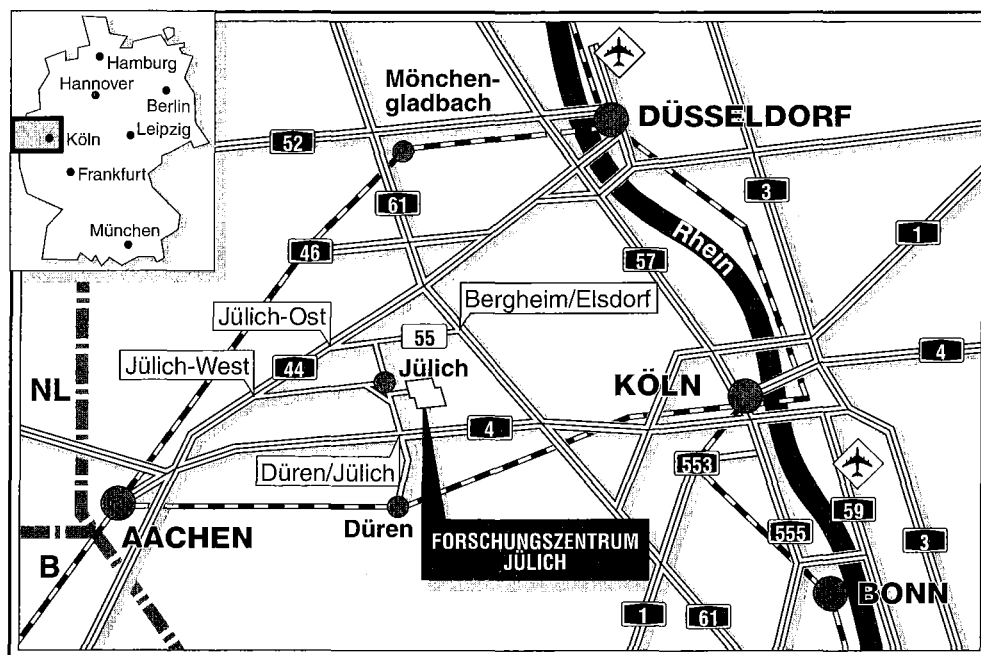


Institut für Biologische Informationsverarbeitung

**Funktionelle Charakterisierung
eines Guanylatzyklase-aktivierenden
Proteins aus Photorezeptorzellen
von Wirbeltieren**

Sandra Frins



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3269

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3269

D38 (Diss. Universität Köln)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon : 02461/61-61 02 · Telefax : 02461/61-61 03 · Telex : 833 556-70 kfa d

Funktionelle Charakterisierung eines Guanylatzyklase-aktivierenden Proteins aus Photorezeptorzellen von Wirbeltieren

Sandra Frins

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

V

1.0 Einleitung

1

1.1	Die Verarbeitung von Lichtimpulsen in der Netzhaut	1
1.2	Der Aufbau der Photorezeptoren	2
1.3	Die Ionentransportprozesse im Photorezeptor	3
1.4	Die cGMP-Kaskade	4
1.5	Die Wiederherstellung des Dunkelzustandes	5
1.6	Die Abschaltung der Kaskade	5
1.7	Die Licht-Adaptation	5
1.8	Die Synthese von cGMP durch eine retinale, membranständige Guanylatzyklase	6
1.9	Die Regulation der retGC durch die freie Calcium-Konzentration	7
1.10	GCAP1, ein Guanylatzyklase-aktivierendes Calciumbindungsprotein	8
1.11	Aktivierung der retGC durch einen nicht-GCAP-verwandten Faktor	8
1.12	Zielsetzung der Arbeit	9

2.0 Material & Methoden

10

2.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	10
2.2	Präparation der Sebstäbchenaußensegmente	10
2.3	Bestimmung der Rhodopsinkonzentration	11
2.4	Reinigung von GCAP1 aus ROS	12
2.4.1	Herstellung eines Lichtextraktes	12
2.4.2	Gelfiltrationschromatographie	12
2.4.3	MonoQ-Anionenaustauschchromatographie	12
2.5	Klonierung von GCAP1	13
2.5.1	Bakterien und Plasmide	13
2.5.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	14
2.5.2.1	Kulturbedingungen der Expressionskulturen	14
2.5.2.2	Infektion der <i>E. coli</i> -Zellen mit λ -Phagen	14
2.5.3	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	15

2.5.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	15
2.5.4.1	Photometrische Bestimmung	15
2.5.4.2	Ethidiumbromid-Fluoreszenz	16
2.5.5	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	16
2.5.5.1	Alkalische Mini-Präparation	16
2.5.5.2	Alkalische Maxi-Präparation	17
2.5.6	Modifikation von Nukleinsäuren	17
2.5.6.1	Glätten überhängender Enden von DNA-Fragmenten	17
2.5.6.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	17
2.5.6.3	Dephosphorylierung geschnittener Vektoren	18
2.5.7	Analyse von DNA	18
2.5.7.1	Restriktion von DNA	18
2.5.7.2	DNA-Sequenzierung	19
2.5.7.3	Gelelektrophorese	19
2.5.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
2.5.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	20
2.5.9.1	Ligation	20
2.5.9.2	Transformation	20
2.5.9.3	Subklonierung von cDNA aus λ -Phagen	21
2.5.10	Polymerase-Ketten-Reaktion	21
2.5.11	Markieren von Nukleinsäuren	22
2.5.12	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren	23
2.5.12.1	Transfer von Nukleinsäuren	23
2.5.12.2	Hybridisierung	23
2.5.12.3	Detektion markierter Nukleinsäuren	24
2.6	Reinigung der rekombinanten GCAP1-Formen	24
2.6.1	Glutathionagarose-Chromatographie	25
2.6.2	Thrombinspaltung	25
2.6.3	MonoQ-Anionenaustauschchromatographie	25
2.7	Antikörper-Produktion	26
2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.9	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
2.9.1	Durchführung der SDS-PAGE	27
2.10	Färbung der Minigele mit Coomassie-Blue	28
2.11	Western-Blotting	29

