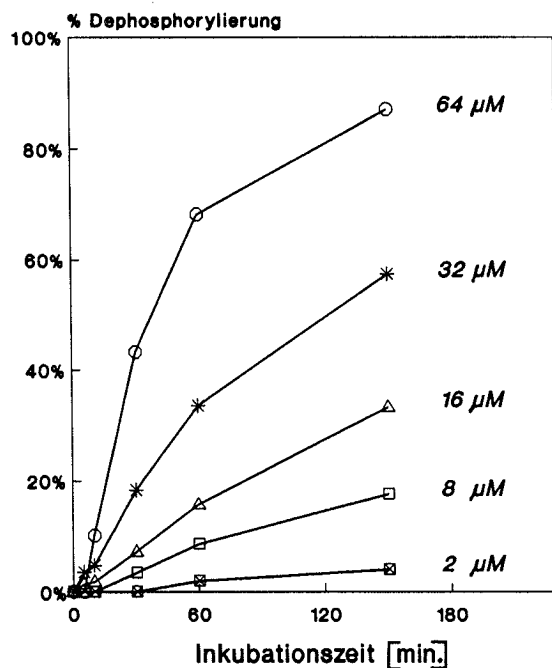


Abb.5a

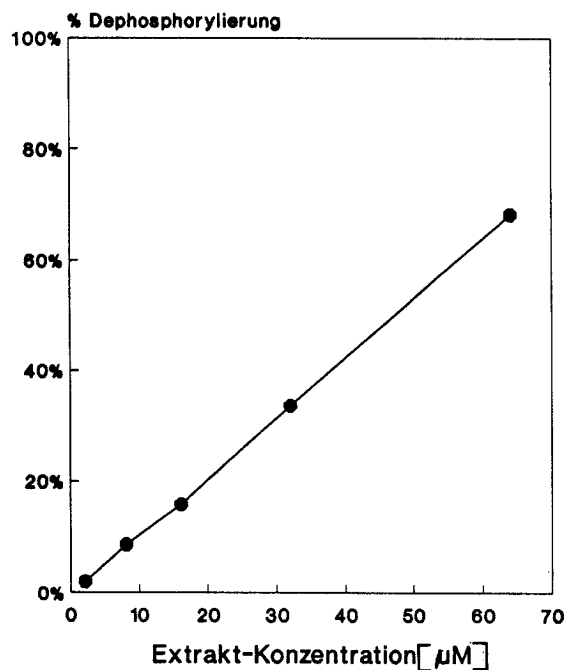


Abb.5b

Abb. 5a

Zeitabhängige Dephosphorylierung von phosp. Rhodopsin mit verschiedenen ROS-Extrakt-Konzentrationen.

Dephosphorylierungsansätze:

$2 \mu\text{M}$ - $64 \mu\text{M}$ DE-G

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5)).

$5,1 \mu\text{M}$ phosp. Rhodopsin (PG 5,99)

10 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 2 mM MgCl₂

1,5 % (w/v) Octylglucosid

Abb. 5b

Dephosphorylierung von phosp. Rhodopsin in Abhängigkeit von der Extrakt-Konzentration nach einer Inkubationszeit von 60 min. Dephosphorylierungsansätze siehe Legende zu Abb. 5a.

3.2.1.3 Dephosphorylierung verschiedener Rhodopsin-Formen durch ROS-Gesamt-Extrakt (DE-G)

Aus der Detergenz-Aktivität der Dephosphorylierungsreaktion ergibt sich folgende Frage: Aktiviert das Detergenz die Phosphatase oder wirkt es auf das Substrat und verbessert durch eine Umfaltung des Rhodopsins dessen Zugänglichkeit?

Nach Belichtung durchläuft das Rhodopsin verschiedene spektroskopische Zustände, die sich auch in ihrer Protein-Konformation unterscheiden. Meta II bzw. Meta III gelten als "gute" Substrate für die Rhodopsin-Kinase (Paulsen et al., 1975).

Es ist denkbar, daß eine bestimmte Konformation des Substrates vorliegen muß, um eine optimale Dephosphorylierung zu erreichen.

Um unter in vitro-Bedingungen eine optimale Substratkonformation für die Phosphatase aus ROS zu ermitteln, die möglicherweise auch ohne Detergenz quantitativ dephosphoryliert wird, wurden in den folgenden Versuchen verschiedene Substrate eingesetzt:

- chromophorregeneriertes phosp. Rhodopsin
- "Zwischenstufen" wie Meta-Rhodopsin II oder III
- das Endprodukt der Bleichung (phosp. Opsin)

In Parallelversuchen wurde durch Zugabe der unterschiedlichen Substrate die Dephosphorylierungsreaktion gestartet:

- regeneriertes phosp. Rhodopsin (Abb. 6a)

Der gesamte Versuch wurde bei schwachem Rotlicht ausgeführt.

- "Zwischenstufen" (Meta II bzw. Meta III) (Abb. 6b)

Das Substrat (regeneriertes phosp. Rhodopsin) wurde den Versuchsansätzen im Dunkeln zugesetzt und sofort anschließend im Wasserbad belichtet und während des gesamten Versuchs unter Licht gehalten (in Anwesenheit von Detergenz bleibt belichtetes Rhodopsin über Stunden (spektroskopisch nachweisbar) im Meta II-Zustand stabil (mündliche Mitteilung U. Wilden).

- phosp. Opsin (Abb. 6c)

Der gesamte Versuch wurde bei Licht durchgeführt.

regeneriertes Rhodopsin

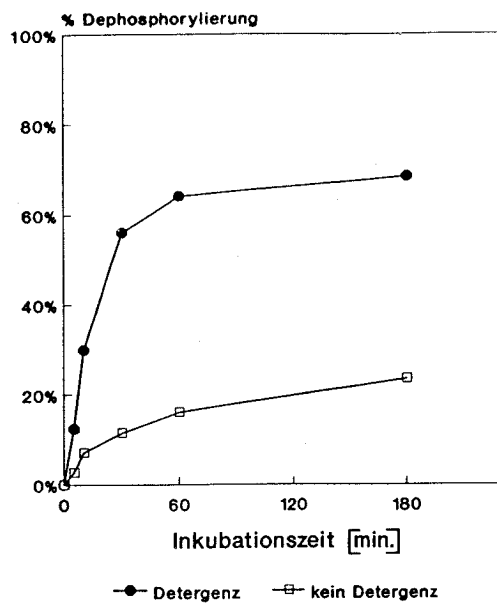


Abb.6a

"Zwischenstufen"

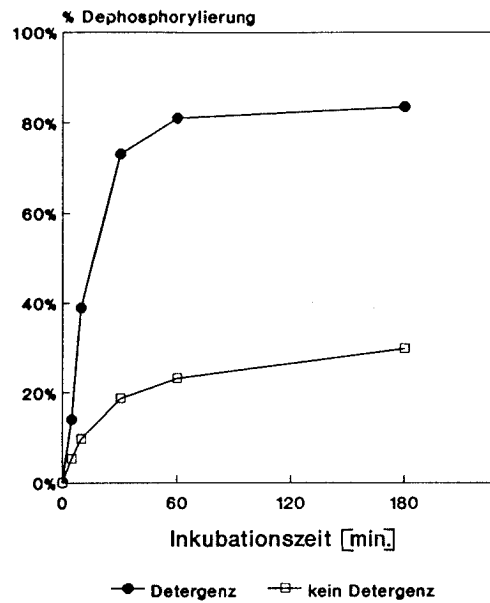


Abb.6b

Opsin

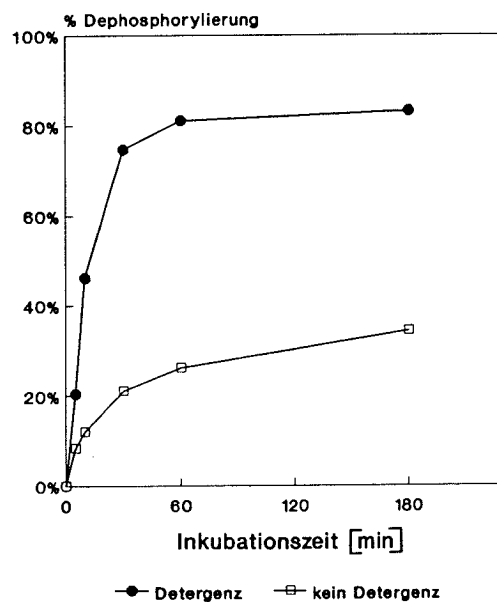


Abb.6c

Abb. 6

Dephosphorylierung unterschiedlicher "Substrat-Formen"

35 μ M DE-G (Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5))

6 μ M Substrat (PG 5,09):

a: regeneriertes phosp. Rhodopsin

b: "Zwischenstufen" (Meta II bzw. Meta III)

c: phosp. Opsin

20 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,7; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; $\pm$ 1,5 % Octylglucosid

Für die zeitabhängige Dephosphorylierung unterschiedlicher Formen des Substrates wurde lediglich ein geringer Unterschied festgestellt:

In dem hier beschriebenen Versuch liegt der Endwert der Dephosphorylierung von regeneriertem Rhodopsin (Dunkel) im Vergleich zu den beiden anderen Formen des Substrates niedriger. Dieser geringe Unterschied wurde jedoch in Kontrollversuchen nicht bestätigt und ist auf den Versuchsaufbau zurückzuführen:

Die Dunkelproben wurden vor Versuchsbeginn 90 min auf Eis gehalten (siehe 3.2.3.3), was einen zeitabhängigen Phosphatase-Aktivitätsverlust zur Folge hat.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

- Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist die Phosphataseaktivität unabhängig von der Konformation des eingesetzten Substrates.
- Der "Detergenzeffekt" ist bisher durch keine Konformation des eingesetzten Substrates zu kompensieren.

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde, da das zur Regeneration des Rhodopsins notwendige 11-cis-Retinal nicht unbegrenzt zur Verfügung stand, in den nachfolgenden Versuchen häufig nicht regeneriertes phosphoryliertes Opsin als Substrat für die Phosphatase eingesetzt.

3.2.1.4 Proteolyse-Kontrollversuche

Es ist denkbar, daß durch eine Proteaseaktivität zumindest teilweise der phosphorylierte Teil des Rhodopsins/Opsins vom Protein abgespalten wird und das Spaltprodukt gar nicht oder nur teilweise durch TCA gefällt und somit eine Phosphataseaktivität vorgetäuscht wird. Durch proteolytische Abspaltungen bedingte Verringerung des Molekulargewichts ist auf SDS-Gelen durch veränderte Lage der Opsinbande erkennbar.

In Versuchen mit unterschiedlichen "Konformationen" des Substrates (siehe 3.2.1.3: mit/ohne Detergenz), wurden zu verschiedenen Zeiten (0 min; 30 min; 60 min und 180 min) Aliquots entnommen und sofort in SDS-Probenpuffer überführt. Die Abb. 7a (1,5 % Octylglucosid im Dephosphorylierungsansatz) und die Abb. 8a (kein Detergenz im Dephosphorylierungsansatz) zeigen die entsprechenden SDS-Gele. Die Abb. 7b und 8b zeigen die korrespondierenden Autoradiographien. Zum Vergleich wurde auf beiden Gelen unphosp. Rhodopsin und proteolytisch gespaltenes Rhodopsin (Wehner, 1986) aufgetragen (siehe Legende zu den Abbildungen).

Phosphoryliertes Rhodopsin/Opsin läuft im SDS-Gel oberhalb des unphosphorylierten Rhodopsins/Opsins. Mit zunehmender Dephosphorylierung ist eine Annäherung an die Lage des unphosphorylierten Proteins zu erkennen. Eine proteolytisch bedingte Molekulargewichtsabnahme und damit veränderte Lage der Proteinbanden (vergleiche Spur 16-19) auf dem SDS-Gel, ist nicht zu erkennen.

Unter Lichtbedingungen aggregiert bei gleichzeitiger Anwesenheit von Detergenz in den Versuchsansätzen (siehe Abb. 7a und Abb. 7b, Spur 2 bis Spur 5) zeitabhängig ein erheblicher Teil des phosphorylierten Opsins.

Das Ausmaß der Aggregation ist abhängig von der Denaturierungstemperatur (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Der beobachtete Effekt ist als ein "SDS-Denaturierungsartefakt" einzustufen (mündliche Mitteilung H. Kühn). Bei Erhöhung der Denaturierungstemperatur ist die Aggregation jedoch auch unabhängig vom Belichtungszustand der Probe, das heißt: Rhodopsin aggregiert in gleichem Maße wie Opsin. Hierbei ist die Aggregation unabhängig vom Phosphorylierungsgrad der Proben (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Die Autoradiographien (Abb. 7b bzw. 8b) zeigen die zeitabhängige Dephosphorylierung des Substrates (Intensitätsabnahme der Filmschwärzung). Im Bereich der Laufront (niedermolekularer Bereich) treten keine radioaktiven Banden auf, welche bei einer proteolytischen Abspaltung kurzer Peptide zu erwarten gewesen wäre. Die Ergebnisse der SDS-Gele, insbesondere auch der Vergleich mit proteolytisch gespaltenem Rhodopsin (Spur 16 bis 19) und das Fehlen radioaktiver Banden im Bereich der Laufront zeigen, daß die zeitabhängige Radioaktivitätsabnahme in den Versuchsansätzen auf Dephosphorylierung und nicht auf proteolytischer Spaltung des Substrates beruht.

Abb. 7/Abb. 8

Proteolyse-Kontrollversuche

Abb. 7a: SDS-Gel, Versuchsansätze mit 1,5 % Octylglucosid

Abb. 7b: Autoradiographie zu Abb. 7a

Abb. 8a: SDS-Gel, Versuchsansätze ohne Octylglucosid

Abb. 8b: Autoradiographie zu Abb. 8a.

Probenauftrag:

- | | |
|---------|---|
| 1 | : Molekulargewichtsstandard (2 μ g Protein/Bande) |
| 2-5 | : phosp. Opsin, (6 μ g) entspricht 3.2.1.3, Abb. 6c |
| 6-9 | : "Zwischenstufen" (6 μ g) entspricht 3.2.1.3, Abb. 6b |
| 10-13 | : phosp. Rhodopsin (6 μ g) entspricht 3.2.1, Abb. 6a |
| 14 | : Molekulargewichtsstandard (2 μ g Protein/Bande) |
| 15 | : unphosp. Rhodopsin (6 μ g) |
| 16 | : T: Rhodopsin (6 μ g) nach Abspaltung von 9 AMS (C-Term.) |
| 17 | : TCP: Rhodopsin (6 μ g) nach Abspaltung von 21 AMS des C-Term. |
| 18 | : TCPV8: wie 17, zusätzlich Abspalt. von 1 AMS (loop 5-6) |
| 19 | : TCPV8CP: wie 18, zusätzlich Abspalt. von 4 AMS (loop 5-6) |
| 20 | : Molekulargewichtsstandard (2 μ g Protein/Bande) |
| | |
| T | : Trypsinbehandlung |
| TCP | : Wie T mit anschließender Carboxy-Peptidase-Behandlung |
| TCPV8 | : Wie TCP mit anschließender Staph. aureus-Protease-Behandlung |
| TCPV8Cp | : Wie TCPV8 mit anschließender Carboxy-Peptidase-Behandlung. |

Abb. 7/Abb. 8 siehe Seite 36

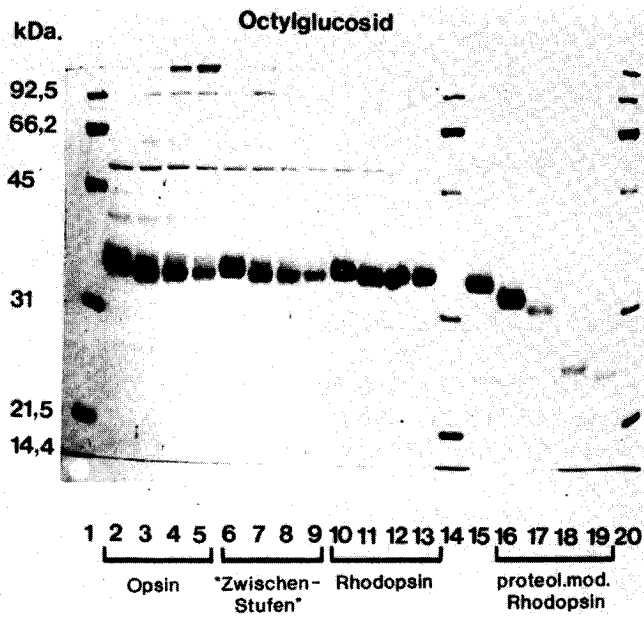


Abb. 7a

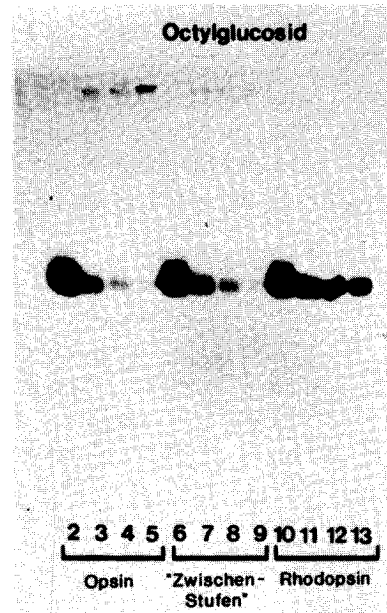


Abb. 7b

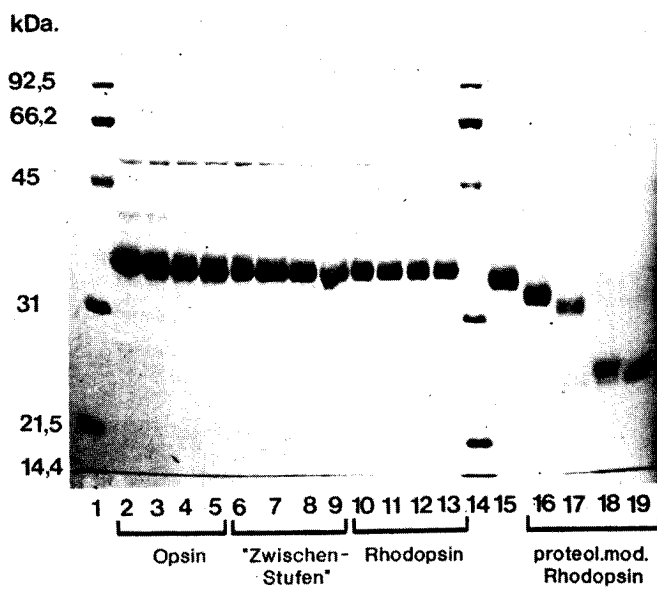


Abb. 8a

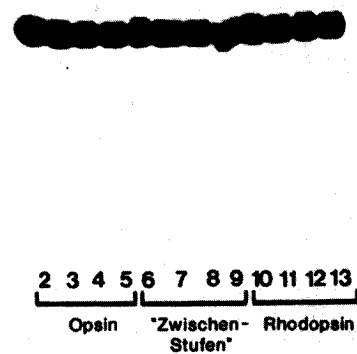


Abb. 8b

3.2.1.5 Dephosphorylierung von Rhodopsin unterschiedlicher durchschnittlicher Phosphorylierungsgrade

Bei der Phosphorylierung von Rhodopsin fallen Gemische unterschiedlich hoch phosphorylierter Rhodopsine an. Die Verteilung der einzelnen Phosphorylierungsstufen ist abhängig vom durchschnittlichen Phosphorylierungsgrad der Präparation:

Bei geringeren durchschnittlichen Phosphorylierungsgraden sind die einzelnen Rhodopsinmoleküle bevorzugt niedrig phosphoryliert und umgekehrt (Wilden, 1981). Über die Verteilung und das Auftreten verschieden hoher Phosphorylierungsstufen unter in vivo-Bedingungen, oder über die Reihenfolge der Phosphorylierung der verschiedenen Serin- bzw. Threoninreste ist bisher nichts bekannt.

Es ist denkbar, daß die Phosphatreste unterschiedlich hoch phosphorylierten Rhodopsins einer Phosphatase in unterschiedlichem Ausmaß zugänglich sind.

Aus diesem Grunde wurden Präparationen mit unterschiedlichem durchschnittlichen Phosphorylierungsgrad (siehe Material und Methoden) dephosphoryliert. Hierbei war die Frage zu beantworten, ob die beobachtete "Detergenzaktivierung" nur für bestimmte, z.B. hoch phosphorylierte Rhodopsine zu beobachten ist, ob niedrige durchschnittliche Phosphorylierungsgrade einer Phosphatase besser zugänglich sind und die Reaktion demnach keiner "Detergenzaktivierung" bedarf.

Die Abb. 9 zeigt die zeitabhängige Dephosphorylierung (abgespaltene Mol Phosphat/Mol Rhodopsin) verschiedener Substrate mit unterschiedlichen durchschnittlichen Phosphorylierungsgraden in An- und Abwesenheit von Detergenz (1,5 % (w/v) Octylglucosid).

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Aus diesen Versuchen ist nicht abzuleiten, daß durchschnittlich niedrig phosphoryliertes Rhodopsin ein "besseres" Substrat für die Phosphatase als durchschnittlich hoch phosphoryliertes Rhodopsin darstellt. Die verschiedenen Substrate (unterschiedliche durchschnittliche Phosphorylierungsgrade) werden alle "detergenzaktiviert" dephosphoryliert.

Die "Detergenzaktivierung" betrifft nicht nur Phosphorylierungsstellen, welche möglicherweise erst bei hohen durchschnittlichen Phosphorylierungsgraden phosphoryliert werden.