2.12	Immunodetektion	29
2.13	Amidoschwarzfärbung von Blotmembranen	30
2.14	Immunhistochemie	31
2.15	Messung der retGC-Aktivität	31
2.16	Rekonstitutionsexperimente mit Okadasäure	32
2.17	Calcium-Puffer	32
2.18	Membran-Bindungsstudien	33
2.19	⁴⁵ Calcium-Autoradiographie	33
3.0	Ergebnisse	34
3.1	Identifizierung und Reinigung von GCAP1	34
3.1.1	Herstellung eines Lichtextraktes	34
3.1.2	Gelfiltrationschromatographie	34
3.1.3	MonoQ-Anionenaustauschchromatographie	34
3.2	Calciumbindung von GCAP1	37
3.2.1	Calcium-abhängige Verschiebung im SDS-Gel	37
3.2.2	Nachweis der Calciumbindung mit ⁴⁵ Calcium	37
3.3	Immunologische Untersuchungen zur Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse	37
3.4	Bestimmung der retGC-Aktivität	38
3.4.1	Basalaktivität der gewaschenen Membranen	38
3.4.2	Einstellung der optimalen K ⁺ -Konzentration für die Rekonstitutionsexperimente	38
3.5	Calcium-abhängige Aktivierung der retGC durch GCAP1	38
3.6	ATP-Abhängigkeit der retGC-Aktivierung	39
3.7	Klonierung von GCAP1	42
3.7.1	Partielle Sequenzierung von GCAP1	42
3.7.2	PCR auf Rinderretina-spezifischer cDNA	43
3.7.3	Isolierung von cDNA-Molekülen	44
3.8	Die Primärstruktur von GCAP1	47
3.9	Expression der rekombinanten GCAP1-Formen	47
3.9.1	Herstellung von Expressionsklonen	49
3.9.2	Optimierung der Expressionsbedingungen	49
3.9.3	Affinitätsreinigung über Glutathion-Agarose	49
3.9.4	MonoQ-Anionenaustauschchromatographie	49
3.10	Eigenschaften des rekombinanten GCAP1 im Vergleich zum nativen GCAP1	51

3.10.1	Calcium-abhängige Verschiebung des nativen und des rekombinanten GCAP im SDS-Gel	51
3.10.2	Titration der Calcium-abhängigen Verschiebung im SDS-Gel	52
3.10.3	Calcium-abhängige Aktivierung der retGC durch natives und rekombinantes GCAP1	53
3.10.4	Verhältnis von nativem und rekombinantem GCAP zu Rhodopsin in den Rekonstitutionsexperimenten	55
3.10.5	ATP-Abhängigkeit der Aktivierung der retGC durch natives und rekombinantes GCAP1	56
3.11	Immunreaktivität des Anti-GCAP1-Antikörpers	58
3.12	Immunhistochemie	58
3.13	GCAP1-Konzentration in den ROS-Präparationen	59
3.14	GCAP1-Gehalt des ROS-Gradienten	60
4.0	Diskussion	62
4.1	Die Aktivierung der retGC durch natives GCAP1	62
4.2	Die Rolle von ATP bei der retGC-Aktivierung	64
4.3	Die Calciumbindung von GCAP1	65
4.4	Die Stellung der GCAPs innerhalb der Familie der EF-Hand-Calciumbindungsproteine	67
4.5	Die chemischen und strukturellen Eigenschaften von GCAP1	67
4.6	Funktionelle Expression rekombinanter GCAP1-Formen	68
4.7	Ein Vergleich der Eigenschaften von nativem GCAP1 mit den rekombinanten Formen	69
4.8	Das Vorkommen von GCAP1 in der Retina	70
4.9	Ausblick	71
5.0	Zusammenfassung	73
6.0	Literatur	74
7.0	Anhang	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANP	atrial natriuretic peptide
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Basen
BAPTA	1,2-bis-o-Aminophenoxy-ethane-N,N,N',N',-tetraessigsäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Temperatur in Grad Celsius
cDNA	revers transkribierte 'complementary' Desoxyribonukleinsäure
cGMP	3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxylkette einer Polypeptidkette
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTE	Erythro-1,4-dimercapto-2,3-butandiol
DTT	Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	(Ethyldinitrilo)-tetraessigsäure
EGTA	[Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)]tetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
g	Gramm bzw. Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ m} \cdot \text{sec}^{-1}$)
GC	Guanylatzyklase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
IBI I	Institut für Biologische Informationsverarbeitung I, Forschungszentrum Jülich
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
KAc	Kaliumacetat

kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LEX	Lichtextrakt
LMW	Low molecular weight marker
M	molar
min	Minute(n)
MOPS	4-Morpholin-propansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
N-Terminus	Aminoterminal einer Polypeptidkette
OD	Extinktion bei der im Index in nm angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
Poly-dA	Poly-desoxyadenosinphosphat
ROS	rod outer segment (Sehstäbchenaußensegment)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiaminomethan
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propandiol
Tween	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaureat
U	Enzymeinheit
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht

Innerhalb von Sequenzen werden Nukleotide durch den Anfangsbuchstaben der Base bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin). Aminosäuren werden mit ihren Ein-Buchstabensymbolen abgekürzt (A: Alanin, C: Cystein, D: Asparaginsäure, E: Glutaminsäure, F: Phenylalanin, G: Glycin, H: Histidin, I: Isoleucin, K: Lysin, L: Leucin, M: Methionin, N: Asparagin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, T: Threonin, V: Valin, W: Tryptophan, Y: Tyrosin).

Weiterhin werden die üblichen Abkürzungen des 'Systeme International' und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

1.0 EINLEITUNG

1.1 Die Verarbeitung von Lichtimpulsen in der Netzhaut

Der Sehvorgang ist eine faszinierende und hochkomplexe Sinnesleistung. Die Grundlage für den Sehvorgang besteht in der Fähigkeit, Licht wahrzunehmen. Das Licht fällt durch den Linsenapparat des Auges auf die Netzhaut (= Retina), in der pro Auge 125 Millionen Rezeptoren gebündelt vorliegen. Die Netzhaut setzt sich aus mehreren Zell-Schichten zusammen: Paradoxe Weise liegt die Photorezeptorschicht, in der das durch die Linse fokussierte Licht absorbiert wird, am weitesten von der Außenwelt entfernt. Dabei sind die Photorezeptor-Enden zum Teil im Pigment-epithel begraben. Die Photorezeptoren wandeln die einfallenden Lichtimpulse in elektrische Signale um, die über Interneuronen (Horizontal-, Bipolar- und Amakrin-Zellen) zu den retinalen Ganglienzellen verschaltet werden. Von diesen Zellen aus werden die Signale über den Nervus opticus zum Gehirn weitergeleitet.

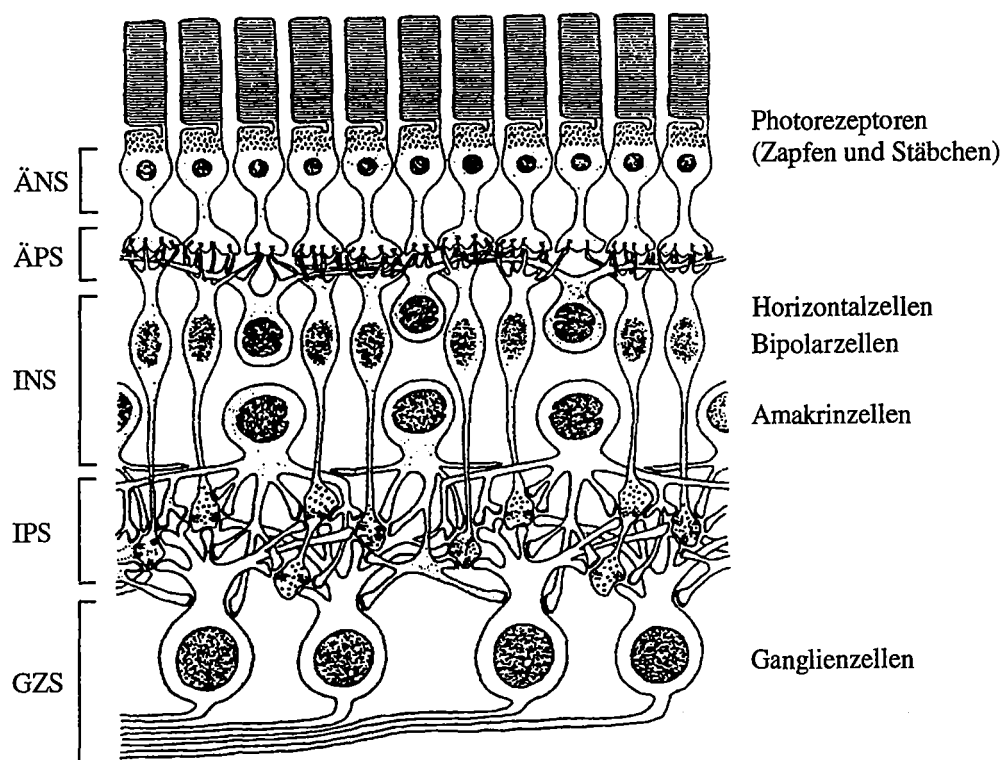


Abb. 1.1: Der Aufbau der Retina nach Peichl (1990)

ÄNS = äußere nukleäre Schicht, ÄPS = äußere plexiforme Schicht, INS = innere nukleäre Schicht, IPS = innere plexiforme Schicht, GZS = Ganglienzellschicht

1.2 Der Aufbau der Photorezeptoren

Bei den Photorezeptoren werden Stäbchen und Zapfen unterschieden: Die Zapfen dienen dem Farbsehen, benötigen relativ starke Lichtintensitäten, reagieren aber schneller als die Stäbchen (Baylor & Hodgkin, 1973). Die Farbwahrnehmung entsteht durch die unterschiedliche spektrale Empfindlichkeit dreier verschiedener Zapfentypen. Die Stäbchen hingegen ermöglichen das Schwarz-Weiß-Sehen bei geringen Lichtintensitäten und geben sogar auf ein einzelnes Photon hin eine meßbare elektrische Antwort (Baylor et al., 1979; Nunn & Baylor, 1982).

Der physiologische Unterschied zwischen Stäbchen und Zapfen ergibt sich vermutlich durch die unterschiedliche Morphologie, durch unterschiedliche Kinetiken in den Enzymreaktionen und durch eine unterschiedliche Regulation des Calcium-Fließgleichgewichtes, das für die Phototransduktion essentiell ist. Die Prinzipien, nach denen die beiden Zelltypen arbeiten, sind höchstwahrscheinlich identisch, die meisten Untersuchungen über die Phototransduktion sind allerdings an Stäbchen durchgeführt worden.

Eine Stäbchenzelle besteht aus einem äußeren, zylindrischen Segment, einem innerem Segment mit vielen Mitochondrien und einer Kernregion, sowie einer synaptischen Region, durch die die Photorezeptoren mit den Horizontal- und Bipolarzellen verschaltet sind. Das äußere und das innere Segment sind über ein rudimentäres Cilium miteinander verbunden. Im inneren Segment findet ein hoher Energiestoffwechsel sowie die Proteinbiosynthese statt. Das äußere Segment enthält den photorezeptiven Apparat mit ca. 1000 Membranscheibchen, in denen das Photopigment Rhodopsin in einer Dichte von $27000 \text{ Molekülen} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ lokalisiert ist (Stryer, 1986). In diesem Teil des Photorezeptors wird ein einfallender Lichtimpuls über eine biochemische Transduktionskaskade in ein elektrisches Signal übersetzt. Diese Kaskade wird nach ihrem sekundären Botenstoff als cGMP-Kaskade bezeichnet.

1.3 Die Ionentransportprozesse im Photorezeptor

Im Dunkeln sind die Photorezeptorzellen leicht depolarisiert, wodurch spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle in der Region um die Synapse offen gehalten werden. Durch den Calcium-Einstrom werden Neurotransmitter freigesetzt, die postsynaptische Neurone hemmen. Die spannungsgesteuerten Calcium-Kanäle schließen bei Hyperpolarisation des Photorezeptors, wodurch die Calcium-Konzentration absinkt, die Neurotransmitter-Freisetzung gehemmt wird und somit die postsynaptischen Neurone erregt werden.