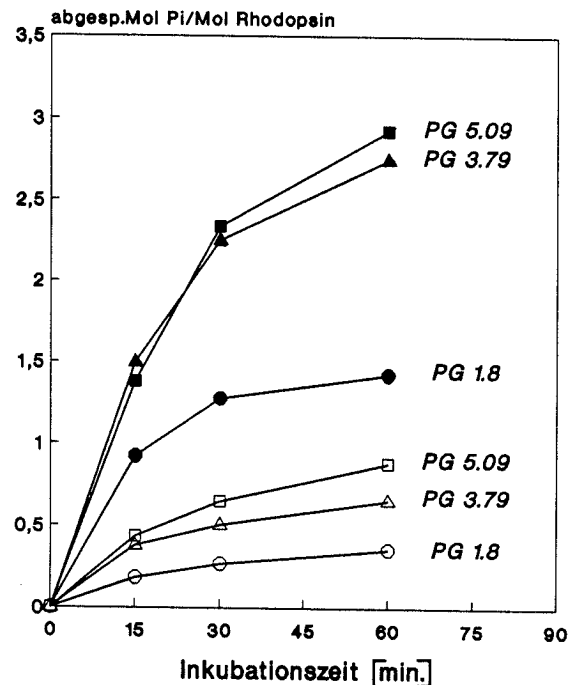


Abb. 9

Dephosphorylierung von Rhodopsin unterschiedlicher durchschnittlicher Phosphorylierungsgrade in Abwesenheit (offene Zeichen) und in Anwesenheit (gefüllte Zeichen) von Detergenz.

Dephosphorylierungsansätze:

32 μ M ROS-Extrakt (DE-G)

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5))

6,25 μ M phosp. Rhodopsin (PG: 1,80 bzw. 3,79 bzw. 5,09)

20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,7; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT

Detergenzansätze: 1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.2.2 Phosphataseaktivität von "ganzen ROS"

Nach der Extraktion der Phosphatase aus ROS bleibt noch eine Rest-Aktivität in der Membranfraktion zurück (vgl. Abb. 4). Möglicherweise enthalten ROS zwei unterschiedliche Phosphatase-Fractionen, von denen die eine löslich, die andere membranassoziiert vorliegt. Deshalb habe ich die Phosphatase-Aktivität "ganzer-ROS" untersucht.

ROS-Pellets wurden im Dunkeln aufgetaut und in Puffer aufgenommen (4 mg Rhodopsin/ml). Die Pellets wurden homogenisiert und zur Solubilisierung der Proteine auf eine Detergenzkonzentration von 1,5 % (w/v) Octylglucosid gebracht. Die Proben wurden kurz geschüttelt. Durch die Detergenzbehandlung resultierten klare Lösungen. Im Weiteren wurden diese klaren Solubilisate im Hellen verwendet. Um

die Versuche direkt mit "Extrakt-Versuchen", die unter verschiedenen Bedingungen (pH-Wert) durchgeführt wurden, verglichen zu können, wurden in Parallelansätzen zwei verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt:

20 mM Tris/HCl, pH 7,2 bzw. 20 mM Na-Acetat, pH 5,7

In Abb. 10 ist die zeitabhängige Dephosphorylierung des eingesetzten Substrates mit unterschiedlichen "ROS-Konzentrationen" (Angaben bezogen auf die Rhodopsinkonzentration) dargestellt.

Bei pH 7,2 hat eine Steigerung der ROS-Konzentration um den Faktor 4 keinen Einfluß auf das Ausmaß und die Kinetik der Rhodopsindephosphorylierung; bei pH 5,7 dagegen nimmt mit steigender ROS-Konzentration die Phosphatase-Aktivität ab (vgl. Abb. 10). Die Dephosphorylierung des eingesetzten Substrates ist offensichtlich nicht alleine abhängig von der mit "ganzen" ROS eingebrachten Menge Phosphatase.

In die Dephosphorylierungsansätze werden bei Verwendung von "ganzen" ROS als Phosphatasequelle demnach möglicherweise Faktoren eingebracht, die sich hemmend auf die Aktivität auswirken:

Die Phosphataseaktivität von ROS-Extrakten ist in Anwesenheit solubilisierter hypotonisch gewaschener Membranen ebenfalls inhibiert (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse mit "ganzen ROS" als Phosphatasequelle lassen ein im Vergleich zum Extrakt kompliziertes System erwarten, welches für weitere Versuche ungeeignet erschien.

pH 7,2

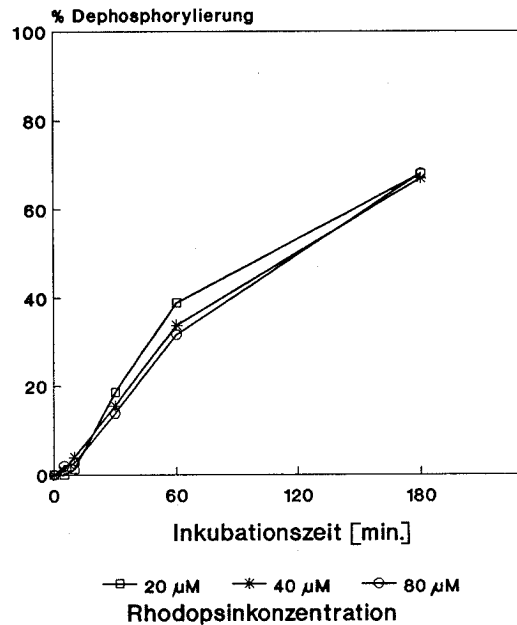


Abb. 10a

pH 5,7

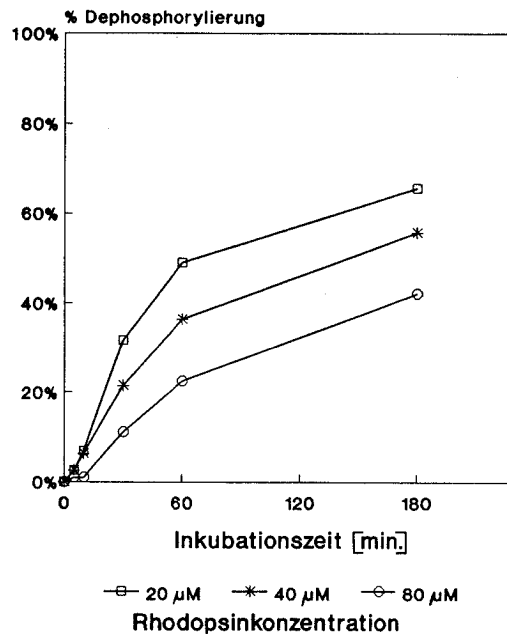


Abb. 10b

Abb. 10

Phosphataseaktivität von "ganzen ROS"

(Dephosphorylierung mit unterschiedlichen Konzentrationen "ganzer ROS")

Abb. 10a

pH 7,2

20 µM/40 µM/80 µM "ganze ROS"

(Angaben bezogen auf die Rhodopsinkonzentration)

5,8 µM phosp. Rhodopsin (PG 5,80)

20 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

Abb. 10b

pH 5,7

20 µM/40 µM/80 µM "ganze ROS"

(Angaben bezogen auf die Rhodopsinkonzentration)

5,8 µM phosp. Rhodopsin (PG 5,80)

20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,7; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.2.2.1 Mögliche aktivitätsbeeinflussende Faktoren

Die Phosphataseaktivität "ganzer ROS" ist durch noch unbekannte Faktoren verringert (siehe 3.2.2). Aus diesen Versuchen ergibt sich die Frage, ob z.B. mit "ganzen ROS" eingebrachtes unphosphoryliertes Rhodopsin die Phosphataseaktivität beeinflusst wird. Insbesondere stellt sich die Frage nach der Bindungsspezifität der Phosphatase:

Kann die Phosphatase auch an unphosphoryliertes Rhodopsin binden und wird dadurch die Reaktionskinetik bestimmt?

Durch "ganze ROS" werden zusätzlich Lipide in die Versuchsansätze eingebracht.

Es ist nicht auszuschließen, daß die Phosphataseaktivität durch Wechselwirkungen mit den Lipiden beeinflußt wird. Eine Bindung der Phosphatase an die Lipide würde ihre freie Diffusion einschränken und sich negativ auf ihre Aktivität auswirken. Eine solche Phosphatase-Lipid Wechselwirkung wäre eine mögliche Erklärung für die Detergenzaktivierung der Phosphatase:

Durch Detergenz wird der natürliche Lipidverband aufgelöst, was eine "freie" Diffusion der Phosphatase und somit eine verstärkte Phosphataseaktivität zur Folge hätte.

Der Einfluß von unphosphoryliertem Rhodopsin bzw. von Lipiden auf die Phosphataseaktivität ist sowohl für die Deutung der vorher beschriebenen Dephosphorylierungsversuche mit "ganzen ROS" als Phosphatasequelle, aber auch für Versuche mit verschiedenen Extrakten (siehe 3.2.1 und 3.2.2) von Bedeutung.

3.2.2.1.1 Einfluß von lipid-freiem Rhodopsin auf die ROS-Extrakt-Phosphataseaktivität

Zu ROS-Extrakt (DE-G) als Phosphatasequelle wurde unphosphoryliertes delipidiertes Rhodopsin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (siehe Abb. 11).

Die Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt bleibt unabhängig von der Konzentration delipidierten Rhodopsins gleich. Die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt unbeeinflußt. Ein inhibitorischer Effekt unphosphorylierten Rhodopsins kann ausgeschlossen werden.

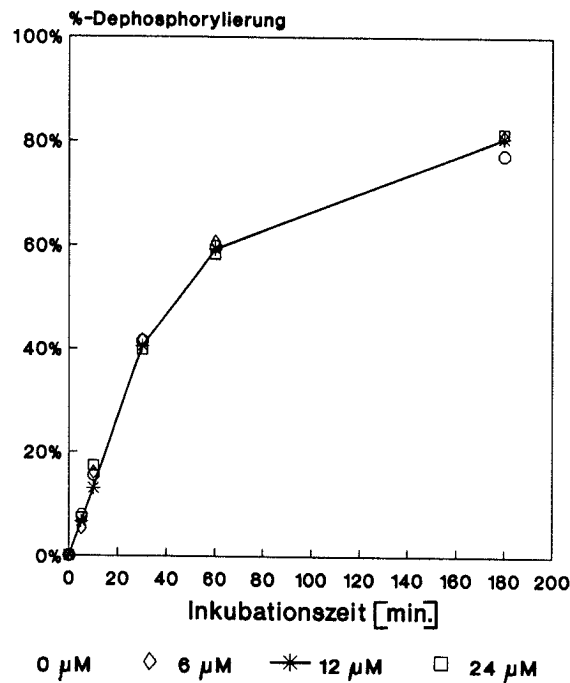


Abb. 11

Einfluß von delipidiertem Rhodopsin auf die Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt (DE-G)

Dephosphorylierungsansätze:

19 μM ROS-Extrakt (DE-G)

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5))

5,8 μM phosp. Rhodopsin (PG 5,8)

0 μM ; 6 μM ; 12 μM ; 24 μM delipidiertes Rhodopsin

20 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.2.2.1.2 Einfluß von ROS-Lipiden auf die ROS-Extrakt-Phosphataseaktivität

In die Dephosphorylierungsansätze mit "ganzen" ROS als Phosphatasequelle werden Lipide sowohl durch das Substrat (phosp. Rhodopsin) als auch durch "ganze" ROS eingebracht. In die Versuchsansätze mit Extrakt als Phosphatasequelle werden Lipide nur durch das Substrat eingebracht. In ROS beträgt das molare Verhältnis von Lipid zu Rhodopsin etwa 70 zu 1, das Gewichtsverhältnis beträgt etwa 1 zu 1 (Daemen, 1973).

Die Phosphataseaktivität, bzw. die Reaktionskinetik wird entscheidend beeinflusst durch Detergenz (siehe 3.1.1). Durch das Detergenz wird das Substrat (phosp. Rhodopsin bzw. Opsin) aus seiner natürlichen Lipidumgebung herausgelöst und die Lipide durch Detergenzmoleküle ersetzt. In den nachfolgenden Versuchen wurde ein Einfluß der Lipide auf die Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt in Gegenwart oder Abwesenheit von Detergenz überprüft.

Chloroform-extrahierte ROS-Lipide (siehe Material und Methoden) wurden von U. Wilden zur Verfügung gestellt. Die Lipide wurden in Puffer aufgenommen (5 mg/ml) und durch Beschallung (Branson, Sonifier B-12) (30 sec. mittlere Energiestufe) suspendiert. Die Lipid-Suspensionen wurden auf Eis gekühlt und kurz vor Versuchsbeginn den entsprechenden Ansätzen zugegeben (siehe Legende zu Abb. 12).

Abb. 12 zeigt das Dephosphorylierungsergebnis der verschiedenen Versuchsansätze mit unterschiedlichen Lipid-Substrat-Verhältnissen in Anwesenheit und Abwesenheit von Detergenz nach 180 min. Die Lipid-Substrat-Verhältnisse sind angegeben als Gewichtsverhältnisse: ein Lipid-Substrat-Verhältnis von eins bedeutet, daß dem Dephosphorylierungsansatz zusätzlich zum natürlichen Lipidgehalt der phosphorylierten Membranen gewichtsmäßig die gleiche Menge Lipid wie phosphoryliertes Rhodopsin zugesetzt wurde.

Bei einer Detergenzkonzentration von 1,5 % Octylglucosid ist die Phosphataseaktivität bis zu einem Lipid/Substrat-Verhältnis von 2 : 1 konstant, nimmt bei einem Verhältnis von 8 : 1 etwa um 5 % ab. Diese Abnahme ist durch Erhöhung der Detergenzkonzentration auf 3 % (w/v) reversibel (Abb. 12: 8[★]).

Ein Vergleich mit Versuchen ohne Detergenz zeigt einen negativen Einfluß von Lipiden auf die Phosphataseaktivität. Die Lipide beeinflussen die Phosphataseaktivität jedoch nur gering. In Abwesenheit von Detergenz ist die Phosphataseaktivität bei einem Lipid-Substrat-Verhältnis von 4 : 1 (Gewichtsverhältnis), was etwa einem molaren Verhältnis von etwa 800 : 2,5 entspricht, nur zu etwa 10 % inhibiert (siehe Abb. 12).

Eine Wechselwirkung der Phosphatase mit den Lipiden ist nicht auszuschließen (siehe Abb. 12). Sie erscheint aber zu gering, als daß eine Phosphatase-Lipid-Bindung als Ursache für die geringe Aktivität in Abwesenheit von Detergenz anzusehen ist.

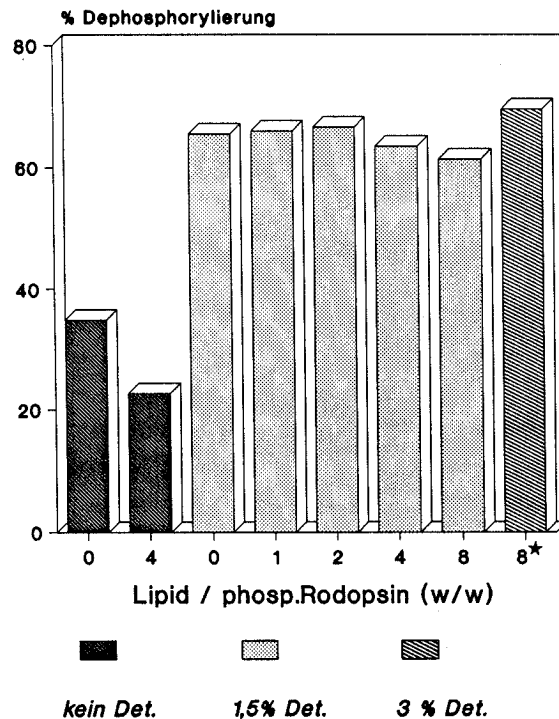


Abb. 12

Lipideinfluß auf Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt (DE-G). Dargestellt ist für die verschiedenen Lipid-Substrat-Verhältnisse die Dephosphorylierung des eingesetzten Substrates nach einer Versuchsdauer von 180 min.

Dephosphorylierungsansätze:

19 μ M DE-G

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5))

5,87 μ M phosp. Rhodopsin (PG 5,80) (entspricht 235 μ g Rhodopsin/ml)

ROS-Lipide: 0 μ g/ml; 235 μ g/ml; 470 μ g/ml; 940 μ g/ml; 1880 μ g/ml entspricht Lipid-Substrat-Gewichtsverhältnissen von 0 - 8.

20 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 0 % bzw. 1,5 % bzw. 3 % (w/v) Octylglucosid (8[★] : 3 % Octylglucosid).

3.2.3 Dephosphorylierungsversuche mit Retinen-Extrakt

Für angestrebte Phosphatase-Reinigungsversuche (siehe 3.4) wurde eine möglichst effektive "Phosphatasequelle" mit hoher Phosphatase-Aktivität gesucht. Deshalb habe ich neben ROS-Extrakten (DE-G) als eine weitere Phosphatasequelle Retinen-Extrakt auf seine Phosphataseaktivität getestet.

Abb. 13 zeigt die zeitabhängige Dephosphorylierung von phosp. Rhodopsin in Abhängigkeit von der Retinen-Extrakt-Konzentration (Angaben bezogen auf die Rhodopsinkonzentration bei der Extraktpräparation).

Abb. 14a zeigt die Dephosphorylierung von phosphoryliertem Rhodopsin nach einer Reaktionszeit von 60 min in Abhängigkeit von der Retinen-Extrakt-Konzentration.

Abb. 14b (entspricht Abb. 5b) zeigt zum Vergleich die Dephosphorylierung in Abhängigkeit von der ROS-Extrakt-Konzentration.

Eine vergleichbare zeitabhängige Dephosphorylierung (50 % des eingesetzten Substrate nach 60 min) wird bei 46 μM ROS-Extrakt und 0,7 μM Retinen-Extrakt erreicht (Angaben bezogen auf die Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation unter der Annahme: 1 mg Rhodopsin/Retina). Demnach ist Retinen-Extrakt etwa 60 mal aktiver als ROS-Extrakt.

Für diesen erheblichen Unterschied zwischen der Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt und Retinen-Extrakt gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten (siehe Diskussion). Das Vorhandensein mehrerer Phosphatasen kann nicht ausgeschlossen werden. Das Ausmaß der Rhodopsindephosphorylierung und die Aktivierung durch Detergenz sind in ROS- und Retinen-Extrakt jedoch sehr ähnlich (vgl. Abb. 1). Auch das Verhalten gegenüber Mercaptoethanol (vgl. Abb. 18) zeigt keine Unterschiede. Daher erscheint es der größeren Phosphatasemenge wegen sinnvoll, die Reinigungsstrategie zunächst für Retinen-Extrakt auszuarbeiten. Um Aktivitätsverluste möglichst gering zu halten und unter möglichst optimalen Dephosphorylierungsbedingungen zu arbeiten, wurden pH-Wert- und Temperaturoptimum der Phosphatase aus Retinen-Extrakt bestimmt (siehe 3.2.3.1 und 3.2.3.2).

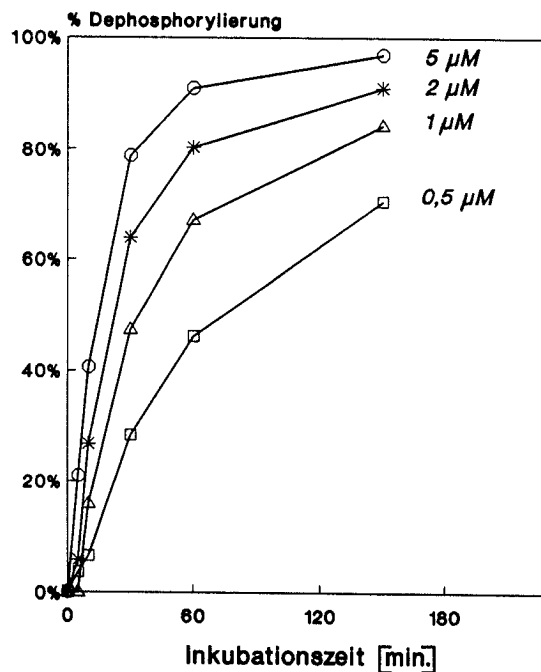


Abb. 13

Zeitabhängige Dephosphorylierung von phosp. Rhodopsin mit verschiedenen Retinen-Extrakt-Konzentrationen.