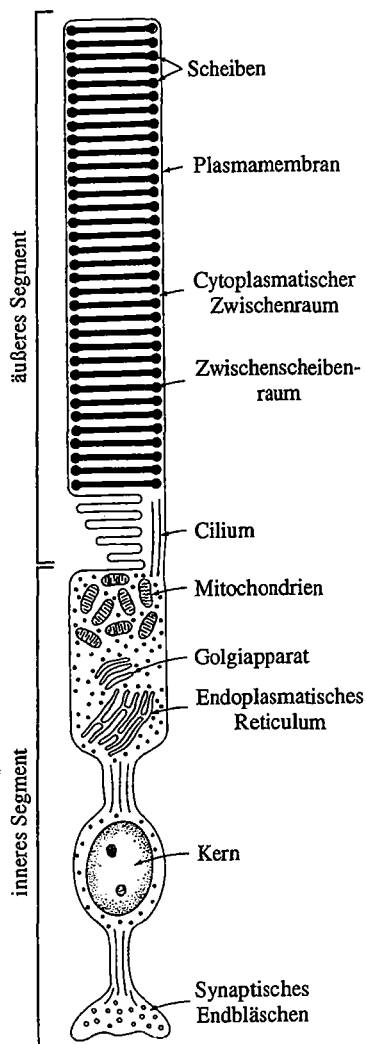


Abb. 1.2: Der Aufbau einer Sehtäbchenzelle

Quelle : Stryer (1990)

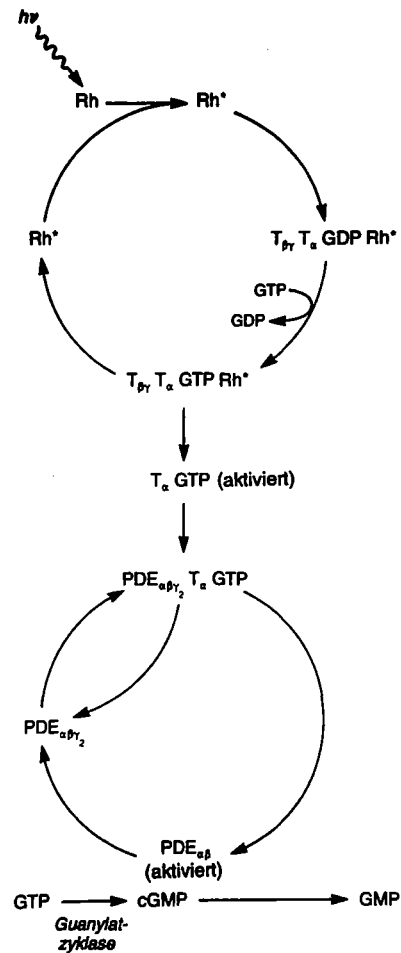


Abb. 1.3: Die cGMP-Kaskade im

Photorezeptor nach Koch (1992)

Im Außensegment des Photorezeptors befinden sich in der Plasmamembran cGMP-gesteuerte Kationen-Kanäle (Cook et al., 1987; Kaupp et al., 1989; Kaupp, 1991). Im Dunkelzustand binden mehrere cGMP-Moleküle direkt und kooperativ an den Kanal, wodurch dieser im offenen Zustand gehalten wird (Fesenko et al., 1985, 1986; Yau & Nakatani 1985; Zimmerman et al., 1985; Haynes & Yau, 1985). Durch diese Kanäle fließt ein einwärts gerichteter Dunkelstrom, der zu ca. 90% von Na^+ -Ionen und zu ca. 10% von Ca^{2+} -Ionen getragen wird (Yau & Baylor, 1989). Im Innensegment befindet sich eine Na^+ - K^+ -ATPase, die die Na^+ -Ionen wieder aus der Zelle heraus pumpt und so einen elektrochemischen Gradienten für Natrium-Ionen aufrecht erhält (Shirley & Lee, 1980). Die Ca^{2+} -Ionen hingegen werden von einem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ -Austauscher im Außensegment aus der Zelle hinaus transportiert (Yau & Nakatani, 1984; Cook & Kaupp, 1988; Cervetto et al., 1989; Schnetkamp, 1989). Im Außensegment wird dadurch im Dunkeln eine freie

Calcium-Konzentration zwischen 220-500 nM aufrechterhalten (Ratto et al.1988; Korenbrot & Miller 1989; Lagnado et al., 1992; Gray-Keller & Detwiler 1994).

Bei Belichtung wird cGMP hydrolysiert, wodurch die intrazelluläre cGMP-Konzentration absinkt. Als Folge dissoziiert cGMP von den Bindungsstellen an den Kanälen ab, woraufhin die Kanäle schließen. Die damit verbundene Unterdrückung des Dunkelstroms wird als Photostrom bezeichnet. Die Folge ist eine Hyperpolarisation der Photorezeptoren. Durch das Schließen der cGMP-gesteuerten Kanäle nimmt der Calcium-Einstrom ab. Der Transport von Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle hinaus durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ -Austauscher wird hingegen fortgesetzt, wodurch die freie Calcium-Konzentration bei sättigenden Lichtbedingungen innerhalb von 20-30 sec stark absinkt (McCarthy et al., 1994). Legt man die Transportraten des $\text{Na}^+,\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauschers zugrunde und berücksichtigt die extrazelluläre Ionenkonzentration, könnte theoretisch eine Calcium-Konzentration von 180 pM erreicht werden (Cervetto et al., 1989). Nach Lichtpulsen im Bereich der Sättigung wurden Werte von 50 nM (Gray-Keller & Detwiler,1994) und weit darunter gemessen (McCarthy et al., 1994). Da *in vivo* Calcium-Puffer vorliegen, liegt der Wert vermutlich eher im nanomolaren Bereich.

1.4 Die cGMP-Kaskade

Ein Rhodopsinmolekül setzt sich aus dem Glykoprotein Opsin (348 Aminosäurereste) und der kovalent gebundenen prosthetischen Gruppe 11-cis-Retinal zusammen. Die Absorption eines Photons führt zu einer Isomerisierung in all-trans-Retinal, was mehrere Konformationsänderungen im Opsin bewirkt. Das metastabile Zwischenprodukt Metarhodopsin II aktiviert, bevor es wieder zerfällt, 500 Moleküle des heterotrimeren G-Proteins Transducin ($\text{T}_{\alpha\beta\gamma}$) (Fung & Stryer, 1980; Fung et al., 1981; Kühn et al., 1981). Dabei wird am T_{α} GDP gegen GTP ausgetauscht und T_{α} -GTP dissoziiert von $\text{T}_{\beta\gamma}$ ab, um eine Phosphodiesterase (PDE) zu aktivieren, die ihrerseits cGMP zu 5'-GMP hydrolysiert (Liebman & Pugh, 1981; Yamazaki et al., 1983; Deterre et al., 1986). Die 500 aktivierten PDE-Moleküle hydrolysieren 10^5 cGMP-Moleküle, was zu einer Schließung von 250 cGMP-gesteuerten Kanälen führt. Auf diese Weise wird der Einstrom von 10^6 - 10^7 Na^+ -Ionen in die Zelle ca. eine Sekunde lang unterbunden, was eine Hyperpolarisation der Membran um 1 mV zur Folge hat. Bei Lichtpulsen im Bereich der Sättigung findet eine Hyperpolarisation von -35 mV auf -65 mV statt.

1.5 Die Wiederherstellung des Dunkelzustandes

Der Abfall der Calcium-Konzentration bei der Lichtantwort ist entscheidend für die Wiederherstellung des Dunkelzustandes. Die Inkorporation einer hohen Konzentration des Calcium-Puffers BAPTA in Stäbchen verlangsamt die Änderungsrate der freien Calcium-Konzentration, wodurch die Erholung des Dunkelstroms nach einer Belichtung dramatisch verlangsamt wird (Torre et al., 1986). Die Wiederherstellung des Dunkelstroms hängt von effektiven Abschalt-Mechanismen auf allen Erregungsstufen innerhalb der Transduktionskaskade und von einer verstärkten cGMP-Synthese ab (Stryer, 1991; Kaupp & Koch, 1992; Lagnado & Baylor, 1992; Pugh & Lamb, 1993).

1.6 Die Abschaltung der Kaskade

Auf der ersten Stufe wird die Kaskade durch die Dissoziation von Metarhodopsin II, dessen Lebensdauer mehrere Minuten beträgt, in Opsin und all-trans Retinal abgeschaltet. Außerdem wird das aktivierte Rhodopsin durch eine Rhodopsin-Kinase phosphoryliert (Wilden & Kühn, 1982; Sitaramayya, 1986; Palczewski et al., 1988), wodurch sich die Affinität für Arrestin erhöht (Kühn et al., 1984; Wilden et al., 1986). Durch die Bindung von Arrestin an Rhodopsin wird Transducin kompetitiv verdrängt, so daß keine weiteren Transducin-Moleküle aktiviert werden können. Auf der nächsten Stufe der Kaskade wird Transducin durch eine intrinsische GTPase-Aktivität inaktiviert (Kühn, 1980; Vuong & Chabre, 1991): Nach Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP reassoziert die T_{α} -GDP-Untereinheit mit dem $T_{\beta\gamma}$ -Komplex. Nach Dissoziation von T_{α} -GTP und PDE kann die PDE wieder mit ihren γ -Untereinheiten assoziieren und wird dadurch inaktiviert.

1.7 Die Licht-Adaptation

Als Adaptation bezeichnet man die Anpassung an eine bestimmte Reizstärke durch eine Änderung der Sensitivität. In der Photorezeption ist in der Regel die Adaptation an Hintergrundlicht (Tages- oder elektrisches Licht) notwendig. Lichtadaptierte Photorezeptoren sind weniger sensitiv für Licht als dunkeladaptierte Zellen und benötigen daher zu einer Auslösung der Lichtantwort mehr Photonen. Während der Dunkelstrom einer dunkeladaptierten Zelle nach einem

Lichtblitz schnell auf seinen Ausgangswert zurückkehrt, fällt er bei Dauerlicht nur leicht ab und erreicht ein Plateau. Gibt man während dieser Plateauphase Lichtblitze, so zeigen die Antworten der Photorezeptoren eine geringere Amplitude und eine längere Erholungsphase als ohne Hintergrundlicht. Von diesem Plateau kehrt der Dunkelstrom erst nach Abschalten des Lichts auf seinen Ursprungswert zurück.

Die Licht-Adaptation wird ebenfalls durch die freie Calcium-Konzentration reguliert: Inkubiert man einen Photorezeptor in einem Medium, das die licht-induzierten Änderungen der freien Calcium-Konzentration minimiert, verschwinden die Haupt-Charakteristika der Licht-Adaptation (Matthews et al., 1988; Nakatani & Yau, 1988). Calcium vermittelt die Adaptation durch Wirkung auf Rhodopsin, die Rhodopsinkinase, die Phosphodiesterase, den cGMP-gesteuerten Kanal und eine membranständige Guanylatzyklase (Koch & Stryer, 1988; Kawamura & Murakami, 1991; Kawamura et al., 1992; Kawamura, 1993; Lagnado & Baylor, 1994; Koutalos et al., 1995)

1.8 Die Synthese von cGMP durch eine retinale, membranständige Guanylatzyklase

Durch den Abfall der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration wird die Synthese von cGMP verstärkt, katalysiert von einer 112 kDa schweren Guanylatzyklase (GC). Diese Guanylatzyklase stellt einen neuen Subtyp unter den membrangebundenen Guanylatzyklasen dar, da sie nicht wie die zuvor charakterisierten Guanylatzyklasen durch natriuretische Peptide oder Guanylin stimuliert wird (Hayashi & Yamazaki, 1991; Koch, 1991; Shyjan et al., 1992; Goraczniak et al., 1994; Koch et al., 1994). Im Gegensatz zu den Peptid-aktivierten Guanylatzyklasen wird die Photorezeptor-Guanylatzyklase nicht auf der extra-, sondern auf der intrazellulären Seite aktiviert (1.9). Sie wird ROS-GC/retGC bzw. retGC1 (seit der Klonierung einer zweiten retina-spezifischen GC) genannt und wurde bislang aus Rind, Mensch und Ratte kloniert (Goraczniak et al., 1994; Shyjan et al., 1992; Yang et al., 1995). Im Folgenden wird die Bezeichnung retGC verwendet. Eine ultrastrukturelle Lokalisation an Menschen- und Affen-Retina ergab, daß sie hauptsächlich in der Photorezeptorschicht vorkommt. Dabei ist sie auf die membranreichen Domänen beschränkt und scheint mit der Rand-Region der Scheibchen und/oder der Plasmamembran assoziiert zu sein (Liu et al., 1994). Die retGC scheint außerdem mit dem Axonem (Fleischman et al., 1980) assoziiert zu sein. Lectinbindungsstudien ergaben, daß sie mit Oligosaccharidseitenketten des Mannose-reichen und des komplexen Typs N-glykosyliert ist (Koch et al., 1994).