Dephosphorylierungsansätze:

0,5 μM - 5 μM Retina-Extrakt

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5))

5,1 M phosp. Rhodopsin (PG 5,99)

10 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 2 mM MgCl₂; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

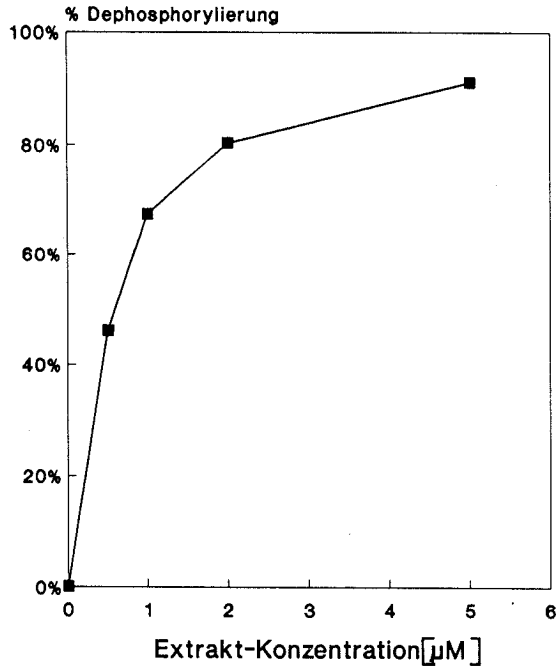
Retinen-Extrakt

Abb.14a

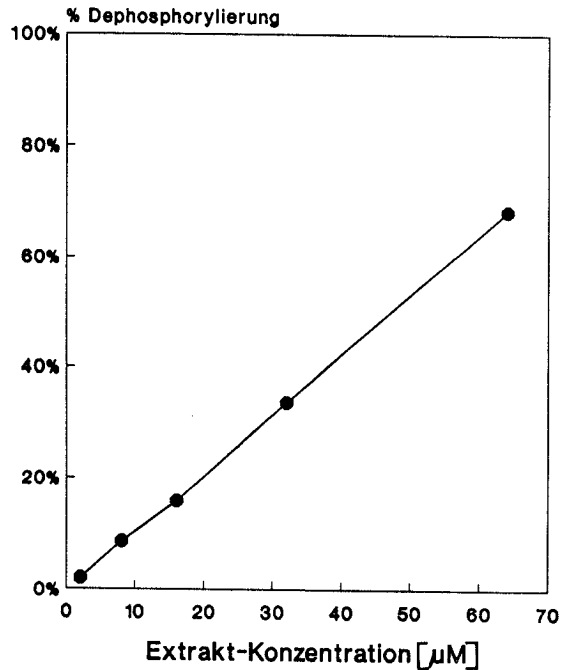
ROS-Extrakt

Abb.14b

Abb. 14

Dephosphorylierung von phosph. Rhodopsin in Abhängigkeit von der Extraktkonzentration nach einer Inkubationszeit von 60 min.

Abb. 14a

Dephosphorylierungsansätze: siehe Legende zu Abb. 13.

Abb. 14b

Dephosphorylierungsansätze:

2 µM - 64 µM ROS-Extrakt (DE-G)

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5))

5,1 µM phosph. Rhodopsin (PG 5,99)

10 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.2.3.1 pH-Wert-Abhängigkeit der Phosphataseaktivität

In der Literatur werden die Phosphatasen entsprechend des pH-Wertes ihres Wirkungsoptimums grob in zwei Klassen eingeteilt: "saure" bzw. "basische" Phosphatasen. Die Bestimmung des pH-Wirkungsoptimums läßt somit eine erste Einordnung der Rhodopsinphosphatase zu.

Zur Ermittlung des pH-Optimums der Phosphatase aus Retinen-Extrakt wurden Versuche in zwei verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen optimalen Pufferkapazitäten durchgeführt:

20 mM Hepes	pH-Bereich 6,0 - 8,0
20 mM Na-Acetat	pH-Bereich 4,0 - 6,0

Die Puffer wurden auf verschiedene pH-Werte (Stufen von 0,2 pH-Einheiten) eingestellt. Retinengesamtextrakt wurde in den entsprechenden Puffern 1 : 10 verdünnt.

Das pH-Wirkungsoptimum der Phosphatase bei 30 °C wurde bei einem pH-Wert von 5,6 - 5,7 ermittelt. Die Rhodopsinphosphatase ist somit den "sauren Phosphatasen" zuzuordnen.

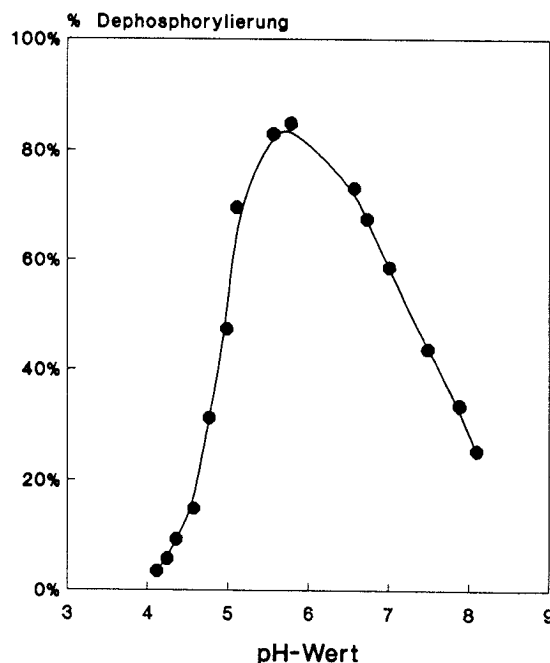


Abb. 15

pH-Abhängigkeit der Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt. Angegeben ist die Phosphataseaktivität als %-Dephosphorylierung nach einer Reaktionszeit von 30 min.

Dephosphorylierungsansätze:

0,25 μ M RE-G

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5))

4,5 μ M phosp. Opsin (PG 5,42)

20 mM Hepes (pH-Bereich 6,0 - 8,0) bzw.

20 mM Na-Acetat (pH-Bereich 4,0 - 6,0)

1 mM DTT; 1 mM MgCl; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.2.3.2 Temperaturabhängigkeit der Phosphataseaktivität

Die meisten Enzyme reagieren in engen Grenzen thermolabil. Um einen derartigen Einfluß während der Reinigung auszuschließen, wurde die Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt (RE-G) in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt.

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis gehalten ($T: 2,5 - 4^{\circ}\text{C}$) und bei Versuchsbeginn entweder auf Eis belassen oder in Wasserbäder mit unterschiedlichen Temperaturen (siehe Abb. 16) überführt. Nach 10 min wurde das Substrat zugegeben und die Dephosphorylierungsreaktion gestartet. Als Temperaturoptimum wurde 37°C ermittelt. Der "Commission on Enzymes" entsprechend, konnten deshalb alle weiteren Dephosphorylierungsversuche bei 30°C , nur geringfügig unterhalb des Temperaturoptimums durchgeführt werden.

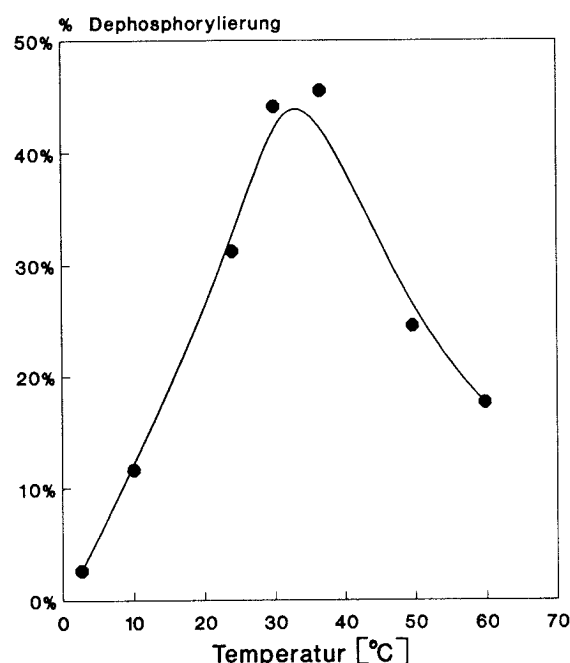


Abb. 16

Temperaturabhängigkeit der Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt (RE-G).
 Angegeben ist die Phosphataseaktivität als %-Dephosphorylierung nach einer Reaktionszeit von 30 min.
 Dephosphorylierungsansätze:
 0,125 μM RE-G
 (Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.5))
 2,9 μM phosp. Opsin (PG 5,19)
 20 mM Na-Acetat pH 5,7; 1 mM DTT; 1 mM MgCl_2 ; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.2.3.3 Stabilisierung der Phosphataseaktivität

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt und Retinen-Extrakt deutlich abnimmt, wenn die Extrakte vor Versuchsbeginn eine Zeitlang bei Raumtemperatur belassen wurden. Dieser Phosphataseaktivitätsverlust war unbeeinflußt von zugesetzten Proteaseinhibitoren wie Benzamidin, PMSF oder EGTA (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Es ist denkbar, daß der Phosphataseaktivitätsverlust auf eine Oxidation des Enzyms zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde habe ich die Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt (RE-G) bei verschiedenen Temperaturen in An- und Abwesenheit von Dithiothreitol (DTT) bestimmt.

Die Versuchsansätze (ohne Substrat) wurden mit/ohne DTT (1 mM) auf Eis bzw. bei 30 °C im Wasserbad für eine Stunde vorinkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde in beiden Fällen durch Zugabe des Substrates bei 30 °C gestartet. Die Phosphataseaktivität der verschiedenen Ansätze wurde bestimmt als %-Dephosphorylierung des eingesetzten Substrates nach einer Reaktionsdauer von 30 min.

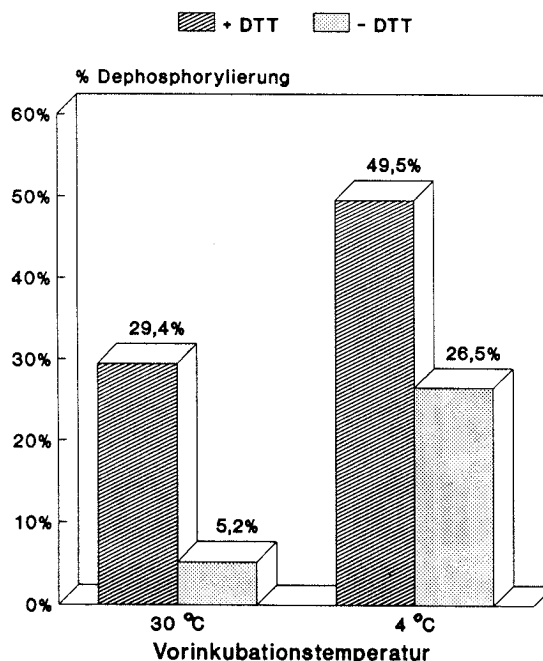


Abb. 17

Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt (RE-G) nach Vorinkubation (1 h) bei 30 °C bzw. 4 °C in An- und Abwesenheit von DTT.

(Angabe ist die Phosphataseaktivität als %-Dephosphorylierung nach einer Reaktionszeit von 30 min.)

Dephosphorylierungsansätze:

0,25 µM Retinen-Extrakt (RE-G)

(Rhodopsin-Konzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.4))

4,5 µM phosp. Opsin (PG 5,42)

20 mM Hepes pH 7,2; 1 mM MgCl₂; + 1 mM DTT; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

Zusammenfassung der Ergebnisse

- Eine Vorinkubation bei 30 °C bewirkt einen Phosphatase-Aktivitätsverlust im Vergleich zu einer Vorinkubation auf Eis.
- Die Versuche mit DTT als Oxidationsschutz zeigen im Vergleich zu den Versuchen ohne DTT einen erheblich verringerten Aktivitätsverlust.

Aus diesem Grunde wurden alle weiteren Reinigungsschritte in Anwesenheit von DTT durchgeführt.

3.3 Versuche zur Aktivierung "latenter" Phosphatasen

Bei der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen sind die Aktivitäten der beteiligten Kinasen bzw. Phosphatasen in einem komplexen System über Effektoren reguliert (Cohen, 1982). Die verschiedenen Effektoren können sowohl einen aktivierenden als auch einen inhibierenden Einfluß ausüben.

Inaktive Formen von Phosphatasen werden als "latente" Phosphatasen bezeichnet (Yang et al., 1984; Usui et al., 1983; Yang et al., 1986). In Enzymaktivitätstests ist ein Nachweis dieser latenten Phosphatasen erst nach Aktivierung möglich.

Als Methoden zur Aktivierung latenter Phosphatasen aus unterschiedlichen Geweben und enzymatischen Prozessen werden in der Literatur insbesondere eine 2-Mercaptoethanol-Behandlung (Kato et al., 1974; Tamura & Tsuiki, 1980; Yang et al., 1984) und eine Ethanol-Fällung (Brandt et al., 1975; Chou et al., 1977; Usui et al., 1983) beschrieben. Die Aktivierung der latenten Phosphatasen erfolgt in diesen beschriebenen Methoden über eine Abspaltung der katalytischen Untereinheit vom Holo-Enzym.

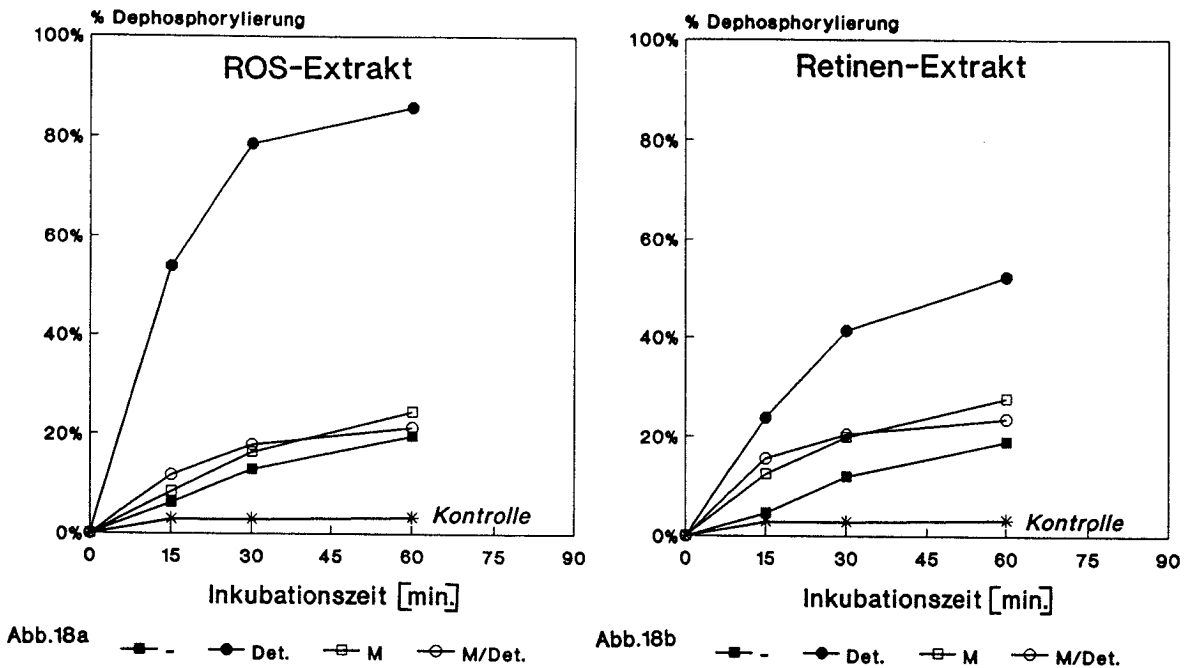
Zum Vergleich mit der festgestellten "Detergenzaktivierbarkeit" wurden die in der Literatur beschriebenen "Aktivierungsmethoden" auf ihre Eignung zur Aktivierung der Rhodopsinphosphatase in ROS- bzw. Retinen-Extrakt getestet.

3.3.1 2-Mercaptoethanol-Fällung

In Anlehnung an die Versuche von Yang et al. (1984) wurde sowohl Retinen-Gesamtextrakt (RE-G) als auch ROS-Extrakt (RE-G) mit 2-Mercaptoethanol versetzt (Endkonzentration: 200 mM), kurz geschüttelt und in Stickstoff eingefroren. Nach erneutem Auftauen wurde das durch die 2-Mercaptoethanol-Behandlung präzipitierte Protein pelletiert und der Überstand erneut in Stickstoff eingefroren. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Die verbleibenden Überstände enthielten jeweils

noch etwa 50 % der ursprünglichen Proteinkonzentration. Die resultierenden Pellets präzipitierter Proteine waren in Puffer unlöslich.

Die Überstände wurden in An- und Abwesenheit von Detergenz (1,5 % Octylglucosid) auf Phosphataseaktivität getestet und zum Vergleich nicht-mercaptoethanol-behandelten Pendants gegenübergestellt. In Abb. 18 sind die Ergebnisse der Mercaptoethanol-Behandlung dargestellt.



Vergleich der Phosphataseaktivität von ROS-Extrakt (Abb. 18a) bzw. Retinen-Extrakt (Abb. 18b) vor und nach 2-Mercaptoethanol-Behandlung in Ab- und Anwesenheit von Detergenz.

- (-) —■ Phosphataseaktivität des Extraktes vor Mercaptoethanol-Behandlung in Abwesenheit von Detergenz
- (Det.) —● Phosphataseaktivität des Extraktes vor Mercaptoethanol-Behandlung in Anwesenheit von Detergenz.
- (M) —□ Phosphataseaktivität des Extraktes nach Mercaptoethanol-Behandlung in Abwesenheit von Detergenz.
- (M/Det.) —○ Phosphataseaktivität des Extraktes nach Mercaptoethanol-Behandlung in Anwesenheit von Detergenz.
- * Kontrolle in Abwesenheit von ROS- oder Retinen-Extrakt

Dephosphorylierungsansätze:

32 μ M ROS-Extrakt (DE-G) (Abb. 18a)

0,16 μ M Retinen-Extrakt (RE-G) (Abb. 18b)

6,7 μ M phosp. Opsin (PG 5,09)

20 mM Na-Acetat pH 5,7; 1 mM DTT; 1 mM MgCl₂; $\pm$ 1,5 % (w/v) Octylglucosid

Die Behandlung mit Mercaptoethanol verringert die Phosphataseaktivität. Ein Phosphataseverlust durch Präzipitation ist nicht auszuschließen, läßt sich aber aufgrund der Unlöslichkeit der Präzipitate nicht ohne Weiteres nachweisen.

Die Phosphatase ist nach Mercaptoethanol-Behandlung nicht mehr detergenz-aktivierbar.

Dieses Ergebnis spricht für einen direkten Einfluß des Detergenz auf die Phosphatase und nicht für einen Einfluß des Detergenz auf das Substrat (siehe Diskussion).

3.3.2 Ethanol-Fällung

In Anlehnung an die Versuche von Usui et al. (1983), die eine Phosphatase-Aktivierung durch Ethanol beschreiben, wurde Retinen-Extrakt (1 ml) aufgetaut, mit 95 %-igem Ethanol auf eine Ethanolkonzentration von 80 % (v/v) gebracht, kurz geschüttelt und für eine halbe Stunde auf Eis belassen. Im Anschluß wurde die Probe bei 50.000 g zentrifugiert (Beckman Rotor JA-20, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, unter gleichen Bedingungen noch einmal klarzentrifugiert und auf Eis belassen (Ü-1).

Das Pellet der ersten Zentrifugation wurde zur Nachextraktion in 1 ml Puffer aufgenommen, resuspendiert und homogenisiert. Diese Probe wurde noch eine halbe Stunde auf Eis belassen und anschließend zentrifugiert (50.000 g, 15 min, 4 °C). Dieser Nachextrakt (Ü-2) wurde abgenommen, erneut klarzentrifugiert und auf Eis belassen. Das verbleibende Pellet wurde in 1 ml Puffer resuspendiert und homogenisiert (P).

Aliquots des Überstandes Ü-1 bzw. des Nachextraktes Ü-2 wurden zur Entfernung des Ethanol mit Stickstoff überspült und anschließend mit Puffer auf das ursprüngliche Volumen (200 µl) gebracht.

Die verschiedenen Proben (Ü-1; Ü-2 und P) wurden in Anwesenheit (Ü-1-Det.; Ü-2-Det.; P-Det.) und Abwesenheit (Ü-1; Ü-2; P) von Detergenz auf ihre Phosphataseaktivität getestet. Die Ergebnisse der Dephosphorylierungsversuche sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Zum Vergleich sind die Ergebnisse aus Parallelversuchen mit nicht-ethanol-behandeltem Retinen-Extrakt (RE-G-Det; RE-G) gegenübergestellt.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

- Durch eine Ethanol-Fällung ist keine Aktivierung des Phosphatasen in Retinen-Extrakt zu erreichen.
- Im Vergleich zu unbehandeltem Retinen-Extrakt wird in den Ethanol-behandelten Proben in keinem Fall eine Erhöhung der spezifischen Aktivität (mM abgespaltenes Phosphat/ g eingesetztes Protein) erreicht.
- Auf SDS-Gelen (hier nicht gezeigt) treten keine deutlichen Unterschiede im Proteinmuster der verschiedenen Überstände bzw. des Pellets auf.

Die Ethanolfällung eignet sich demnach nicht als Phosphatase-Reinigungsmethode. Diese Versuchsergebnisse zeigen, daß eine Ethanol-Fällung zur Aktivierung einer möglichen "latenten Rhodopsinphosphatase" aus Retinen-Extrakt ungeeignet ist.

"Phosphatase- quelle"	$\mu\text{g Prot.}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g Prot.}/\text{Ansatz}$	%Dephosph.	pMol Pi/ $\mu\text{g Prot.}$
Ü-1	2,9	145	12,1	8,65
Ü-1 Det.	2,9	145	26,3	18,8
Ü-2	2,96	148	13,5	9,40
Ü-2-Det.	2,96	148	15,5	10,85
P	2,42	242	10,4	4,45
P-Det.	2,42	242	4,3	1,84
RE-G	14	70	19,0	28,14
RE-G-Det.	14	70	81,2	120,26

Tabelle 1

Vergleich der Phosphataseaktivität (% Dephosphorylierung nach 30 min) verschiedener Überstände bzw. des resuspendierten Pellets von Retinen-Extrakt nach Ethanol-Behandlung (siehe Text) mit unbehandeltem Retinen-Extrakt.

RE-G: unbehandelter Retinen-Extrakt in Ab- (RE-G) und Anwesenheit (RE-G-Det.) von Detergenz.

Ü-1: Überstand nach Ethanol-Behandlung in Ab- (Ü-2) und Anwesenheit (Ü-1-Det.) von Detergenz.

Ü-2: Nachextrakt nach Ethanolbehandlung in Ab- (Ü-2) und Anwesenheit (Ü-2-Det.) von Detergenz.

P: resuspendiertes Rest-Pellet des Ü-2 in Ab- (P) und Anwesenheit (P-Det.) von Detergenz.

Dephosphorylierungsansätze:

3,89 μM phosp. Opsin (PG 5,33)

20 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; $\pm$ 1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.4 Dephosphorylierung von phosphoryliertem Opsin mit unspezifischen Phosphatasen

In der Literatur sind Phosphatasen mit einer sehr "engen", aber auch mit einer sehr "breiten" Substrat-Spezifität beschrieben (Antoniv et al., 1977; Krebs & Beavo, 1979; Ingebritsen et al., 1980; Cohen, 1982). Eine teilweise Dephosphorylierung von Rinder-rhodopsin mit einer latenten Phosphatase 2 aus Schweinehirn wurde kürzlich beschrieben (Yang et al., 1988).

Aus diesem Grunde habe ich zwei unspezifische Phosphatasen auf ihre Phosphatase-aktivität gegen phosphoryliertes Opsin als Substrat in An- und Abwesenheit von Detergenz (Octylglucosid) getestet:

- (a) basische Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer, Mannheim)
- (b) saure Phosphatase aus Kartoffel (Boehringer, Mannheim)

Die Phosphatasen wurden entsprechend ihrem pH-Wirkungsoptimums in zwei verschiedenen Puffern aufgenommen:

- (a): 20 mM Hepes pH 7,2; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT
- (b): 20 mM Na-Acetat pH 5,7; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT

In den Dephosphorylierungsversuchen wurde jeweils eine spezifische Phosphatase-aktivität von 0,1 U eingesetzt. (1 U entspricht der Enzymaktivität, bei der unter optimalen Versuchsbedingungen 1 μ Mol eines künstlichen Substrates, para-Nitrophenylphosphat (PNPP), pro Minute umgesetzt wird.)

Die Ergebnisse der Dephosphorylierungsversuche sind in der Abb. 19 dargestellt.

Eine saure Phosphatase aus Kartoffel dephosphoryliert Rhodopsin nach einer Inkubationszeit von 60 min zu etwa 50 %. Durch eine zehnfache Steigerung der Enzymaktivität auf 1 U wird auch nach einer Inkubationszeit von 180 min lediglich eine 60 %ige Dephosphorylierung des Rhodopsins erreicht (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Die Phosphataseaktivität wird durch Detergenz nicht gesteigert, vielmehr wird die Phosphatase durch Detergenz leicht inhibiert (siehe Abb. 19).

Die basische Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert Opsin unter den angegebenen Versuchsbedingungen (0,1 U) nur sehr gering (maximale Dephosphorylierung von etwa 10 % des Substrates).

Durch Steigerung der Enzymkonzentration um einen Faktor 100 auf 10 U wird nach einer Inkubationszeit von 180 min eine etwa 40 %ige Dephosphorylierung erreicht (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Hierbei wird ebenfalls eine Inhibierung der Phosphatase durch Detergenz beobachtet (max. Dephosphorylierung in Anwesenheit von Detergenz: 30 %).

Diese Ergebnisse zeigen, daß Rhodopsin bis zu einem gewissen Grad auch durch unspezifische Phosphatasen dephosphoryliert werden kann, daß es jedoch deutlich besser von der Phosphatase aus ROS- oder Retinen-Extrakt als Substrat erkannt wird.

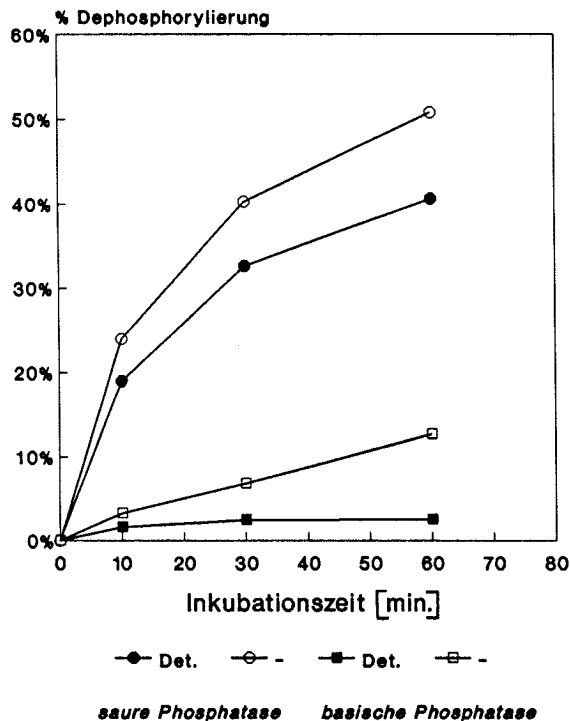


Abb. 19

Dephosphorylierung von phosp. Opsin mit unspez. Phosphatasen.

Dephosphorylierungsansätze:

0,1 U saure Phosphatase aus Kartoffel (Boehringer, Mannheim)

5,29 μ M phosp. Opsin (PG 5,97)

20 mM Na-Acetat pH 5,7; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT;

in Anwesenheit von Detergenz (Det.): 1,5 % (w/v) Octylglucosid

in Abwesenheit von Detergenz (-):

0,1 U basische Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer, Mannheim)

5,29 μ M phosp. Opsin (PG 5,97)

20 mM Hepes pH 7,2; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT;

in Anwesenheit von Detergenz (Det.): 1,5 % (w/v) Octylglucosid

in Abwesenheit von Detergenz (-).

3.5 Phosphatase-Reinigungsversuche

In der Literatur ist bisher nichts über die Reinigung einer Rhodopsin-Phosphatase beschrieben. Um eine Reinigungsstrategie entwickeln zu können, habe ich die Proteine aus Retinen-Extrakt nach verschiedenen Proteinreinigungsverfahren aufgetrennt, die Versuchsbedingungen möglichst optimiert und die verschiedenen Reinigungsverfahren auf ihre Tauglichkeit zur Reinigung einer Rhodopsinphosphatase überprüft.

3.5.1 Gel-Filtration

Die Gel-Filtration von heterogenen Proteinlösungen wird sowohl zur Proteinreinigung als auch zur Bestimmung von Molekulargewichten angewendet.

Frisch präparierter Retinen-Extrakt (10 ml) wurde nach Eichung und Equilibrierung (siehe 2.10.1) der Molekularsiebsäule (Aca 44) aufgetragen und Fraktionen von 1,9 ml aufgefangen. Die Fraktionen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität bei -80°C aufbewahrt.

Durch die Gel-Filtration wird eine erste grobe Vorreinigung durch Abtrennung von niedermolekularen Nicht-Phosphatase-Proteinen möglich.

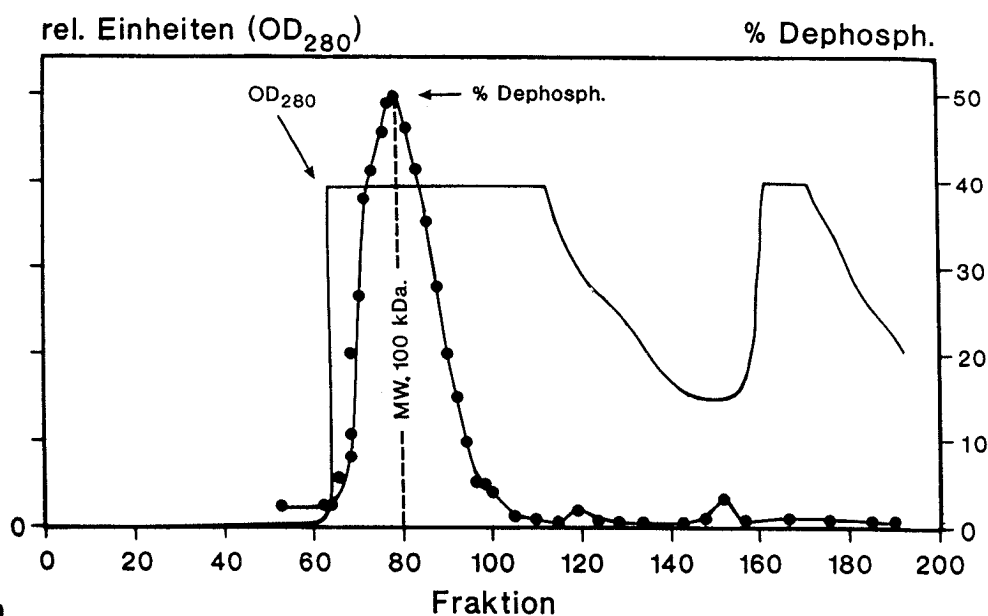


Abb. 20

Elutionsdiagramm ($\text{OD } 280$) einer Gelfiltration (Aca 44) von Retinen-Extrakt (10 ml) und Phosphataseaktivität verschiedener Fraktionen (%-Dephosphorylierung nach einer Inkubationszeit von 30 min).

Dephosphorylierungsansätze:

42 μl Fraktion; 1,85 μM phosp. Opsin (PG 5,30); 20 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 2 mM MgCl; 1 % (w/v) Octylglucosid.

3.5.2 Anionen-Austausch-Chromatographie

3.5.2.1 Vorversuche

Bei der Anionen-Austausch-Chromatographie werden an die Matrix gebundene Proteine mit steigender Salzkonzentration eluiert. Wie beschrieben ist die Phosphataseaktivität abhängig von der Ionenstärke des Inkubationsmediums: "Sie (Die Dephosphorylierung) verläuft schneller und vollständiger mit abnehmender Ionenstärke" (Wilden, 1981).

Die Abb. 21 zeigt die Abhängigkeit der Phosphataseaktivität von der Salzkonzentration (NaCl).

Bei einer Ionenstärke etwa im Bereich von 250 mM NaCl erfolgt eine halbmaximale Inhibierung der Phosphataseaktivität. Diese Inhibierung ist nach Pufferumstellung (Ultrafiltration bzw. Gelfiltration) bedingt reversibel (zeitabhängiger Phosphataseaktivitätsverlust: siehe 3.2.3.3).

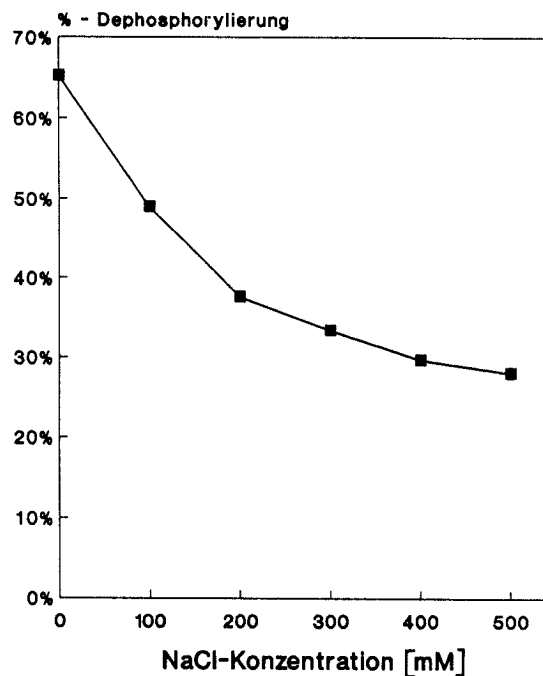


Abb. 21

Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt in Abhängigkeit von der Ionenstärke (NaCl).

(Die Phosphataseaktivität ist angegeben als %-Dephosphorylierung nach einer Inkubationszeit von 30 min).

Dephosphorylierungsansätze:

0,25 μ l Retinen-Extrakt (RE-G)

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.4))

3,89 μ M phosph. Opsin (PG 5,33)

20 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl₂; 1,5 % (w/v) Octylglucosid; 0 mM - 500 mM NaCl (siehe Abb. 20)

3.5.2.2 Reinigungs-Versuche

Retinen-Extrakt (5 ml) wurde auf die equilibrierte Säule aufgetragen (siehe Material und Methoden). Die Proteinelution erfolgte durch einen Salzgradienten von 30 ml: 0 mM - 500 mM NaCl in Säulen-Puffer.

Im Anschluß an den Salzgradienten wurde mit 15 ml 500 mM NaCl in Säulenpuffer nacheluiert. Die "Endreinigung" der Säule erfolgte über eine Salzstufe (1000 mM NaCl).

Fraktionen von 1 ml wurden aufgefangen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aktivitätsbestimmung bei -80°C aufbewahrt.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß die Phosphatase an die Anionen-Austausch-Matrix bindet und mit steigender Salzkonzentration, maximal bei 400 mM - 450 mM NaCl von der Säule eluiert wird. Eine Abtrennung sowohl der "Nicht-bindenden" Proteine als auch eine Abtrennung schwächer bindender Proteine wird erreicht.

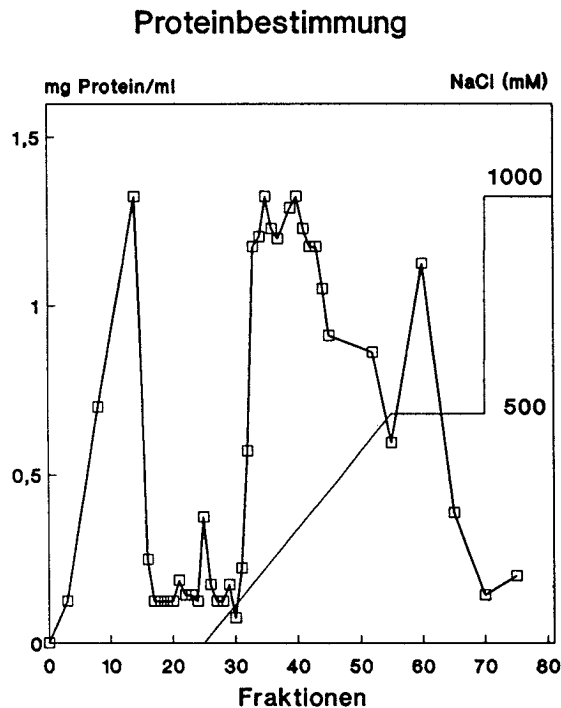


Abb.22a

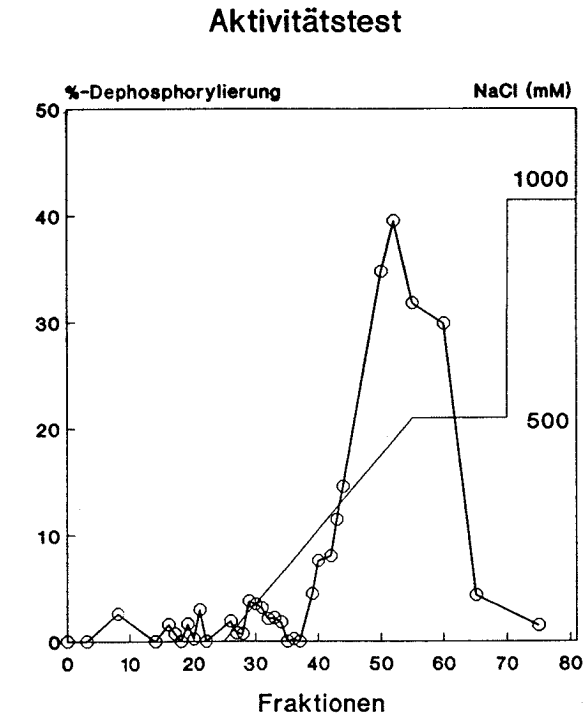


Abb.22b

Abb. 22a

Proteinelution (mg Protein/ml Eluat)

Abb. 22b

Phosphataseaktivitätstest verschiedener Fraktionen (siehe Material und Methoden).

Dephosphorylierungsansätze:

45 μl Fraktion, 5,52 μM phosp. Opsin (PG 4,84); 20 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 2 mM MgCl₂; 1,2 % (w/v) Octylglucosid

3.5.3 Adsorptions-Chromatographie

3.5.3.1 Vorversuche

Bei der Adsorptions-Chromatographie mit Hydroxylapatit als Matrix erfolgte die Probenaufgabe in NaPP geringer Ionenstärke und die Elution der Proteine über einen NaPP-Gradienten bzw. durch stufenweise Erhöhung der NaPP-Konzentration. Aus den Versuchen von U. Wilden (1981) war bekannt, daß eine Rhodopsin-Dephosphorylierung im Gegensatz zu Tris/HCl durch NaPP unterdrückt wird. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß der NaPP-Konzentration auf die Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt getestet. Die Abb. 23 zeigt, daß eine NaPP-Konzentration von etwa 10 mM in den Versuchsansätzen bereits zu einer 50 % Inhibition der Phosphataseaktivität führt.

Diese Inhibierung der Phosphataseaktivität ist bei Ultrafiltration (Amicon Centricron 10) und anschließender Pufferumstellung (Tris/HCl) bedingt reversibel (zeitabhängiger Aktivitätsverlust siehe 3.2.3.3).

Die Adsorptionschromatographie ist somit prinzipiell als Phosphatase-Reinigungsmethode einsetzbar

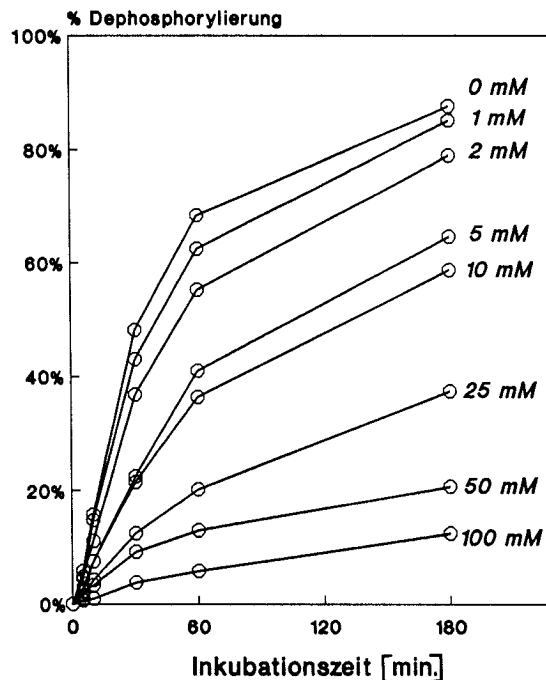


Abb. 23

Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der NaPP-Konzentration

Dephosphorylierungsansätze:

1,25 μ M Retinen-Extrakt (RE-G)

(Rhodopsinkonzentration bei der Extraktpräparation (vgl. 2.4))

5,0 μ M phosph. Opsin (PG 5,99); 10 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0 mM - 100 mM NaPP (siehe Abb.); 1,5 % (w/v) Octylglucosid

3.5.3.2 Reinigungs-Versuche

Nach dem Equilibrieren der Säule (HA-Ultrogel) mit Säulenpuffer (10 mM NaPP, pH 6,8) wurden 3 ml Retinen-Extrakt aufgetragen.

Die Säule wurde mit 15 ml Säulenpuffer "nachgewaschen". Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte stufenweise mit jeweils 15 ml Puffer unterschiedlicher NaPP-Konzentration (50 mM; 100 mM; 200 mM). Die Endreinigung der Säule erfolgte bei Raumtemperatur mit einer NaPP-Konzentration von 500 mM. Die unterschiedlichen Eluate (NaPP-Stufen) wurden als 2 ml-Fractionen aufgefangen. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fractionen wurde nach Bradford bestimmt (Abb. 24a). Den Fractionen jeder Elutionsstufe mit der höchsten Proteinkonzentration wurden Aliquots für die Gel-Elektrophorese entnommen und SDS-denaturiert. Abb. 25 zeigt das zugehörige SDS-Gel. Die Fractionen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Aufgrund der NaPP-Hemmung der Phosphataseaktivität (siehe 3.4.3.1) war vor den Phosphatasetests eine Pufferumstellung notwendig. Die Fractionen der einzelnen Elutionsstufen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden aufgetaut, Aliquots (1 ml) entnommen und diese bei 4 °C ultrafiltriert (Amicon Centricon 10).

Die Retentate (ca. 100 µl) wurden anschließend zwecks Pufferumstellung noch jeweils dreimal mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,2; 1 mM DTT, 1 mM MgCl "gewaschen". Die End-Retentate wurden in diesem Puffer aufgenommen und auf Phosphataseaktivität getestet (Abb. 24).

Zusammenfassung der Ergebnisse

- Die Phosphatase bindet unter den gegebenen Versuchsbedingungen an die Matrix und wird durch Erhöhung der NaPP-Konzentration auf 50 mM bzw. 100 mM von der Säule eluiert. Hierbei werden in der 50 mM NaPP-Stufe etwa 30 % und in der 100 mM NaPP-Stufe etwa 25 % des Gesamtproteins eluiert.
- Die SDS-Gelelektrophorese (Abb. 25) der in den verschiedenen NaPP-Stufen eluierten Proteine zeigt unterschiedliche Proteinmuster und einen deutlichen Reinigungseffekt.