Eine unerwartete Komplexität entstand durch die Klonierung einer zweiten Photorezeptor-spezifischen Membran-Guanylatzyklase, retGC2 (Lowe et al., 1995). Aus einer Augen-

spezifischen cDNA-Bibliothek aus Ratte konnten ebenfalls zwei Guanylatzyklasen isoliert werden, die GC-E und GC-F genannt wurden (Yang et al., 1995). Dabei ist GC-E mit 84% Ähnlichkeit zu retGC1 höchstwahrscheinlich das entsprechende Rattenhomolog (Yang et al., 1995), während GC-F vermutlich das Homolog zu retGC2 darstellt (Lowe et al., 1995). Aus Photorezeptoren von Amphibien wurden gleichfalls zwei Banden ähnlicher Größe durch eine Guanylatzyklase-spezifische Reinigung angereichert (Hayashi & Yamazaki, 1991).

Die subzelluläre Verteilung sowie die relativen Anteile von retGC und retGC2 sind bislang nicht bekannt. In dieser Arbeit ist nur die Rede von retGC-Aktivität, da in den ROS-Membran-Präparationen nicht zwischen retGC- und retGC2-Aktivitäten unterschieden werden kann.

1.9 Die Regulation der retGC durch die freie Calcium-Konzentration

Die retGC-Aktivität ist stark von der freien Calcium-Konzentration abhängig. Bei einer Calcium-Konzentration von 220-500 nM, wie sie im Dunkelzustand vorliegt, beträgt die Umsatzrate 0,2-1,3 Moleküle cGMP pro Sekunde (Koch, 1992). Sinkt die Calcium-Konzentration nach Belichtung auf Werte unter 100 nM, so steigt die retGC-Aktivität um das 5-20fache an. Die retGC ist nicht sensitiv für Calciumionen. Das Enzym wird bei einer niedrigen freien Calcium-Konzentration von einem löslichen Calcium-Bindungsprotein aktiviert (Koch & Stryer, 1988). Zunächst wurde das Calciumbindungsprotein Recoverin als Aktivator der retGC identifiziert (Dizhoor et al., 1991; Lambrecht & Koch, 1991). Inzwischen wird jedoch für Recoverin eine Beteiligung an der Inhibierung der Phosphorylierung von Metarhodopsin II postuliert (Kawamura & Murakami, 1991; Gray-Keller et al., 1993; Kawamura 1993). Mittlerweile sind eine ganze Reihe Recoverin-ähnlicher Proteine entdeckt worden, die alle im Nervensystem exprimiert werden und vermutlich eine Rolle in der Signalübertragung spielen (Goto et al., 1989; Yamagata et al., 1990; Lenz et al., 1992; Okazaki et al., 1992; Nakano et al., 1992; Kobayashi et al., 1992; Takamatsu & Uyemura, 1992; Takamatsu et al., 1992; Pongs et al., 1993).

1.10 GCAP1, ein Guanylatzyklase-aktivierendes Calcium-Bindungsprotein

Als immer mehr Indizien gegen eine direkte Aktivierung der retGC durch Recoverin sprachen, wurde die Suche nach dem retGC-Aktivator erneut verstärkt (siehe Zielsetzung dieser Arbeit). Etwa zeitgleich zu den hier vorliegenden Ergebnissen wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls ein Calcium-Bindungsprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 20 kDa

entdeckt, das bei niedrigen freien Calcium-Konzentrationen die retGC aktiviert. Wird dieses Protein in die Stäbchen-Außensegmente einer Eidechse dialysiert, sinken Sensitivität, die Zeit bis zum Erregungsmaximum und die Zeit, die zur Erholung von der Lichtantwort benötigt wird (Palczewski et al., 1994). Diese Ergebnisse entsprechen den Eigenschaften, die von einem retGC-Aktivator erwartet werden. Nach der Veröffentlichung der Sequenz erwies sich dieses Protein als mit dem hier beschriebenen Calcium-Bindungsprotein identisch. Zunächst wurde es GCAP (guanylate cyclase-activating protein) genannt (Gorczyca et al., 1994a). Nach der Identifizierung eines weiteren, eng verwandten Guanylatzyklase-aktivierenden Proteins wurde als Nomenklatur GCAP1 und GCAP2 vorgeschlagen (Dizhoor et al., 1994, Gorczyca et al., 1995; Dizhoor et al., 1995), die im Folgenden verwendet wird.

Während die in dieser Arbeit beschriebene Sequenzierung im Gange war, wurden die von den cDNAs abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen von GCAP1 aus Rind, Mensch, Maus und Frosch publiziert (Palczewski et al. 1994; Subbaraya et al. 1994). Die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der Säugetiere weisen eine Sequenzähnlichkeit von mehr als 90% und somit einen sehr hohen Grad an Konservierung auf. Die berechneten Molekulargewichte liegen bei 21-23 kDa (Subbaraya et al., 1994). GCAP1 aus Frosch weist immerhin noch eine Sequenz-Homologie von 75% zu den Säuger-GCAPs auf, wobei die größten Unterschiede im C-Terminus liegen (Subbaraya et al., 1995).