Proteinelution

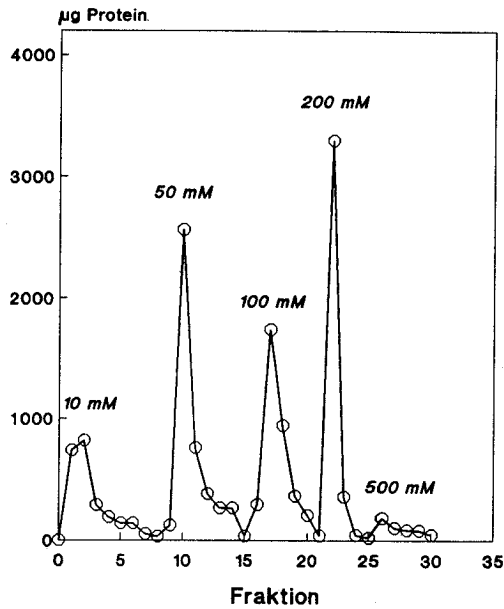


Abb.24a

Aktivitätstest

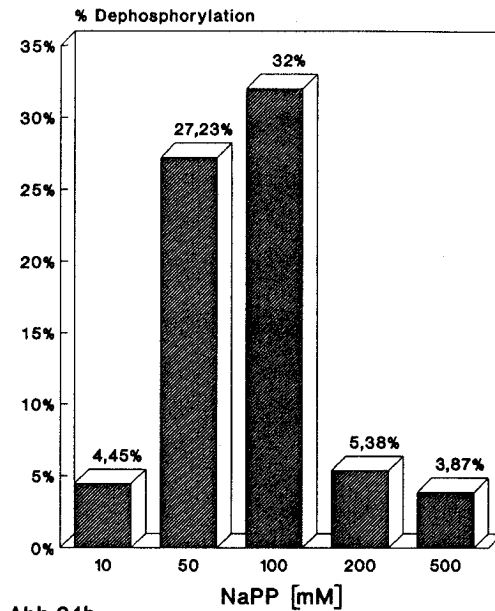


Abb.24b

Abb. 24a

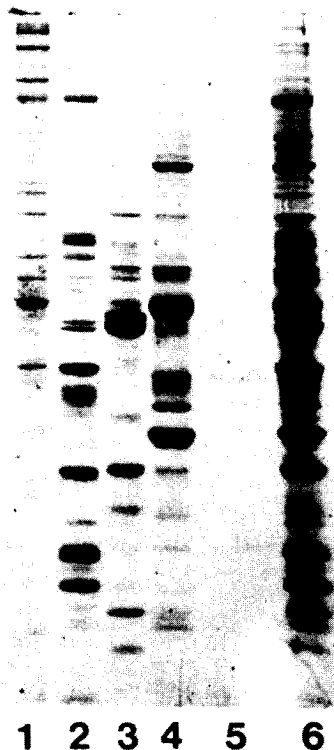
Proteinelution (µg Protein/ml Fraktion)

Abb. 24b

Phosphataseaktivität verschiedener Fraktionen unterschiedlicher NaPP-Elutionsstufen nach Pufferumstellung (siehe Text)

Dephosphorylierungsansätze:

200 µl Fraktion; 4,43 µM phosp. Opsin (PG 5,68); 10 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 1,5 (w/v) Octylglucosid

Abb. 25

SDS-Gelelektrophorese (Adsorptions-Chromatographie)

Probenauftrag:

Spur 1: 10 mM NaPP: Fraktion 2 (10 µg)

Spur 2: 50 mM NaPP: Fraktion 10 (10 µg)

Spur 3: 100 mM NaPP: Fraktion 17 (10 µg)

Spur 4: 200 mM NaPP: Fraktion 22 (10 µg)

Spur 5: 500 mM NaPP: Fraktion 26 (1,5 µg)

Spur 6: Retinen-Extrakt (RE-G): (40 µg)

3.5.4 Affinitäts-Chromatographie

3.5.4.1 Vorversuche

Für die Affinitäts-Chromatographie werden sowohl selektive als auch nicht-selektive Elutionsmethoden angewendet. Eine nicht-selektive Elution erfolgt bei Erhöhung der Ionenstärke (Einfluß der Ionenstärke auf die Phosphataseaktivität: siehe 3.4.2.1). Bei der selektiven Elution wird die Bindung des Proteins an die Matrix durch Wechselwirkungen z.B. mit einem Co-Faktor gelöst.

Bei Verwendung einer Matrix, die als Ligand den Farbstoff "Cibacron Blue" aufweist, wird eine selektive Proteinelution durch ATP im Elutionspuffer erreicht.

Die Abb. 26 zeigt den Einfluß von ATP auf die Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt. Die Phosphataseaktivität ist durch ATP konzentrationsabhängig inhibiert. Diese Inhibierung ist nach Pufferumstellung (Ultrafiltration bzw. Gelfiltration) reversibel (zeitabhängiger Aktivitätsverlust siehe: 3.2.3.3).

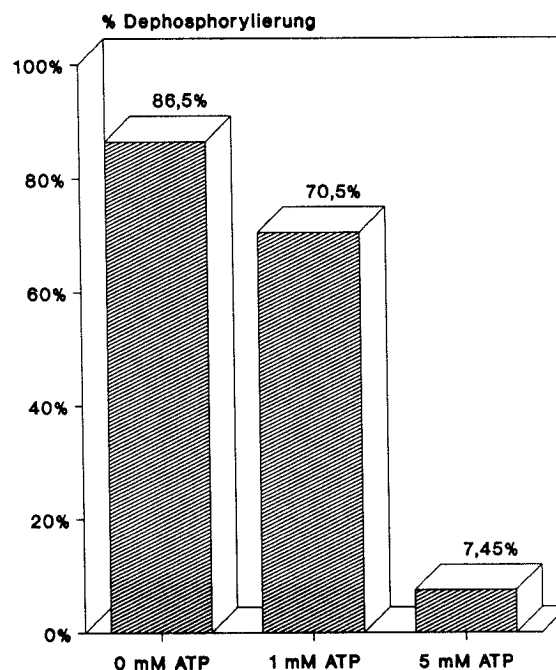


Abb. 26

Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt (RE-G) in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration. Angegeben ist die Phosphataseaktivität als % Dephosphorylierung nach einer Inkubation von 60 min.

Dephosphorylierungsansätze:

0,52 μ M Retinen-Extrakt (RE-G)

(Rhodopsinkonzentration bei der Extrakt-Präparation (vgl. 2.4))

2,36 μ M phosph. Opsin (PG 5,68)

10 mM Tris/HCl pH 7,2; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 2 mM MgCl; 1,5 % (w/v) Octylglucosid; 0 mM/5 mM ATP (siehe Abb. 25)

In den Vorversuchen zur Phosphatasereinigung wurde unter verschiedenen Versuchsbedingungen Retinen-Extrakt auf Affi-Gel-Blue-Säulen aufgetragen und die Proteine sowohl selektiv als auch nicht-selektiv eluiert. Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ein erheblicher Anteil der Proteine aus Retinen-Extrakt bindet an die Matrix (Affi-Gel-Blue, BioRad)
- in einem Salzgradienten (nicht-selektive Elution) erfolgt die erste Proteinelution bei einer NaCl-Konzentration von etwa 100 mM NaCl
- die Phosphatase wird bei einer Salzkonzentration oberhalb von 400 mM NaCl von der Säule eluiert
- mit ATP als selektives Eluent wird die Phosphatase nicht von der Säule eluiert.

3.5.4.2 Reinigungs-Versuch

Aus den Ergebnissen der Vorversuche wurde folgende Reinigungsstrategie entwickelt:

- a) Aufgabe von Retinen-Extrakt auf die Säule in Anwesenheit von 100 mM NaCl (Abtrennung der nicht an die Matrix bindenden Proteine)
- b) spez. Elution von nicht-Phosphatase-Proteinen mit ATP
- c) Elution der Phosphatase mit einer Salzstufe (500 mM NaCl).

Nach der Equilibrierung der Säule wurden 3 ml Retinen-Extrakt aufgetragen und mit 20 ml Säulenpuffer "nachgewaschen". Die Proteinelution erfolgte stufenweise (jeweils 20 ml) in Säulenpuffer mit unterschiedlichen Eluenten: 1) 10 mM ATP; 2) 500 mM NaCl. Die Endreinigung der Säule erfolgte mit 30 ml 2 M Guanidin-HCl. Fraktionen von 1,4 ml wurden aufgefangen. Die Flußrate betrug 0,45 ml/min.

Die Fraktionen wurden nach Entnahme von Aliquots zur Proteinbestimmung (Bradford, 1976) bzw. für die Gelelektrophorese SDS-denaturiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zum Phosphataseaktivitätstest wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

In der Abb. 27 ist das Proteinelutionsprofil der Affinitäts-Chromatographie dargestellt.

Die Abb. 28 (SDS-Gel) zeigt die Proteinauftrennung in den verschiedenen Elutionsstufen.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen bindet etwa 75 % des aufgetragenen Proteins an die Säulenmatrix. Etwa 15 % wird durch ATP von der Säule eluiert und etwa 10 % des Gesamtproteins wird durch die Erhöhung der Salzkonzentration auf 500 mM eluiert. 50 % des aufgegebenen Proteins wird erst bei der "Endreinigung" der Säule über Guanidin/HCl eluiert. Die SDS-Gelelektrophorese (Abb. 28) zeigt in den unterschiedlichen Elutionsstufen verschiedene Proteinmuster und einen deutlichen Reinigungseffekt.

Proteinelution

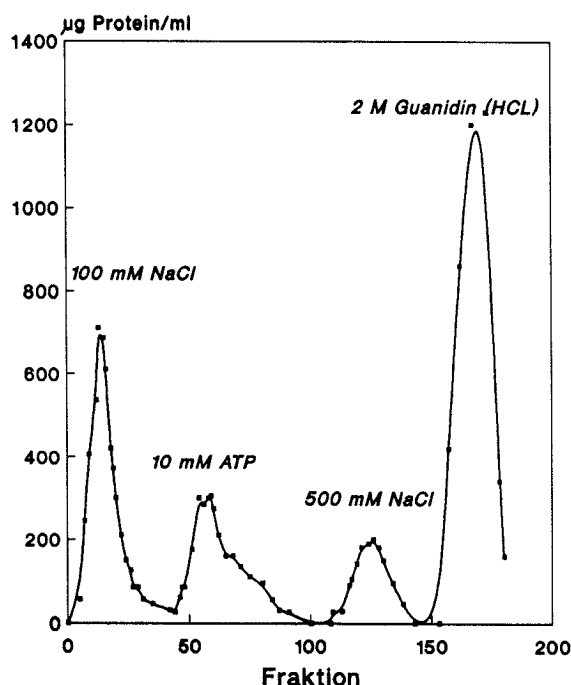


Abb. 27

Proteinelutionsprofil der Affinitäts-Chromatographie

Versuchsbedingungen:

Probenauftrag (a): 3 ml Retinen-Extrakt (RE-G) in Säulenpuffer:

20 mM Hepes pH 7,2; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 1 mM MgCl.

Proteinelution (b): 10 mM ATP in Säulenpuffer (c) 500 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 7,2; 1 mM DTT, 1 mM MgCl (d) 2 M Guanidin-HCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,8.

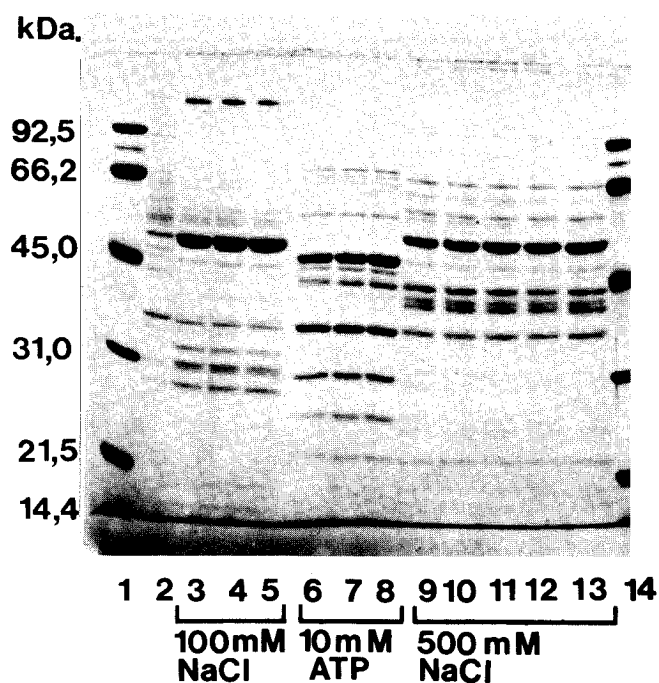


Abb. 28

SDS-Gelelektrophorese (Affinitäts-Chromatographie)

Probenauftrag:

Spur 1:	Molekulargewichtsstandard (2 μg Protein/Bande)
Spur 2:	Retinen-Extrakt (RE-G) (5 μg Protein)
Spur 3-5:	Fraktion 13-15: 100 mM NaCl ("Durchlauf") (je 10 μg Protein)
Spur 6-8:	Fraktion 55-57: 10 mM ATP (je 10 μg Protein)
Spur 9-13:	Fraktion 122-126: 500 mM NaCl (je 10 μg Protein)
Spur 14:	Molekulargewichtsstandard (2 μg Protein/Bande)

Für Phosphatasetests wurden einzelne Fraktionen (siehe nachfolgende Tabelle) aus den Bereichen der "Peak-maxima" (siehe Abb. 26) aufgetaut.

Die Dephosphorylierungsergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt und werden den Dephosphorylierungsergebnissen von frischem Retinen-Extrakt gegenübergestellt:

- RE-G: Phosphataseaktivität von RE-G unter optimierten Versuchsbedingungen: pH; geringe Ionenstärke (siehe Legende zur Tabelle)
- RE-G: Phosphataseaktivität von RE-G in Anwesenheit von 200 mM NaCl (entspricht der Ionenstärke der Dephosphorylierungsansätze der Elutionsstufe: 500 mM NaCl).

Elutionsstufe	Fraktion	$\mu\text{g Prot./ml}$	$\mu\text{g Prot./Ansatz}$	% Dephosph.	pMolPi/ $\mu\text{g Protein}$
"Durchlauf" 100 mM NaCl	8	305	61	42,6	52,3
	12	535	107	54,4	38,0
	13	710	142	52,7	27,8
	16	610	122	44,8	27,5
10 mM ATP	51	175	35	0,8	1,7
	54	300	60	3,2	4,0
	58	300	60	0,7	0,9
	62	210	42	2,9	5,1
	63	190	38	1,1	2,1
500 mM NaCl	114	55	11	12,2	82,9
	116	90	18	14,1	58,6
	121	180	36	11,6	24,1
	123	190	38	17,5	33,5
	125	200	40	9,6	17,9
	126	200	40	14,3	26,7
	128	180	36	8,7	18,1
	130	150	30	10,4	25,9
	135	95	19	8,2	32,3
	142	60	11	4,2	28,5
Vergleichs- ansätze					
0 mM NaCl	a) RE-G	15000	37,5	62,0	123,7
200 mM NaCl	b) RE-G	15000	37,5	23,9	47,7

Tabelle 2

Phosphataseaktivität verschiedener Fraktionen der Affinitäts-Chromatographie (Proteinelutionsdiagramm siehe Abb. 27).

Inkubationsdauer: 30 min

Dephosphorylationsansätze: "Fraktionen":

2,9 μM phosp. Opsin (PG 5,16)

200 μl Fraktion (Proteingehalt siehe Tabelle)

20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,7; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

Dephosphorylierungsansätze: RE-G (Vergleichsansätze)

2,9 μM phosp. Opsin

0,13 μM RE-G (bezogen auf die Rhodopsinkonzentration bei der Extraktpräparation (Proteingehalt siehe Tabelle))

a) 20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,7; 1 mM DTT; 1 mM MgCl; 1,5 % (w/v) Octylglucosid

b) 200 mM NaCl (entspricht den Dephosphorylierungsansätzen der Elutionsstufe: 500 mM NaCl), 20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,7; 1 mM DTT, 1 mM MgCl

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Eine Phosphataseaktivität ist nachweisbar

(a) im "Durchlauf" (100 mM NaCl)

(b) in der 500 mM NaCl-Elutionsstufe.

zu (a):

In Vorversuchen ohne Salz im Säulenpuffer war keine "Durchlauf"-Aktivität nachweisbar. Die "Durchlauf"-Aktivität beruht auf einer "Überladung" der Säule bei gleichzeitiger Anwesenheit von 100 mM NaCl im Säulenpuffer. Offensichtlich erniedrigt die zur Elution der Phosphatase nicht ausreichende Ionenstärke von 100 mM NaCl die Affinität der Phosphatase zur Matrix erheblich.

zu (b):

Die Phosphataseaktivität der Elutionsstufe 500 mM NaCl ist im Vergleich zur Phosphataseaktivität von RE-G erniedrigt. Trotz teilweiser Proteinabtrennung ist eine erniedrigte spez. Aktivität festzustellen. Die Gründe hierfür sind:

- zeitabhängiger Aktivitätsverlust (siehe 3.2.3.3) (vor der eigentlichen Elution war die Phosphatase etwa 2 h an die Säulenmatrix gebunden)
- hohe Ionenstärke (200 mM NaCl) in den Dephosphorylierungsansätzen (Abhängigkeit der Phosphataseaktivität von der Ionenstärke siehe (3.5.2.1)).

Die Vergleichsansätze mit Retinen-Extrakt (siehe Tabelle 2) zeigen eine deutliche Inhibierung der Phosphataseaktivität (Faktor 2,6) bei einer Ionenstärke von 200 mM NaCl.

Die Phosphataseaktivität der Aliquots aus der Elutionsstufe "500 mM NaCl" sind sicher ebenso durch die relativ hohe Ionenstärke inhibiert. Ein Vergleich dieser Dephosphorylierungsergebnisse mit den Retinen-Extrakt-Versuchen zeigt, daß die Phosphataseaktivität dieser Fraktionen bei niedriger Ionenstärke sicher um einen Faktor 2 - 3 höher liegen würde.

Aliquots der Elutionsstufe "500 mM NaCl" wurden ultrafiltriert und die Phosphataseaktivität nach Pufferumstellung (20 mM Na-Acetat, 1 mM MgCl, 1 mM DTT) erneut bestimmt. Diese "entsalzten" Aliquots wiesen jedoch eine geringere Phosphataseaktivität als die ursprünglichen Proben auf. Die Ultrafiltration bedingt einen erheblichen Phosphataseaktivitätsverlust. Dieser Aktivitätsverlust ist

Phosphatase-Konzentrationsabhängig (Ergebnisse nicht gezeigt): Verdünnte Lösungen, wie z.B. Fraktionen verschiedener Säulen zeigen bei Ultrafiltration erheblich höheren Phosphataseaktivitätsverlust im Vergleich zu Retinen-Extrakt.

3.5.4.3 Kombination der verschiedenen Reinigungsmethoden

Zur weiteren Reinigung der Phosphatase aus Retinen-Extrakt habe ich verschiedene Reinigungsmethoden kombiniert (Ergebnisse nicht gezeigt). Als Ausgangsmaterial habe ich, da hierbei die größte Vorreinigung auftritt, aktive Phosphatasefraktionen aus der Affinitätschromatographie gewählt. Nach Pufferumstellung (Ultra-Filtration oder Gel-Filtration) auf niedrige Ionenstärke wurden die Fraktionen entweder auf eine Adsorptions-Chromatographie-Säule oder aber auf eine Anionen-Austauscher-Säule aufgetragen und die Proteine auf der Grundlage der erarbeiteten Versuchsbedingungen (siehe 3.5.3.2 und 3.5.2.1) eluiert. Bei der Adsorptions-Chromatographie habe ich die unter 3.5.2.1 beschriebenen Versuchsbedingungen (Säule, Elutionsstufen) verwendet.

Die Anionen-Austausch-Chromatographie habe ich in diesem Falle auf einer LKB-High-Pressure-Liquid-Chromatography-Anlage (HPLC) durchgeführt. Als Anionen-Austauscher-Säule wurde eine FPLC-Mono Q HR 5/5-Säule (Pharmacia) verwendet. In diesen "Kombinationsversuchen" erfolgte unter den verschiedenen Elutionsbedingungen eine fraktionierte Proteinelution (OD 280), wie sie aufgrund der Vorversuche bei den verschiedenen Gelchromatographien zu erwarten war. Ich habe im Anschluß die verschiedenen Fraktionen nach erneuter Pufferumstellung auf Phosphataseaktivität getestet. Aufgrund hoher Aktivitätsverluste im Verlauf der einzelnen Reinigungsschritte war es bisher jedoch nicht möglich, ein einheitliches Protein mit Phosphataseaktivität zu gewinnen. Dazu müßten größere Mengen an Phosphatasehaltigem Ausgangsmaterial und damit verbunden, größer dimensionierte Säulen eingesetzt werden.

3.6 Isoelektrische Fokussierung von Retinen-Extrakt

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine aufgrund unterschiedlicher Ladung voneinander getrennt. Diese Methode bietet im Gegensatz zur SDS-Gelelektrophorese, da unter nicht-denaturierenden Bedingungen gearbeitet wird, die Möglichkeit, eine Enzymaktivität im Gel nachzuweisen. Die Enzymaktivität ist zum Beispiel durch eine mit einem Substratumsatz verbundene Färbung des entstehenden Produkts möglich. Aufgrund derartiger Aktivitätsfärbungen ist die Charakterisierung der entsprechenden Enzyme bezüglich ihres isoelektrischen Punktes möglich.

Es ist bisher nicht geklärt, ob bei der Verwendung von ROS- bzw. Retinen-Extrakt mehrere verschiedene, möglicherweise unspezifische Phosphatasen an der Dephosphorylierung des Rhodopsins beteiligt sind. Um erste Hinweise auf die Frage zu bekommen, ob unter diesen Versuchsbedingungen mehrere Phosphatasen an der Dephosphorylierung beteiligt sind, habe ich sowohl ROS- als auch Retinen-Extrakt und zum Vergleich eine saure Phosphatase aus der Kartoffel isoelektrisch fokussiert. Nach der Fokussierung habe ich zum Nachweis der Phosphataseaktivität die Gele über mehrere Stunden bei 30 °C in einer Phosphatase-Substrat-Lösung inkubiert (siehe 2.12.3.3).

Gleich-beladene Gele wurden mit Coomassie-Blue angefärbt (siehe 2.12.3.2) und parallel hierzu der pH-Gradient in unbeladenen Gelen bestimmt (siehe 2.12.3.1). Abb. 29 zeigt das Ergebnis einer isoelektrischen Fokussierung.

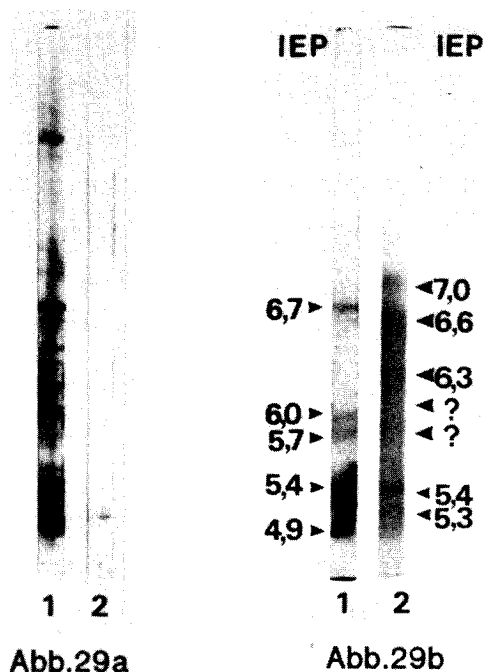


Abb. 29

Isoelektrische Fokussierung von Retinen-Extrakt und einer gereinigten Phosphatase aus der Kartoffel (siehe Text).

Abb. 29a: Coomassie-angefärbte Gele

Abb. 29b: Enzym-Aktivitätsfärbung

1) Retinen-Extrakt (RE-G), 150 µg Proteinauftragung

2) saure Phosphatase aus Kartoffel, etwa 0,5 µg Enzymprotein (30 mU), etwa 4,5 µg Rinderserumalbumin

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Eine Enzymaktivitätsfärbung tritt nach der isoelektrischen Fokussierung sowohl bei Retinen-Extrakt als auch bei der gereinigten käuflichen Phosphatase auf. In beiden Fällen treten im Bereich zwischen pH 7,0 und 4,9 deutliche, auf Enzymaktivität zurückzuführende Banden auf. Im Falle der gereinigten Phosphatase aus der Kartoffel konnte ich mindestens 5 voneinander getrennte Banden finden. Weitere phosphatase-aktive Banden sind im Gel im pH-Bereich zwischen 6,6 und 5,4 angedeutet, sind aber wegen der hohen Hintergrundfärbung nicht eindeutig zu identifizieren. Sie sind deshalb in der Abb. 29 mit einem Fragezeichen versehen.

Die Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt war in 5 voneinander getrennten Banden nachweisbar, wobei auch hier im Gel noch zusätzliche Banden im Bereich zwischen pH 7,0 und 5,4 auftreten, deren IEP jedoch wegen zu geringer Enzymaktivität bisher nicht zu bestimmen war. Schätzungsweise etwa 60 - 70 % der aufgetragenen Proteine aus Retinen-Extrakt wandern während der Fokussierung nicht ins Gel, sondern fallen an der Gelgrenze aus. Die Proteindenaturierung ist wahrscheinlich methodisch bedingt, da um Phosphataseaktivität nachweisen zu können, große Mengen Extrakt aufgetragen werden müssen. Die Intensität der Coomassie-Färbung entspricht aus diesem Grunde nicht der eingesetzten Proteinmenge und eine quantitative Abschätzung des Phosphatase-Gehaltes im Retinen-Extrakt im Vergleich zur Phosphatase aus Kartoffel ist nicht ohne weiteres möglich. Die bei Retinen-Extrakt ermittelten isoelektrischen Punkte der verschiedenen Banden entsprachen weitgehend denen der sauren Phosphatase aus der Kartoffel.

Eine Enzymaktivitätsfärbung bei ROS-Extrakt ist bisher nicht gelungen, was durch den geringen Phosphatasegehalt und Aktivitätsverluste bei der Fokussierung zu erklären ist. Ein direkter Vergleich von ROS- und Retinen-Extrakt ist daher noch nicht möglich.

Die "Aufspaltung" der gereinigten sauren Phosphatase aus der Kartoffel in mehrere phosphatase-aktive Banden zeigt, daß sie zumindest bei der isoelektrischen Fokussierung ein heterogenes Protein darstellt.

Eine Beantwortung der Frage, ob im Retinen-Extrakt mehrere verschiedene Phosphatasen wirksam sind, ist aufgrund dieser Versuchsergebnisse nicht möglich.

4. Diskussion

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist ein genereller Mechanismus zur Steuerung enzymatischer Prozesse (Ingebritsen & Cohen, 1983).

In neuronalen Systemen ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen an verschiedenen regulativen Prozessen sowohl inter- als auch intrazellulär beteiligt. Unter anderem wird über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung die Erregbarkeit der Zelle moduliert (Nestler & Greengard, 1984; Walaas & Greengard, 1986).

Die Phosphorylierung der Rezeptoren wird als ein genereller Mechanismus zur Desensibilisierung diskutiert (Sibley et al., 1987). Die Dephosphorylierung der Rezeptoren wird als ein Mechanismus zur Rückführung in einen perzeptionssensiblen Zustand verstanden (Sibley et al., 1986).

Wie Wilden et al. (1986) zeigen konnten, verläuft bei der Photorezeption die PDE-Inaktivierung über eine Kompetition zwischen Transducin- und Arrestinbindung an das phosphorylierte Rhodopsin. Das heißt, die Transducinbindung wird durch eine erhöhte Affinität des phosphorylierten Rhodopsins zum Arrestin inhibiert. Aufgrund der Arrestinbindung an phosphoryliertes Rhodopsin kommt es zu keiner weiteren Transducin- und damit PDE-Aktivierung. Die Phosphorylierung ist somit an der Desensibilisierung beteiligt und zu verstehen als ein Abschaltmechanismus der licht-aktivierten Enzymkaskade (Wilden et al., 1986).

Im Gegensatz hierzu stehen zwei weitere Modelle zur Abschaltung der licht-aktivierten Enzymkaskade:

Die Bildung des $T\alpha$ -GTP-Komplexes wird durch die Phosphorylierung des Rhodopsins unterdrückt, was lediglich die Anfangsgeschwindigkeit der PDE-Aktivierung beeinflusst. Die PDE-Inaktivierung erfolgt direkt über Arrestin und ATP, unabhängig von der Phosphorylierung des Rhodopsins (Zuckerman & Cheasty, 1986).

Die Inaktivierung der PDE erfolgt nur über die Phosphorylierung des Rhodopsins. Das phosphorylierte Rhodopsin ist nicht mehr in der Lage, das Transducin zu aktivieren. Arrestin hat lediglich einen geringen, beschleunigenden Einfluß auf die Inaktivierung (Bennett & Sitaramayya, 1988).

Die Signalverarbeitung dieses "Rhodopsin-Phosphodiesterase-Systems weist sowohl auf der Rezeptorebene als auch auf der Ebene der nachgeschalteten enzymatischen Prozesse beachtliche Homologie zu einem funktionell völlig verschiedenen, hormonell stimulierten Rezeptor-Effektor-System auf: β -adrenerger Rezeptor-Adenylatzyclase-System (Lefkowitz et al., 1986; Sibley et al., 1987).

Die Stimulierung des β -adrenergen Rezeptors erfolgt hormonell gesteuert über Catecholamine (Sibley & Lefkowitz, 1985).

Die Desensitisierung des β -adrenergen Rezeptors erfolgt homolog zum Rhodopsin durch Phosphorylierung. Hierbei sind verschiedene Kinasen in der Lage, den β -adrenergen Rezeptor zu phosphorylieren: Die Phosphorylierung erfolgt mittels einer cAMP-abhängigen Protein-Kinase A (Benovic et al., 1985) oder aber mittels einer β -adrenergen-Rezeptor-Kinase, die cAMP-unabhängig ist (Benovic et al., 1986a). Die Protein Kinase C phosphoryliert ebenfalls den β -adrenergen Rezeptor (Bouvier et al., 1987). Benovic und Mitarbeiter (1986b) konnten zeigen, daß die Rhodopsin-Kinase ebenfalls in der Lage ist, den β -adrenergen Rezeptor nach Agonist-Bindung (Catecholamine) zu phosphorylieren. Umgekehrt phosphoryliert die β -adrenerge Rezeptor-Kinase ebenfalls das Rhodopsin nach Belichtung.

Es wird vermutet, daß die Bindung eines bisher nicht identifizierten Proteins an den phosphorylierten Rezeptor, homolog zum Rhodopsin-System (Wilden et al., 1986) zur vollständigen Desensitisierung führt. Dieses bisher nicht identifizierte Protein ist nämlich durch gereinigtes Arrestin aus der Rinderretina zu ersetzen (Benovic et al., 1987).

Aufgrund der bekannten Homologien zwischen dem Rhodopsin-Phosphodiesterase-System und dem β -adrenergen Rezeptor-Adenylatzyclase-System sind auch für die Dephosphorylierung Homologien zu erwarten.

Im Gegensatz zur Phosphorylierung ist über die Dephosphorylierung dieser unterschiedlichen Rezeptoren bisher sehr wenig bekannt. Eine quantitative Dephosphorylierung von durchschnittlich hoch phosphoryliertem Rinderrhodopsin wird in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

Kürzlich beschrieben Yang et al. (1988) Homologien bei der Dephosphorylierung des β -adrenergen Rezeptors und des Rhodopsins mit einer "latenten Phosphatase 2". Diese Versuchsergebnisse und die Rückschlüsse, die Yang et al. (1988) aus diesen Ergebnissen ziehen, werden im nachfolgenden Kapitel eigenen Ergebnissen gegenübergestellt.

4.1 Diskussion der Versuchsergebnisse

4.1.1 Unterschiedliche Phosphatasequellen

Eine rhodopsinspezifische Phosphatase ist zu erwarten in der Nähe ihres physiologisch wirksamen Ortes. Die von mir verwendeten Phosphatasequellen (ROS-Extrakt bzw. Retinen-Extrakt) unterscheiden sich deutlich in ihrer Phosphataseaktivität:

Retinen-Extrakt war etwa um einen Faktor 60 aktiver als ROS-Extrakt (siehe 3.2.3).

Erklärungsmöglichkeiten hierfür sind:

- Aus ganzen Retinen wird eine Anzahl Phosphatasen extrahiert, welche in unterschiedliche biochemische Prozesse integriert sind. Diese Phosphatasen sind unspezifisch aktiv gegenüber phosphoryliertem Rhodopsin/Opsin. Die eigentliche spezifische Rhodopsin-Phosphatase, welche unter physiologischen Bedingungen in den Außensegmenten der Stäbchenzellen zu erwarten ist, wird durch die unspezifisch aktiven Phosphatasen "überdeckt".
- Bei der Präparation der ROS geht bereits ein Großteil der rhodopsinspezifischen Phosphatase verloren.
- Die rhodopsinspezifische Phosphatase ist vergleichbar dem Arrestin (Broekhuysen et al. 1985) überwiegend im Innensegment lokalisiert und wird deshalb bei der Präparation aus ROS nicht erfaßt.

Diese Erklärungsmöglichkeiten gehen alle von der Existenz einer rhodopsinspezifischen Phosphatase aus.

Yang et al. (1988) beschreiben eine Dephosphorylierung des β -adrenergen Rezeptors und die Dephosphorylierung von phosphoryliertem Rhodopsin mit einer latenten Phosphatase 2 aus Schweinehirn (Yang et al., 1986).

Das Rhodopsin wurde mit einer β -adrenergen Rezeptor-Kinase bei Licht phosphoryliert. Der durchschnittliche Phosphorylierungsgrad lag bei 0,05 Mol Phosphat/Mol belichtetem Rhodopsin und damit um mehr als einen Faktor 100 niedriger als das von mir verwendete Substrat für die Dephosphorylierungsversuche! Die latente Phosphatase 2 ist jedoch erst aktiv nach einer 2-Mercaptoethanol-Behandlung. Diese Behandlung führt zu einer Abspaltung der katalytischen Unter-einheit von der Phosphatase und damit zur Aktivierung (Yang et al., 1988).

Keine Dephosphorylierung des phosphorylierten β -adrenergen Rezeptors bzw. des phosphorylierten Rhodopsins wurde mit weiteren Phosphatasen vom Typ 1 (Yang & Fong, 1985), Typ 2A (Yang et al., 1986) und Typ 2B (Yang et al., 1982) erreicht. Aufgrund dieser Ergebnisse postulieren Yang und Mitarbeiter (1988) eine rezeptorspezifische Phosphatase möglicherweise vom Typ der latenten Phosphatase 2.

Eine Phosphatasereinigung aus ROS-Extrakt bzw. Retinen-Extrakt ist bisher noch nicht soweit gelungen, daß eine Zuordnung der Phosphatase aus diesen Extrakten zu den in der Literatur beschriebenen Phosphatasen möglich wäre.

Eine für die Aktivierung der latenten Phosphatase 2 unbedingt notwendige Mercaptoethanol-Behandlung führt jedoch bei der Phosphatase aus ROS- bzw. Retinen-Extrakt nicht zu einer Aktivierung, sondern vielmehr zu einer verminderten Aktivität (siehe 3.3.1).

Meine Versuche zur Dephosphorylierung von phosphoryliertem Opsin mit einer sauren Phosphatase aus der Kartoffel zeigen eindeutig, daß völlig unspezifische Phosphatasen in der Lage sind, den phosphorylierten Rezeptor zu dephosphorylieren. Aufgrund dieser Ergebnisse bin ich der Ansicht, daß die Dephosphorylierung des Rhodopsins unter in-vivo-Bedingungen nicht zwingend über eine "rezeptorspezifische Phosphatase" vom Typ latente Phosphatase 2, wie sie von Yang und Mitarbeitern postuliert wird, erfolgt.

4.1.2 "Detergenzaktivierung"

Sowohl bei Verwendung von ROS-Extrakt, als auch bei Verwendung von Retinen-Extrakt wurde eine erheblich erhöhte Phosphataseaktivität in Anwesenheit von Detergenz festgestellt.

Denkbar ist sowohl ein Einfluß des Detergenz auf das Substrat (4.1.2.1) als auch ein Einfluß des Detergenz auf die Phosphatase (4.1.2.2).

4.1.2.1 Detergenzeinfluß auf das Substrat

Ein Detergenzeinfluß auf das Substrat würde z.B. bestehen in einer Auflösung des natürlichen Lipidverbandes und damit verbundener Konformationsänderung des phosphorylierten Rhodopsins/Opsins. Eine erhöhte Phosphataseaktivität wäre demnach zu erklären in einer verbesserten Zugänglichkeit der Phosphatase zum Substrat. Verschiedene Rhodopsin/Opsin-Substrate (siehe 3.2.1.3) werden jedoch

von der Phosphatase unabhängig von unterschiedlichen Konformationen gleichermaßen dephosphoryliert. In keinem Falle ist zu erkennen, daß eine bestimmte Konformation in Abwesenheit von Detergenz bevorzugt dephosphoryliert wird.

Es ist anzunehmen, daß unterschiedlich hoch phosphorylierte Rhodopsine aufgrund unterschiedlicher Ladung ebenfalls verschiedene Konformationen aufweisen. Präparationen mit unterschiedlich hohem durchschnittlichen Phosphorylierungsgrad werden jedoch alle detergenzaktiviert dephosphoryliert (siehe 3.2.1.5).

Unter physiologischen Bedingungen sind derart gravierende Konformationsänderungen des Gesamtmoleküls, wie sie unter in-vitro-Bedingungen mit Detergenz erreicht werden, nicht denkbar.

Wenn unter in-vivo-Bedingungen eine Konformationsänderung des Moleküls wirklich Voraussetzung für eine optimale Phosphatasezugänglichkeit sein sollte, dann müßte diese Konformationsänderung stärker sein als z.B. der Übergang vom Rhodopsin zum Opsin. Eine solche Erklärung wird durch keine Daten belegt und ist unwahrscheinlich!

Die Dephosphorylierungsversuche mit unspezifischen Phosphatasen (siehe 3.4) aus der Kartoffel bzw. aus Kälberdarm zeigen keine Detergenzaktivierung. Im Gegenteil bewirkt Detergenz einen leichten Aktivitätsverlust. Wäre lediglich die Konformation des Substrates verantwortlich für die Zugänglichkeit und damit für die Aktivität der eingesetzten Phosphatase, so wäre auch in diesen Versuchen eine Detergenzaktivierung zu erwarten gewesen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß ein Einfluß des Detergenz auf das Substrat wohl nicht die Aktivitätssteigerung der Phosphatase aus ROS- bzw. Retinen-Extrakt erklären können.

Denkbar ist noch eine präparationsbedingt verschlechterte Zugänglichkeit der Phosphatase zum Substrat: Bei der Substratpräparation (siehe 2.6) werden die Membranen zweimal ultrabeschallt und nach der Phosphorylierung mehrfach hypotonisch gewaschen. Bei dieser Behandlung ist eine Bildung von inside-out Vesikeln möglich. Bei inside-out Vesikeln läge der phosphorylierte C-Terminus des Rhodopsins innerhalb der Vesikel und wäre in den Dephosphorylierungsversuchen einer Phosphatase nicht zugänglich. Die festgestellte Detergenzaktivierung läge somit in einer Auflösung des Lipidverbandes und einer verbesserten Zugänglichkeit der Phosphatase zu den in dem inside-out Vesikeln "abgeschirmten" phosphorylierten C-Terminus des Moleküls.

In Vorversuchen (Ergebnisse nicht gezeigt) wurden Dephosphorylierungsansätze mit Retinen-Extrakt als Phosphatasequelle in An- und Abwesenheit von Detergenz zu verschiedenen Zeiten nach Versuchsbeginn beschallt. Eine Beschallung sollte in den Versuchsansätzen ohne Detergenz zu einer Umverteilung der inside-out- und outside-out Vesikel führen, das heißt: Bei Beschallung zu verschiedenen Zeiten während des Dephosphorylierungsversuchs sollten in den Vesikeln "verdeckte" Phosphatreste (inside-out) neu orientiert werden (outside-out) und somit der Phosphatase zugänglich werden.

Eine Beschallung induziert jedoch in keinem Falle eine Steigerung der Phosphataseaktivität.

Diese Ergebnisse sind jedoch nicht eindeutig, da in Kontrollversuchen (Beschallung von Extrakt) festgestellt wurde, daß die Phosphataseaktivität durch Beschallung abnimmt. Die Aktivitätsverluste sind abhängig vom Zeitpunkt der Beschallung. Sie liegen zwischen 20 % (Beschallung zu Versuchsbeginn) und 5 % (Beschallung nach einer Inkubationszeit von 30 min) bei einer maximalen Phosphataseaktivität von 40 % (ohne Beschallung). Die angegebenen Werte beziehen sich auf eine Inkubationszeit von 180 min.

Es ist möglich, daß die durch die Neuorientierung verbesserte Zugänglichkeit durch den Phosphataseaktivitätsverlust kompensiert wird.

Gegen eine "Substrat-Aktivierung" durch das Detergenz spricht ebenfalls die Tatsache, daß der Rhodopsinkinase in Abwesenheit von Detergenz die verschiedenen Phosphorylierungsstellen wohl zugänglich sind. Bei der Präparation des phosphorylierten Rhodopsins wird das Rhodopsin ebenfalls beschallt (siehe Material und Methoden) und trotz möglicher Bildung von inside-out Vesikeln werden hohe durchschnittliche Phosphorylierungsgrade erreicht. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Versuchsbedingungen bei der Phosphorylierung gänzlich andere sind als bei der Dephosphorylierung: Bei der Phosphorylierung wird die Kinase als ROS-Protein mit den ROS in den Versuch eingebracht, die Versuchsbedingungen entsprechen näherungsweise den physiologischen Bedingungen. Aber die Phosphorylierungsreaktion verläuft trotzdem wesentlich schneller bei Zugabe von Kinase-haltigem Extrakt (Wilden, 1981).

Diese nachträgliche Zugabe von Extrakt entspricht dem Verfahren, das ich bei den Dephosphorylierungsversuchen angewendet habe. Die Versuche zeigen, daß zumindest die Kinase, auch wenn sie zusätzlich von "außen" zugegeben wird, die Phosphorylierungsstellen erreicht.

Bei den Dephosphorylierungsversuchen sind die Verhältnisse komplizierter: Nach der Phosphorylierung wird das Rhodopsin mehrfach hypotonisch gewaschen. Diese Präparationen weisen keine eigene Phosphataseaktivität mehr auf. Durch die hypotonischen Waschungen sind erhebliche, möglicherweise im Vergleich zu der relativ schonenden Beschallung, gravierende Um- oder Neuorientierungen der Vesikel zu erwarten.

Ich kann die Möglichkeit, daß die Phosphataseaktivität durch inside-out Vesikel beeinflußt ist, nicht sicher ausschließen. Die Ergebnisse und der Vergleich mit der Kinase-Zugänglichkeit zum Substrat lassen diese Möglichkeit jedoch unwahrscheinlich erscheinen.

4.1.2.2 Detergenzeinfluß auf die Phosphatase

Phosphatasen stellen soweit bisher beschrieben, keine monomeren Proteine dar. Sie sind vielmehr aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Tamura & Tsuiki, 1980; Ingebritsen & Cohen, 1983; Yang et al., 1984). Die Aktivität der katalytischen Untereinheit (Untereinheiten) verschiedener Phosphatasen z.B. aus dem Glycogenstoffwechsel wird über Effektoren reguliert (Yang et al., 1981; Ingebritsen & Cohen, 1983).

Zur Aktivierung latenter Phosphatasen werden unter in vitro-Bedingungen Methoden (Mercaptoethanol-Behandlung, Ethanol-fällung) angewendet, die die Tertiärstruktur der Enzyme verändern. Beide Methoden gelten in der Literatur als Standardmethode zur Aktivierung bestimmter latenter Phosphatasen aufgrund einer Abspaltung der katalytischen Untereinheit vom Holo-Enzym.