Das humane GCAP1-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert (Region 6p21.1). Eine Analyse von Interphase-Zellen zeigte, daß nur eine Kopie des Gens im humanen Genom vorhanden ist (Subbaraya et al., 1994). Durch genomisches Southern Blotting konnten Hybridisierungssignale in Mensch, Affe, Rind, Ratte, Maus, Hund, Kaninchen, Huhn sowie ein schwaches Signal in *Saccharomyces cerevisiae* detektiert werden. Erste Hinweise aus einem Tiermodell, in dem GCAP1 deletiert ist (rd chicken) sprechen dafür, daß Mutationen in GCAP1 zu retinalen Funktionsstörungen führen können (Semple-Rowland et al., 1995).

1.11 Aktivierung der retGC durch einen nicht-GCAP-verwandten Faktor

Zusätzlich zu den beiden GCAPs ist ein neuer Faktor entdeckt worden, der die retGC mit einem EC₅₀-Wert von 2-5 µM Calcium reguliert (Pozdnyakov et al., 1995). Der Aktivator hat eine molekulare Masse von 40 kDa und ist ein Multimer aus 6-7 kDa Peptiden. Mit ⁴⁵Calcium konnte gezeigt werden, daß diese Peptide Calcium binden. Für eine Aktivierung der retGC in Photorezeptoraußensegmenten erscheint eine solche Regulation nicht sinnvoll, da die Calcium-

Konzentration im Außensegment auch im Dunkeln weit unter 1 μM liegt. Wahrscheinlicher erscheint die von den Autoren diskutierte Möglichkeit, daß diese Peptide eine Guanylatzyklase in den synaptischen Lagen der Retina aktivieren. Die Aktivierung ist mengenabhängig und stimuliert die retGC maximal 25-fach.

Zielsetzung der Arbeit

Zum Zeitpunkt, als die Arbeit begonnen wurde, waren erste Zweifel daran aufgekommen, daß Recoverin die retGC aktiviert (Gray-Keller et al., 1993; Hurley et al., 1993). Daher sollte diese Hypothese überprüft werden. Im Verlauf der Arbeit bestätigten sich die Zweifel und das nächste Ziel bestand darin, den Aktivator der retGC zu identifizieren. Nach der Identifizierung eines 20,5 kDa Calcium-Bindungsproteins sollten das Protein und seine Aktivator-Eigenschaften charakterisiert werden. Das nächste Ziel bestand in der Klonierung und Sequenzierung dieses Calcium-Bindungsproteins. Nachdem dieses Ziel erreicht war, sollte rekombinantes Protein exprimiert und charakterisiert werden. Die Eigenschaften des rekombinanten Proteins sollten mit den Eigenschaften des nativen Proteins verglichen werden.

2.0 MATERIAL & METHODEN

2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham (Buckinghamshire, UK), Biomol (Hamburg), Biorad (Richmond, USA), Invitrogen (San Diego, USA), Merck (Darmstadt), Nordwald (Hamburg), Pharmacia (Freiburg), Quiagen (Hilden), Renner (Dannstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Chemikalien zur Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden stammten von der Firma MWG (Ebersberg). Die Röntgenfilme X-Omat stammten von der Firma Kodak. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme, Vektor-DNA und Bakterienstämme wurden von den Firmen Ambion (Austin, Texas, USA), Boehringer (Mannheim), GIBCO BRL (Eggenstein), Invitrogen (San Diego, USA), NEB (Schwalbach), Perkin Elmer Cetus (Überlingen), Pharmacia (Freiburg), Stratagene (Heidelberg) und USB (Bad Homburg) geliefert. Für den Transfer von Nukleinsäuren und Proteinen wurden Membranen der Firmen Schleicher & Schüll (Dassel) und Quiagen (Hilden) verwendet. Der Anti-rabbit IgG Antikörper, das ECL-System und die Hyperfilme stammten von der Firma Amersham. Die Centricon CE 10 Filtrationseinheiten stammten von der Firma Amicon (Beverly, USA). Die FPLC-Geräte und Säulen stammten von Pharmacia.

2.2 Präparation der Sechstäbchenaußensegmente

Die Präparation der Sechstäbchenaußensegmente (ROS = rod outer segments) wurde nach einer veränderten Methode von Schnetkamp und Daemen (1982) durchgeführt. Alle Präparationsschritte erfolgten bei Rotlicht auf Eis. Die Retinen wurden aus frischen, dunkeladaptierten Rinderaugen entnommen. Folgende Medien wurden verwendet:

Leichtes Medium

600 mM Saccharose
115 mM NaCl
2,5 mM KCl
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM DTT

Schweres Medium

1500 mM Saccharose
115 mM NaCl
2,5 mM KCl
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM DTT

Waschpuffer

115 mM NaCl
2,5 mM KCl
1 mM MgCl₂
10 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM DTT

Lysepuffer

10 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM DTT
0,5 mM PMSF

Bei jeder Präparation wurden ca. 280 Rinderaugen aufgeschnitten, die Netzhäute vom Pigmentepithel gelöst und in 0,8-1 ml schwerem Medium pro Retina gesammelt. Die Suspension wurde 90 sec lang kräftig geschüttelt und anschließend 7 min lang zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge J2-21, Rotor JA-14, 3500 g). Der Überstand wurde durch ein Nylonnetz filtriert und im Verhältnis 1:1 mit Waschpuffer verdünnt. Nach einer weiteren Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge J2-21, Rotor JA-14, 4700 g) wurden die in 30-40 ml Leichtem Medium resuspendierten Pellets vereint auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (600-1500 mM Saccharose) geschichtet. Die Gradienten wurden 90 min lang in der Beckman-Ultrazentrifuge L7-62, Rotor SW 28 bei 70000 g zentrifugiert. Die ROS-Banden wurden entnommen, vereinigt und nach 1:1 Verdünnung mit Waschpuffer erneut 10 min lang zentrifugiert (Sigma-Zentrifuge 2K15, Rotor 12139, 12400 g). Die Pellets wurden in Lysepuffer (90 µl pro Retina) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Im Folgenden werden die resuspendierten Pellets als ROS-Suspension bezeichnet.