Die Faktoren, die unter physiologischen Bedingungen die Aktivierung der latenten Phosphatasen bewirken, sind bisher völlig unbekannt (Yang et al., 1988).

Die zur Aktivierung latenter Phosphatasen beschriebenen Methoden führten bei ROS- bzw. Retinen-Extrakt zu keiner Aktivierung (siehe 3.3).

Nach einer Mercaptoethanol-Behandlung bzw. einer Ethanol-Fällung sind die Phosphatasen aus ROS-Extrakt bzw. Retinen-Extrakt nicht mehr detergent-aktivierbar (siehe 3.3.1 bzw. 3.3.2).

Die Dephosphorylierungsergebnisse sind nach einer Mercaptoethanol-Behandlung vergleichbar den Ergebnissen von unbehandeltem Extrakt ohne Detergenz. Aus diesen Versuchsergebnissen schließe ich, daß der aktivierende Mechanismus des Detergenz ein anderer sein muß als der für die 2-Mercaptoethanol-Behandlung

beschriebene Mechanismus (Abspaltung der katalytischen Untereinheit vom Holo-Enzym). Bei gleichem Mechanismus sollten nach Mercaptoethanol-Behandlung in Anwesenheit von Detergenz vergleichbare Dephosphorylierungen wie bei unbehandeltem Extrakt in Anwesenheit von Detergenz erreicht werden.

Detaillierte Angaben zum Mechanismus einer "Detergenzaktivierung" einer Phosphatase sind in der Literatur nicht zu finden. Dennoch ist die Verwendung von Detergenz in Zusammenhang mit einer Phosphatase nicht gänzlich neu: Eine erhöhte Aktivität einer sauren Phosphatase aus der menschlichen Prostata in Anwesenheit verschiedener Detergenzien (Triton X-100, Tween-80) wird von Tsuboi & Hudson (1954) beschrieben. Der Einfluß des Detergenz wird hierbei verstanden als ein Schutz vor einer nicht weiter definierten Oberflächen-Desaktivierung des Enzyms.

Die Versuchsergebnisse sprechen für einen direkten Einfluß des Detergenz auf die Phosphatase aus ROS- bzw. Retinen-Extrakt und nicht für einen Effekt auf das Substrat (siehe 4.1.2.2). So sind z.B. unspezifische Phosphatasen aus der Kartoffel (siehe 3.4) oder aus Kälberdarm nicht detergenzaktivierbar.

Die Frage, welchen Einfluß das Detergenz in den Dephosphorylierungsversuchen ausübt, ist abschließend sicher erst nach vollständiger Charakterisierung des Enzyms zu beantworten. Die Erklärungsmöglichkeiten für den Mechanismus der Detergenzaktivierung der Phosphatase sind bisher rein spekulativ und bedürfen weiterer experimenteller Überprüfung:

Die Detergenzaktivierung der Phosphatase beruht möglicherweise auf dem Einfluß des Detergenz auf die Tertiärstruktur des Enzyms: Es ist denkbar, daß "locker" assoziierte Untereinheiten des Enzyms durch das Detergenz voneinander getrennt werden. Möglicherweise werden dadurch inhibitorische Untereinheiten abgetrennt.

Es ist aber auch denkbar, daß die Konformation des aktiven Zentrums verändert wird, was zur Aktivierung führt. Der unter physiologischen Bedingungen wirksame Aktivator würde durch das Detergenz ersetzt. Die Versuche mit "ganzen ROS" als Phosphatasequelle (siehe 3.2.2) sprechen jedoch dafür, daß auch inaktivierende Faktoren die Aktivität der Phosphatase regulieren.

4.1.3 Dephosphorylierung verschiedener Substratkonformationen

Durch Detergenzien wird sowohl die Sekundär-Tertiär- als auch die Quartärstruktur von Proteinen beeinflusst. Eine Konformation des Rhodopsins bzw. des Opsins, wie sie im natürlichen Lipidverband gegeben ist, ist bei Anwesenheit von Detergenz in den Micellen nicht zu erwarten. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß in Anwesenheit von Detergenz sich die Konformation des C-terminalen Endes vom "Rhodopsin" bzw.

vom Opsin nur unwesentlich unterscheidet. Sieben der insgesamt neun Phosphorylierungsstellen des Rhodopsins befinden sich C-terminal (Hargrave et al., 1980). Dephosphorylierungsversuche in Anwesenheit von Detergenz lassen demnach keine deutlichen Unterschiede zwischen "verschiedenen" Konformationen erwarten.

In Abwesenheit von Detergenz ist die Konformation des Moleküls abhängig vom Belichtungszustand. Unterschiedliche Substratkonformationen wie phosphoryliertes Opsin, phosphoryliertes regeneriertes Rhodopsin oder "Zwischenstufen" wie Meta-Rhodopsin II oder III werden in Abwesenheit von Detergenz gleichermaßen dephosphoryliert (siehe 3.2.1.3).

Die Dephosphorylierung erfolgt ebenso unabhängig von unterschiedlichen durchschnittlichen Phosphorylierungsgraden (siehe 3.2.1.5), welche ebenfalls verschiedene Konformationen aufweisen sollten. Die Aktivität der Phosphatase ist unter meinen Versuchsbedingungen unabhängig von der Konformation des Substrats. Welcher Konformationszustand des Rhodopsins unter in-vivo-Bedingungen das Substrat für die Phosphatase darstellt, ist bisher nicht geklärt.

Meine Ergebnisse unter in-vitro-Bedingungen lassen jeden Konformationszustand des Rhodopsins gleichermaßen gut als Substrat für die Phosphatase zu. Dies bedeutet, daß der Phosphorylierungsgrad des Rhodopsins nach Belichtung nicht unbedingt nur durch die Aktivität der Kinase bestimmt wird.

Es ist denkbar, daß der Phosphorylierungsgrad antagonistisch zur Kinase über die Aktivität der Phosphatase reguliert wird. In einem solchen Falle wäre die Dephosphorylierung nicht nur ein Mechanismus zur Rückführung des Rezeptors in den perzeptionssensiblen Zustand, sondern wäre vielmehr an einer "Feinregulierung" des Phosphorylierungsgrades beteiligt. Die Ergebnisse von U. Wilden (unveröffentlicht) zeigen, daß die PDE-Inaktivierung abhängig ist vom Phosphorylierungsgrad des Rhodopsins, das heißt: je höher der Phosphorylierungsgrad, desto stärker wird die Transducinbindung durch die Arrestinbindung kompetitiert, so daß es zu einer verminderten PDE-Aktivierung kommt.

Eine "Feinregulierung" des Phosphorylierungsgrades durch die Kinase und die Phosphatase ist möglicherweise verbunden mit einer Adaptation der Photorezeptorzelle: je aktiver die Phosphatase, desto niedriger wird das Rhodopsin phosphoryliert, desto aktiver (oder zeitlich länger aktiv) ist die PDE.

Die Denkmöglichkeit einer antagonistischen Regulation der Rhodopsinphosphorylierung beinhaltet die Forderung nach regulativen Mechanismen, durch welche die Aktivität der beteiligten Enzyme reguliert wird: Das zur Zeit wohl bestverstandene System, in dem Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen an der Signalverarbeitung und "Feinregulierung" der Zellantwort beteiligt sind, ist der Glycogenstoffwechsel. Die Regulation erfolgt hierbei in einem komplizierten,

in allen Teilreaktionen rückgekoppelten Netzwerk von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der beteiligten Enzyme (Cohen, 1976; Killilea et al., 1976; Cohen, 1982; Ingebritsen & Cohen, 1983).

Wenn die Rhodopsin-Phosphatase ihrerseits an der "Feinregulierung" der Zellantwort oder möglicherweise an einem Adaptationsprozeß beteiligt ist, dann ist nicht zu erwarten, daß ihre Aktivität nach einem einfachen An- bzw. Ausschaltmechanismus erfolgt. Vielmehr ist zu erwarten, daß ihre Aktivität über (bisher unbekannte) Faktoren oder Mechanismen reguliert wird.

Eine möglicherweise unter in vivo-Bedingungen komplizierte Regulation der Rhodopsinphosphatase würde die Schwierigkeit erklären, in in-vitro-Versuchen geeignete Bedingungen zur Aktivierung der Phosphatase zu finden.

4.1.4 Inhibierung der Phosphataseaktivität durch NaPP und ATP

Die meisten Enzyme, welche Substrate umsetzen, die Phosphatgruppen enthalten, werden unter in-vitro-Bedingungen durch anorganisches Phosphat inhibiert (Webb, 1963). Es wird angenommen, daß unter in-vitro-Bedingungen die meist kationische Bindungsstelle des aktiven Zentrums durch das Phosphat abgesättigt wird. Bei Anwesenheit von Phosphat kommt es zu einer kompetitiven Hemmung der Enzymaktivität.

Ein solcher Mechanismus erklärt Hemmung der Phosphataseaktivität aus ROS- bzw. Retinen-Extrakt durch NaPP (siehe 3.5.3.1).

Unter in-vitro-Bedingungen ist die Phosphataseaktivität von Retinen-Extrakt bei einer ATP-Konzentration von 1 mM bereits deutlich, bei einer Konzentration von 5 mM fast vollständig inhibiert (siehe 3.5.4.1). Diese ATP-Inhibierung ist jedoch nach Pufferumstellung (Ultrafiltration) reversibel (Ergebnisse nicht gezeigt).

Es ist nicht auszuschließen, daß die Inhibierung der Phosphataseaktivität durch ATP nach einem ähnlichen Mechanismus, wie er für anorganisches Phosphat beschrieben ist, verläuft.

Ein anderer Mechanismus der ATP-Inhibierung ist jedoch ebenso möglich: Die Phosphatase aus ROS- bzw. Retinen-Extrakt hydrolysiert in An- und Abwesenheit von Detergenz para-Nitrophenylphosphat zu para-Nitrophenol. Die Rhodopsin-Dephosphorylierung wird bei einer PNPP Konzentration von 500 μ M bei einem molaren Verhältnis Rhodopsin/PNPP von 1/100 halbmaximal inhibiert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Phosphatase aus ROS- bzw. Retinen-Extrakt in der Lage ist, die Phosphatreste von "Nicht-Protein-Substrat" zu hydrolysieren. Die PNPP-Hemmung der Phosphatase aus ROS- bzw. Retinen-Extrakt entspricht größenordnungsmäßig der ATP-Hemmung. In der Literatur werden Protein-Phosphatasen beschrieben, die in der Lage sind ATP zu hydrolysieren (Morton, 1965). Eine ATP-Hydrolase-Eigenschaft der Phosphatase aus ROS- bzw. Retinen-Extrakt würde ihre Inhibierung durch ATP unter in vitro-Bedingungen erklären (kompetitive Hemmung der Rhodopsin-Dephosphorylierung). Diese Fragestellung habe ich jedoch bisher nicht weiter untersucht.

Aus der ATP-Hemmung der Phosphataseaktivität unter in-vitro-Bedingungen ergibt sich eine Schwierigkeit bei der Übertragung auf in-vivo-Bedingungen: Die ATP-Konzentration im Stäbchenaußensegment liegt in einem Bereich von 2 bis 5 mM (Robinson et al., 1975). In diesem Bereich ist die Phosphataseaktivität gegenüber phosphoryliertem Rhodopsin oder Opsin unter in-vitro-Bedingungen stark inhibiert. Die Dephosphorylierung von Rhodopsin erfolgt unter in-vivo-Bedingungen sicher unter anderen Gegebenheiten als unter in-vitro-Bedingungen:

Die Rhodopsinkonzentration beträgt unter in-vivo-Bedingungen etwa 3,5 mM (Stone & Dratz, 1977). Nur ein geringer Teil des gesamten Rhodopsins der Zelle wird bei Belichtung lokal begrenzt gebleicht. Die Belichtung ist Voraussetzung für die Phosphorylierung. Eine Gleichverteilung, wie sie unter in-vitro-Bedingungen für das phosphorylierte Rhodopsin vorliegt, ist unter in-vivo-Bedingungen nicht gegeben.

Es ist wahrscheinlich, daß auch die Phosphatase und ATP nicht gleichmäßig in der Zelle verteilt vorliegen. Vielmehr kann man davon ausgehen, daß lokal begrenzt unterschiedliche Konzentrationen auftreten. Die Phosphatase sollte in der Nähe ihres physiologisch wirksamen Ortes, in der Nähe der Diskmembranen bzw. des Rhodopsins konzentriert sein. Das heißt, daß das molare Verhältnis von Phosphatase zu ATP bei der Dephosphorylierung unter in-vivo-Bedingungen weitaus günstiger sein kann als unter in-vitro-Bedingungen. Die wirklichen molaren Verhältnisse von phosphoryliertem Rhodopsin zur Phosphatase und zu ATP in der Zelle sind nicht bekannt. Deshalb stellt die unter in-vitro-Bedingungen gefundene ATP-Inhibierung der Phosphatase nicht unbedingt einen Widerspruch zu den Verhältnissen unter physiologischen Bedingungen dar.

4.1.5 Reinigungsversuche

Die in der Arbeit beschriebenen Proteinreinigungsverfahren sind zur Reinigung der Phosphatase aus Retinen-Extrakt geeignet. Es erfolgt jeweils eine Abtrennung von "Nicht-Phosphatase-Protein". Bei der Affinitätschromatographie (3.5.4.2) wird, abgesehen von der "Durchlaufaktivität" die Phosphatase in einem "Proteinpeak" eluiert, der nur etwa 10 % des angegebenen Gesamtproteins ausmacht.

Bei allen Reinigungsverfahren traten jedoch zum Teil erhebliche Phosphataseaktivitätsverluste auf. Diese Aktivitätsverluste sind entweder methodisch bedingt oder spiegeln die Instabilität der Phosphatase unter in-vitro-Bedingungen wieder: Methodisch bedingt erfolgt die Phosphataseelution entweder bei hoher Ionenstärke (siehe 3.5.2.2 und 3.5.4.2) oder aber durch erhöhte NaPP-Konzentration (siehe 3.5.3.2). Diese Faktoren wirken sich in den Dephosphorylierungsversuchen hemmend auf die Phosphataseaktivität aus (siehe 3.5.2.1 und 3.5.3.1). Eine Pufferumstellung durch Ultrafiltration bzw. Gelfiltration hat ebenfalls einen Phosphataseaktivitätsverlust zur Folge. Dieser Aktivitätsverlust beruht auf der Instabilität der Phosphatase unter in-vitro-Bedingungen.

Wie gezeigt verliert die Phosphatase unter in-vitro-Bedingungen temperaturabhängig Aktivität. Durch DTT wird die Phosphataseaktivität zwar stabilisiert, aber diese Stabilisierung ist nicht vollständig (siehe 3.2.3.3).

Aufgrund der geringen Dimensionierung der verwendeten Säulen (siehe Material und Methoden) waren nur geringe Flußraten möglich, was hohe Elutionszeiten zur Folge hatte. Bei den verschiedenen Reinigungsverfahren war die Phosphatase vor der Elution zum Teil für einige Stunden an die Säulenmatrix gebunden.

Die lange Verweildauer der Phosphatase auf der Säule ist als eine Ursache für die erniedrigte Phosphataseaktivität anzusehen. Eine weitere Ursache liegt sicher darin, daß von vornherein eine quantitative Elution der Phosphatase von den verschiedenen Säulen nicht zu erwarten ist. Bei allen Reinigungsmethoden treten erfahrungsgemäß Proteinverluste durch irreversible Wechselwirkungen mit der Matrix oder Proteolyse auf (persönliche Mitteilung H. Kühn). Teilweise sind Enzyme in verdünnten Proteinlösungen, wie sie bei säulenchromatographischen Reinigungsverfahren anfallen, instabil, so daß auch dadurch bedingt Aktivitätsverluste auftreten können (pers. Mitteilung H. Kühn).

Die Aktivitätsverluste führten dazu, daß in den eluierten Phosphatasefraktionen keine erhöhte spezifische Aktivität im Vergleich zum ungereinigten Retinen-Extrakt gefunden wurde. Diese Ergebnisse schließen jedoch eine Reinigung der Phosphatase durch Kombination der verschiedenen Reinigungsverfahren nicht grundsätzlich aus.

Voraussetzung für die Reinigung des Enzyms ist der Nachweis von Enzymaktivität in

den verschiedenen Fraktionen der unterschiedlichen Reinigungsmethoden. Für die Reinigung der Phosphatase müßten sicher größere Ausgangsmengen eingesetzt werden: Der Aktivitätsverlust während der Reinigung sollte durch größere Ausgangsmengen zumindest teilweise zu kompensieren und demnach die Reinigung in den verschiedenen Teilschritten zu verfolgen sein.

Ausblick:

Eine Reinigung der Phosphatase aus Retinen-Extrakt sollte auf der Grundlage der von mir erarbeiteten Versuchsbedingungen möglich sein. Aus den Versuchsergebnissen ergibt sich eine sinnvolle Reihenfolge der verschiedenen Proteintrennmethoden:

1) Affinitäts-Chromatographie; 2) Gelfiltration; 3) Anionen-Austausch-Chromatographie oder Adsorptions-Chromatographie 4) Gelfiltration.

Bei der Affinitäts-Chromatographie (1) sollte unter den von mir erarbeiteten Versuchsbedingungen eine Abtrennung von 80 - 90 % des Gesamtproteins erfolgen.

Bei der nachfolgenden (2) Gelfiltration (Aca 44) werden Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht abgetrennt und es erfolgt gleichzeitig die Pufferumstellung (Entsalzung), welche Voraussetzung für die anschließende (3) Anionenaustausch- bzw. Adsorptions-Chromatographie ist.

Welche der beiden letztgenannten Trennmethoden in der Kombination mit den anderen Methoden die effektivere ist, ist experimentell noch zu ermitteln.

Die im Anschluß notwendige Pufferumstellung sollte wieder über eine Gelfiltration erfolgen. Die Verwendung einer Matrix mit einem optimalen Trennbereich von etwa 100 - 200 kDa sollte eine weitere Phosphatasereinigung bewirken.

Die Phosphatasereinigung sollte zur Stabilisierung der Aktivität in Anwesenheit von DTT erfolgen und möglicherweise ist die Stabilität der Phosphatase in den verdünnten Proteinlösungen durch Zugabe von Rinderserum-Albumin oder ähnlichen Proteinen weiter zu erhöhen.

Die Steigerung der Phosphataseaktivität durch Detergenz ist ein geeignetes Mittel, um unter in-vitro-Bedingungen Enzymaktivität auch bei geringer Phosphatasekonzentration messen zu können. Die Detergenzaktivierung beinhaltet aber auch, daß die unter physiologischen Bedingungen aktivierenden Faktoren bisher noch nicht gefunden wurden. Die verschiedenen möglichen aktivitätsbeeinflussenden Faktoren sind bei einer gereinigten Phosphatase sicher weitaus besser zu kontrollieren, als bei einem Extrakt, der das gesamte Muster der löslichen Proteine, Ionen, Nukleotide etc. der Retina enthält.

Die Reinigung ist ebenso Voraussetzung dafür, die Frage zu klären, ob bei der Verwendung von Retinen-Extrakt möglicherweise verschiedene Phosphatasen an der Dephosphorylierung des Rhodopsins bzw. Opsins beteiligt sind.

Es stellte sich die Frage, ob die Retinen-Extrakt-Phosphatase(n) die unter physiologischen Bedingungen relevante(n) Phosphatase(n) zur Dephosphorylierung des Rhodopsins bzw. Opsins ist (sind). Hierzu ist die Reinigung und Charakterisierung der Phosphatase(n) aus beiden Extrakten notwendig.

Durch Bestimmung der isoelektrischen Punkte der verschiedenen phosphatase-aktiven Protein-Banden ergibt sich eine weitere Möglichkeit der Beantwortung dieser Fragestellung:

Nach Elution dieser phosphataseaktiven Banden aus dem Fokussier-Gel ist eine SDS-Denaturierung und anschließende Gel-Elektrophorese möglich, die eine Charakterisierung in Bezug auf das Molekulargewicht erlaubt. Diese Methode erscheint mir geeignet, erste Hinweise darauf zu bekommen, ob die Phosphatase(n) aus Retinen-Extrakt identisch ist (sind) mit der (den) Phosphatase(n) aus ROS-Extrakt und ob möglicherweise Übereinstimmungen mit Phosphatasen aus anderen Geweben und biochemischen Prozessen bestehen.

Die ersten Ergebnisse zeigen ebenso, daß eine isoelektrische Fokussierung im präparativen Maßstab möglicherweise eine Alternative zu dem oben beschriebenen Weg der Phosphatase-Reinigung über verschiedene Gel-Chromatographien darstellt.

Eine Reinigung der Phosphatase aus Retinen-Extrakt bietet weiterhin die Möglichkeit zur Antikörperproduktion gegen diese Phosphatase(n) und ermöglicht somit gegebenenfalls die Identifizierung der Phosphatase(n) aus ROS-Extrakt, die durch Enzym-Aktivitätsfärbung bisher nicht nachzuweisen ist (sind).

Nach Reinigung und Charakterisierung der Phosphatase(n) ist eine Überprüfung der von Yang et al. (1988) postulierten Rhodopsin-Phosphatase vom Typ der latenten Phosphatase 2 abschließend möglich.

Zusammenfassung:

Die lichtaktivierte Phosphorylierung des Rhodopsins ist sowohl unter in-vivo- als auch unter in-vitro-Bedingungen seit langem bekannt.

Über die Dephosphorylierung hingegen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Eine vollständige Dephosphorylierung hoch phosphorylierten Rinderrhodopsins ist bisher nicht beschrieben.

In dieser Arbeit werden optimierte Bedingungen zur Dephosphorylierung von hoch phosphoryliertem Rhodopsin (PG 5 - 6 Mol Pi/Mol Rhodopsin) mit verschiedenen ROS-Extrakten bzw. "ganzen ROS" oder Retinen-Extrakt beschrieben.

Weiterhin werden die Ergebnisse erster Phosphatase-Reinigungsversuche aus Retinen-Extrakt dargelegt.

- 1) Ich konnte Phosphatase-Aktivität sowohl in den verschiedenen Extrakten als auch in "ganzen ROS" nachweisen. Aus ROS wird (werden) die Phosphatase(n) isotonisch extrahiert. Hypotonische Gesamt-Extrakte weisen im Vergleich zu den isotonischen Extrakten eine geringfügig erhöhte Phosphatase-Aktivität auf. Eine Restaktivität von nur etwa 20 % im Vergleich zu den Extrakten ist in den verbleibend Pellets nachweisbar. Die Phosphatase(n) liegt (liegen) somit mit aller Wahrscheinlichkeit als lösliches Protein im Stäbchenaußensegment vor. Die Phosphataseaktivität von hypotonischem Retinen-Extrakt ist jedoch etwa 60 mal höher als die von ROS-Extrakt. Die Existenz mehrerer verschiedener Phosphatasen in den unterschiedlichen Extrakten wird als eine mögliche Ursache hierfür diskutiert.

Eine quantitative Dephosphorylierung mit ROS- bzw. Retinen-Extrakt wird in Anwesenheit eines nicht-ionischen Detergenz (Octylglucosid) erreicht. In Abwesenheit von Detergenz hingegen wird phosphoryliertes Rhodopsin lediglich bis zu etwa 30 bis 40 % dephosphoryliert.

Die gesteigerte Phosphatase-Aktivität der verschiedenen Extrakte in Anwesenheit von Detergenz wird diskutiert als ein möglicher Einfluß auf das Substrat oder aber auf die Phosphatase selbst. Die Versuchsergebnisse machen einen Einfluß des Detergenz auf die Phosphatase und nicht auf das Substrat wahrscheinlich.

Das pH-Optimum der Phosphatase-Aktivität liegt bei einem pH-Wert von 5,7; die Phosphatase (n) ist (sind) somit den "sauren Phosphatasen" zuzuordnen.

In den Extraktpräparationen treten temperaturabhängig erhebliche Phosphatase-Aktivitätsverluste (90 % innerhalb einer Stunde bei 30 °C) auf. Die Aktivitätsverluste sind erheblich verringert in Anwesenheit von DTT.

Die Phosphatase-Aktivität der Extrakte wird auch in Anwesenheit von Detergenz durch verschiedene Faktoren inhibiert. Eine Ionenstärke von etwa 250 mM NaCl führt zu einer halbmaximalen Inhibierung der Phosphatase-

Aktivität. Natriumphosphat inhibiert halbmaximal bei einer Konzentration von etwa 10 mM, ATP inhibiert die Phosphataseaktivität in einer Konzentration von 5 mM bereits zu etwa 90 %. Mit "ganzen ROS" als Phosphatasequelle wird im Gegensatz zu den Extrakten in Anwesenheit von Detergenz keine quantitative Dephosphorylierung erreicht. Offensichtlich werden mit "ganzen ROS" bisher unbekannte Faktoren in die Versuche eingebracht, die sich hemmend auf die Aktivität auswirken, da mit steigender ROS-Konzentration die Phosphatase-Aktivität abnimmt.

Unphosphoryliertes Rhodopsin und aus ROS extrahierte Lipide sind als inhibierenden Faktoren auszuschließen.

- 2) Die Dephosphorylierung des Rhodopsins ist unabhängig vom Phosphorylierungsgrad. Eine quantitative Dephosphorylierung erfolgt nur in Anwesenheit von Detergenz.
- 3) Phosphoryliertes, mit 11 cis-Retinal regeneriertes, Rhodopsin wird sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Detergenz gleichermaßen dephosphoryliert wie phosphoryliertes Opsin oder phosphorylierte "Zwischenstufen" wie Meta II oder Meta III. Diese Ergebnisse lassen, übertragen auf in-vivo-Bedingungen, jede "Form" des Rhodopsins als mögliches Substrat für die Phosphatase(n) zu. Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Funktion der Phosphatase(n) diskutiert als ein Mechanismus zu "Feinregulierung" der Rezeptorantwort; ein Mechanismus, der möglicherweise direkt antagonistisch zur Kinase und damit auf die Transducin- bzw. Arrestinbindung wirkt. Somit stellt die Dephosphorylierung des lichtaktivierten Rhodopsins möglicherweise nicht nur einen Prozess zur Rückführung des Rezeptors in den perzeptionssensiblen Zustand dar, sondern ist darüberhinaus beteiligt an der Modulation der Zellantwort.
- 4) Eine saure Phosphatase aus der Kartoffel dephosphoryliert Opsin bis zu etwa 50 %. Eine basische Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert Opsin bis zu etwa 40 %, wobei hier im Vergleich zur sauren Phosphatase aus Kartoffel (0,1 U) eine etwa 100-fach höhere Enzymaktivität eingesetzt werden muß. Diese unspezifische Dephosphorylierung ist nicht durch Detergenz aktivierbar.
- 5) Methoden zur Aktivierung latenter Phosphatasen, wie z.B. eine Mercaptoethanol- oder Ethanol-Fällung haben keinen aktivierenden Einfluß auf die Phosphatase-Aktivität von ROS- bzw. Retinen-Extrakt. Im Gegenteil wird die Phosphatase-Aktivität durch eine derartige Behandlungen stark

verringert. Nach der Behandlung ist (sind) die Phosphatase(n) nicht mehr detergenten-aktivierbar.

Diese Versuchsergebnisse bestätigen nicht die Ergebnisse von Yang et al. 1988, aufgrund derer die Existenz einer "rezeptorspezifischen Phosphatase" vom Typ der "latenten Phosphatase 2" postuliert wird.

- 6) Erste Vorversuche zur isoelektrischen Fokussierung von Retinen-Extrakt mit anschließender Enzym-Aktivitätsfärbung im Gel zeigen mehrere phosphatase-aktive Banden. Diese "Heterogenität" ist jedoch nicht zwangsläufig Ausdruck für die Existenz mehrerer verschiedener Phosphatasen im Retinen-Extrakt. Ein Vergleich mit einer gereinigten Phosphatase aus Kartoffel zeigt, daß auch diese mehrere verschiedene phosphatase-aktiven Banden mit ähnlichem Muster aufweist. Die isoelektrischen Punkte der verschiedenen Banden aus Retinen-Extrakt bzw. aus der Kartoffel liegen in einem pH-Bereich zwischen 7,0 und 4,9.

- 7) Unterschiedliche Proteinreinigungsmethoden wurden auf ihre Tauglichkeit zur Reinigung der Phosphatase(n) aus Retinen-Extrakt getestet und die jeweiligen Versuchsbedingungen optimiert.

- Bei der Gel-Filtration (Aca 44) eluiert die Phosphatase(n) aus Retinen-Extrakt bei einem Molekulargewicht im Bereich von 100 kDa.
- Die Phosphatase(n) bindet(n) an einen Anionen-Austauscher (Q-Sepharose Fast-Flow) und ist (sind) bei einer Salzkonzentration von etwa 400 mM NaCl eluierbar.
- Bei der Adsorptions-Chromatographie erfolgt eine Phosphatase-Bindung an die Matrix (Hydroxylapatit). Die Elution der Phosphataseaktivität erfolgt bei einer Natriumphosphat-Konzentration von etwa 50 - 100 mM.
- Ebenso bindet(n) die Phosphatase(n) bei der Affinitäts-Chromatographie (Affi-Gel-Blue) an die Matrix. Die Phosphatase-Aktivität wird bei einer Ionenstärke von etwa 500 mM NaCl eluiert. Hierbei wird etwa eine Abtrennung von etwa 90 % (w/v) "Nicht-Phosphatase-Protein" erreicht.

Bei den verschiedenen Reinigungsmethoden treten zum Teil erhebliche Phosphatase-Aktivitätsverluste auf, sodaß bisher die Reinigung aktiver homogener Phosphatase(n) nicht möglich war.

Zur Reinigung der Phosphatase(n) sollten als Ausgangsbasis größere Extraktmengen eingesetzt werden

Aufgrund der Aktivitätsverluste konnte ich bisher keine weitere Aufreinigung der Phosphatase(n) durch die Kombination verschiedener Reinigungsmethoden erreichen.

Auf der Grundlage der für die verschiedenen Reinigungsmethoden erarbeiteten Versuchsbedingungen wird eine zur Reinigung der Phosphatase(n) sinnvolle Kombination der verschiedenen Methoden vorgeschlagen.

Literaturverzeichnis

- Antoniw, J.F., Nimmo, H.G., Yeaman, S.J., Cohen, P. (1977) Comparison of the substrate specificities of protein phosphatases involved in the regulation of glycogen metabolism in rabbit skeletal muscle.
 Biochem. J. 162, 423-433
- 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
- Bennett, N., Sitaramayya, A. (1988)
 Inactivation of photoexcited rhodopsin in retinal rods: The roles of rhodopsin kinase and 48-kDa Protein (Arrestin)
 Biochemistry, 27, 1710-1710
- Benovic, J.L., Pike, L.J., Cerione, R.A., Stanszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1985)
 Phosphorylation of the mammalian-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase.
 J. Biol. Chem. 260, 7094-7101
- Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986a)
 β -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2797-2801
- Benovic, J.L., Mayor, F. Jr., Somers, R.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986b)
 Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by β -adrenergic receptor kinase.
 Nature 322, 869-872
- Benovic, J.L., Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987)
 Functional desensitization of the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48 K-protein).
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8879-8882
- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L.M.F., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987)
 Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylations II: effects of agonist occupancy on phosphorylation of α - and β -adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase.
 J. Biol. Chem. 262, 3106-3113
- Bownds, D., Dawes, J., Miller, J., Stahlman, M. (1972)
 Phosphorylation of frog photoreceptor membranes induced by light.
 Nature, Lond., 237, 125-127
- 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
- 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

- Chou, C.-K., Alfano, J., Rosen, O.M. (1977)
Purification of phosphoprotein phosphatase from bovine cardiac muscle that catalyses dephosphorylation of cyclic AMP-binding protein kinase.
J. Biol. Chem. 252, 2855-2859
- Cohen, P. (1976)
The regulation of protein function by multisite phosphorylation.
TIBS, 2, 38-40
- Cohen, P. (1982)
The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity.
Nature, 296, 613-620
- Daemen, F.J.M. (1973)
Vertebrate rod outer segment membranes.
Biochim. Biophys. Acta, 300, 255-288
- 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
- Deterre, P., Pfister, C., Bigay, J., Chabre, M. (1987)
The retinal phototransduction process.
Biochimie, 69, 365-370
- 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 85, 2424-2428
- 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
- Frank, R.N., Buzney, S.M. (1975)
Mechanism and specificity of rhodopsin phosphorylation.
Biochem. 14, 5110-5117
- 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
- Godchaux, W., Zimmermann, W.F. (1979)
Membrane-dependent guanine nucleotide binding and GTPase activities of soluble proteins from bovine rod cell outer segments.
J. Biol. Chem. 254, 7874-7884
- Hargrave, P.A., Fong, S.L., McDowell, J.H., Mas, M.T., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Smith, D.P. (1980)
The partial primary structure of bovine rhodopsin and its topography in the retinal rod cell disc membrane.
Neurochem. Int. 1, 231-244
- Harris, H., Hopkins, D.A. (1976)
In: *Handbook of Enzyme Elektrophoresis in Human Genetics*. North Holland/Elsevier, Amsterdam

- Hofmann, K.P. (1986)
Photoproducts of rhodopsin in the disc membrane.
Photobiochem. Photobiophys. 13, 309-327
- Ingebritsen, T.S., Foulkes, J.G., Cohen, P. (1980)
The broad specificity protein phosphatase from mammalian liver.
FEBS Lett. 119 (1), 9-15
- Ingebritsen, T.S., Cohen, P. (1983)
Protein phosphatase and role in cellular regulation.
Science, 221, 331-338
- Kato, K., Kobayashi, M., Sato, S. (1974)
Multiple molecular forms of phosphoprotein phosphatase II. Dissociation and activation of phosphorylase phosphatase from rabbit skeletal muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 371, 89-101
- Killilea, S.D., Brandt, H., Lee, Y.C. (1976)
Modulation of protein function by phosphorylation: the role of protein phosphatase(s).
TIBS, 2, 30-32
- 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
- Krebs, E.G., Beavo, J.A. (1979)
Phosphorylation - dephosphorylation of enzymes.
Ann. Rev. Biochem. 48, 923-959
- Kühn, H., Dreyer, W.J. (1972)
Light dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP
FEBS Lett. 20 (1), 1-6
- Kühn, H., Cook, J.H., Dreyer, W.J. (1973)
Phosphorylation of rhodopsin in bovine photoreceptor membranes. A dark reaction after illumination.
Biochem. 12 (13), 2495-2502
- Kühn, H. (1974)
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin in living frogs.
Nature, 250, 588-590
- Kühn, H., Bader, S. (1976)
The rate of rhodopsin phosphorylation in isolated retinas of frog and cattle.
Biochim. Biophys. Acta, 428, 13-18
- Kühn, H., McDowell, J.H., Leser, K.H., Bader, S. (1977)
Phosphorylation of rhodopsin as a possible mechanism of adaptation.
Biophys. Struct. Mech. 3, 175-180
- Kühn, H. (1978)
Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes.
Biochem. 17, 4389-4395

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

Kühn, H. (1981)
Interactions of rod cell proteins with the disk-membran: Influence of light, ionic strength, and nucleotides.
In: *Current Topics of Membranes and Transport*, (W.H. Miller, ed.), 15, 171-201

Kühn, H., Bennett, M., 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

Kühn, H. (1984)
Light dependent interactions between photoexcited rhodopsin and photoreceptor enzymes.
Habilitationsschrift (RWTH Aachen)

Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.
Nature, 227, 680-685

Lefkowitz, R.J., Benovic, J.L., Kobilka, B., Caron, M.G. (1986)
 β -adrenergic receptors and rhodopsin: shedding new light on an old subject
Trends in Pharmacol. Sci. 11, 444-448

McDowell, J.H., Kühn, H. (1977)
Light-induced phosphorylation of rhodopsin in cattle photoreceptor membranes: Substrat activation and inactivation.
Biochem. 16 (18), 4054-4060

McDowell, J.H., Curtis, D.R., Bakar, U.A., Hargrave, P.A. (1984)
Phosphorylation of rhodopsin: Localization of phosphorylated residues in the Helix V - Helix VI connecting loop.
AVRO-Meeting, Abstract

Miller, J.A., Paulsen, R. (1975)
Phosphorylation and dephosphorylation of frog outer segment membranes as part of the visual process.
J. Biol. Chem. 250, 4427-4432

Miller, J.A., Paulsen, R., Bownds, M.D. (1977)
Control of light-activated phosphorylation in frog photoreceptor membranes.
Biochem. 16, 2633-2639

Morton, R.K. (1965)
Phosphatases
In: *Comprehensive Biochemistry*, (Florkin, M., Stotz, E.H., eds.) 16, 55-83, Elsevier Publ. Comp. Amsterdam

Nestler, E.J., Greengard, P. (1984)
Protein phosphorylation in the nervous system.
J. Wiley & Sons Inc., New York

- Pfister, C., Kühn, H., Chabre, M. (1983)
Interaction between photoexcited rhodopsin and peripheral enzymes in frog retinal rods.
Eur. J. Biochem. 136, 252-255
- Robinson, W.E., Yoshikami, S., Hagins, W.A. (1975)
ATP in retinal rods.
Biophys. J. 15, 168a
- Rosevaer, P., Van Aken, T., Baxter, J., Ferguson-Miller, R. (1980)
Alkyl glucoside detergents: A simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome C oxidase.
Biochem. 19, 4108-4115
- Resink, T.J., Hemmings, A., Tung, H.Y.L., Cohen, P. (1983)
Characterization of a reconstituted Mg-ATP-dependent protein phosphatase.
Eur. J. Biochem. 133, 455-461
- Sibley, D.R., Lefkowitz, R.J. (1985)
Molecular mechanisms of receptor desensitization using the adrenergic receptor-coupled adenylat cyclase system as a modell.
Nature, 317, 124-129
- Sibley, D.R., Strasser, R.H., Benovic, J.L., Daniel, K., Lefkowitz, R.J. (1986)
Phosphorylation/dephosphorylation of the β -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylat-cyclase and subcellular distribution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9408-9412
- Sibley, D.R., Benovic, J.L., Caron, M.C., Lefkowitz, R.J. (1987)
Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation.
Cell, 48, 913-922
- Stieve, H. (ed.) (1986)
The Molecular Mechanism of Photoreception. Dahlem Workshop LS Report 34, Springer-Verlag, Berlin
- Stone, W.L., Dratz, E.A. (1977)
Visual photoreceptors.
Photochem. Photobiol. 26, 79-85
- Stryer, L. (1987)
The molecules of visual excitation.
Sci. Amer. 257 (1), 32-40
- Tamura, S., Tsuiki, S. (1980)
Purification and subunit structure of rat-liver phosphoprotein phosphatase, whose molecular weight is 260.000 by gel filtration (Phosphatase IB).
Eur. J. Biochem. 111, 217-224
- Tusboi, K.K., Hudson, P.B. (1955)
Acid phosphatase III. Specific kinetic properties of highly purified humans prostatic phosphomonoesterase.
Arch. Biochem. Biophys. 55, 191-205
- Usui, H., Kinohara, N., Yoshikawa, K., Imazu, M., Imaoka, T., Takeda, M. (1983)
Phosphoprotein phosphatases in human erythrocyte cytosol.
J. Biol. Chem. 258 (17), 10455-10463

- Walaas, S.I., Greengard, P. (1986)
Intracellular second messengers and their interactions: Phosphoproteins.
Discussions in Neurosciences: Transduction of Neuronal Signals
FESN III (3), 120-124
- Wang, J.K., Juszczak, E., Smith, D.P. (1980)
The partial primary structure of bovine rhodopsin and its topography in the retinal rod cell disc membrane.
Neurochem. 1, 231-244
- Wehner, M. (1986)
Lichtabhängiger Nukleotidaustausch an der Photorezeptormembran und seine Katalyse durch Rhodopsin.
Dissertation, RWTH Aachen
- Weller, M., Virmaux, N., Mandel, P. (1975)
Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina: The presence of a protein kinase that is specific for photobleached rhodopsin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 381-385
- Webb, J.L. (1963)
Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol. I, General Principles of Inhibition. Acad. Press, New York, London
- Wilden, U. (1981)
Experimente zur lichtabhängigen Rhodopsin-Phosphorylierung an Stäbchenaußensegment-Suspensionen.
Dissertation, RWTH Aachen
- Wilden, U., Kühn, H. (1982)
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: Number of phosphorylation.
Biochem. 21, 3014-3022
- 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
- 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
- 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
- Yang, S.-D., Vandenheede, J.R., Merlevede, W. (1981)
Identification of inhibitor-2 as the ATP-Mg-dependent protein phosphatase.
J. Biol. Chem. 256 (20), 10231-10234
- Yang, S.-D., Tallant, E.A., Cheung, W.Y. (1982)
Clacineurin is a calmodulin-dependent protein phosphatase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 1419-1452
- Yang, S.-D., Vandenheede, J.J., Merlevede, W. (1984)
Purification of a latent protein phosphatase from rabbit skeletal muscle.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 923-928

- Yang, S.-D., Fong, Y.-L. (1985)
Identification and characterization of an ATP-Mg-dependent protein phosphatase from pig brain.
J. Biol. Chem. 260, 13464-13470
- Yang, S.-D., Yu, J.S., Fong, Y.-L. (1986)
Purification and characterization of two inactive/latent protein phosphatase from pig brain.
J. Biol. Chem. 261, 5590-5596
- Yang, S.-D., Fong, Y.-L., Benovic, J.L., Sibley, D.R., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1988)
Dephosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor and rhodopsin by latent phosphatase 2.
J. Biol. Chem. 263 (18), 8856-8858
- 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
- Zuckerman, R., Cheasty, J.E. (1986)
A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes.
FEBS Lett. 207, 35-41

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

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Kühn danke ich für die Überlassung des Themas, für seine großzügige Förderung und sein stetes Interesse, mit dem er die Arbeit begleitete.

Dr. Hermann Kühn verunglückte tödlich am 29. 3. 1988.

Für die Übernahme des Referates und seine spontane Hilfsbereitschaft danke ich Herrn Prof. Dr. H. Stieve. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zahn für die Übernahme des Korreferates.

Für ihre Unterstützung danke ich allen Mitgliedern des Institutes. Insbesondere gilt mein Dank und meine Anerkennung Frau Dr. A. Schimz und Herrn Dr. I. Weyand für ihre konstruktive Diskussion und die Korrektur des Manuskriptes. Desgleichen danke ich Frau Dr. U. Wilden für ihre Förderung und die Überlassung von lipid-freiem Rhodopsin und ROS-Lipid-Präparationen. Frau T. Derichs danke ich für ihre Hilfe im Labor. Für ihre Hilfe bei der Bewältigung der technischen Probleme danke ich Herrn A. Becker, Herrn R. Esser, Herrn H. Erkens, Herrn E. Giesen und Herrn D. Grammig.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Anita Eckert für ihre Mühe bei der Erstellung der vorliegenden Fassung.

Danke Hanne.