2.3 Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration

Die Rhodopsin-Konzentration wurde nach der Methode von deGrip (deGrip et al.,1972) bestimmt. Dazu wurden 100 µl der zu vermessenden ROS-Suspension mit 1,8 ml H₂O und 0,1 ml 10% Triton-X-100 vermischt und bei einer Wellenlänge von 500 nm gegen einen Blanko-Wert vermessen. Anschließend wurde die Probe 15 min durchbelichtet und erneut vermessen. Der zweite Meßwert wurde vom ersten Meßwert subtrahiert. Die Differenz wurde dann mit dem Faktor zwanzig multipliziert, da die Verdünnung der Probe 1:20 betrug. Diese vereinfachte Rechenweise konnte angewandt werden, da der Extinktionskoeffizient mit einer Größe von 40000 mit dem für Rhodopsin angenommenen Molekulargewicht identisch ist (40000 Da) und sich die beiden Faktoren somit herauskürzen lassen. Das Ergebnis dieser Berechnung ergab die Rhodopsin-Menge in mg/ml ROS-Suspension.

2.4 Reinigung von GCAP1 aus ROS

2.4.1. Herstellung eines Lichtextraktes

Unter Rotlicht wurden 12 ml ROS-Suspension aufgetaut. Nach Zugabe von 4 ml 10 mM HEPES/KOH pH 7,4 wurde die Suspension auf 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 3 mM ATP eingestellt und 15 min bei 37°C im Wasserbad belichtet. Nach der Einstellung auf 10 mM KH₂PO₄ und einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension 40 min lang zentrifugiert (Beckman-Ultrazentrifuge L7-62, Rotor TI-70, 40000 UpM). Der Überstand (Lichtextrakt) wurde zur vollständigen Abtrennung von Membranproteinen erneut 20 min lang zentrifugiert (Beckman-Zentrifuge TL-100, Rotor TLA 100.3, 80000 UpM) und mit Centricon CE 10 (Amicon) 11,5-fach konzentriert, so daß das Volumen 1,4 ml betrug (Sigma-Zentrifuge 2K15, Rotor12139, 5000 g, 4°C).

2.4.2 Gelfiltrationschromatographie

Der konzentrierte Lichtextrakt wurde über eine Probenschleife auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75 16/60, Pharmacia), die mit einer Flußrate von 1 ml · min⁻¹ mit Puffer A äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Proteine wurden mit einer Flußrate von 1 ml · min⁻¹ in Puffer A eluiert. Die Absorption der Proteine wurde mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge $\lambda = 280$ nm gemessen und von einem Schreiber aufgezeichnet. Insgesamt wurden 120 ml Puffer A auf die Säule gegeben, wovon die ersten 40 ml verworfen und die folgenden 80 ml in 2 ml Fraktionen gesammelt wurden. GCAP1 eluierte in den Fraktionen 14-18, d. h. 26-36 ml nach Start des Fraktionssammlers. Diese Fraktionen wurden für den nächsten Reinigungsschritt vereinigt.

Puffer A: 50 mM NaCl
 20 mM Tris-HCl pH 8,0
 1 mM DTT

2.4.3 MonoQ-Anionenaustauschchromatographie

Eine MonoQ-Säule HR 5/5 (Pharmacia) wurde mit einer Flußrate von $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ mit Puffer A (2.4.2) äquilibriert. Die NaCl-Konzentration des Puffers wurde kontinuierlich durch steigende Zugabe von Puffer B erhöht. Bei der anfänglichen NaCl-Konzentration von 50 mM konnten einige Proteine an die Säule gebunden werden. Die nicht-bindenden Proteine befanden sich im Durchfluß und wurden verworfen. Nach 13 ml begann der Fraktionssammler 0,5 ml-Fraktionen aufzufangen. Um die gebundenen Proteine von der Säule zu lösen, wurde die NaCl-Konzentration bei einer Flußrate von $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ in einem Zeitraum von 40 min von 50 auf 500 mM NaCl erhöht. Anschließend wurde die Säule 4 min lang mit 100% Puffer B gespült. GCAP1 eluierte bei einer Salzkonzentration von 390-400 mM in den Fraktionen 30-31, d. h. bei einem Elutionsvolumen von 14,5-15,5 ml. Diese Fraktionen wurden bei -20°C aufbewahrt.

Puffer B: 500 mM NaCl
 20 mM Tris-HCl pH 8,0
 1 mM DTT

2.5 Klonierung von GCAP1

2.5.1 Bakterien und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *Escherichia coli* K12 Stämme eingesetzt: Der Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987) wurde zur Anreicherung von Plasmid- und λ -Phagen-DNA und versuchsweise auch zur Expression von Fusionsproteinen eingesetzt. Zur regulären Expression der Fusionsproteine wurde der *E. coli* Stamm GI698 benutzt.

Das Plasmid pBluescript I SK(-) (Stratagene, Short et al., 1988) wurde als Plasmidvektor verwendet. Der Vektor pGEX-2T diente zur Expression von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen in *E. coli*.

Als Vektor für cDNA-Bibliotheken diente λ -ZAPII-DNA (Stratagene, Short et al., 1988). Als Helfer-Phage für die in-vivo-Excision wurde der Phage Exassist eingesetzt.

2.5.2 Anzucht von *Escherichia coli*

Soweit nicht anders vermerkt, wurden *E. coli*-Zellen standardmäßig in LB-Medium bei 37°C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick, Nürtingen) oder einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel, Melsungen) vermehrt.

LB-Medium: (1 l) 10 g NaCl
 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt

Zur Selektion auf Plasmide wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zugesetzt.

2.5.2.1 Kulturbedingungen der Expressionskulturen

Die Klone wurden zur Expression in den *E. coli* Stamm GI698 (K12-Derivat) transformiert und auf LB-Medium mit 0,02% Ampicillin ausplattiert. Mit Einzelkolonien dieser Stammplatte wurden Übernacht-Kulturen (5 ml LB-Medium, 0,02% Ampicillin) angeimpft, die für die unter 2.6 beschriebene Reinigung als Vorkultur dienten. Zur Expression wurden 2 x 250 ml LB-Medium auf 0,02% Ampicillin eingestellt, mit 500 µl der Vorkultur versetzt und bei 37°C (185 UpM) bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3-0,5 angezogen. Die Kulturen wurden kurz bei 4°C abgekühlt und die Expression wurde durch Zusatz von 1 mM IPTG induziert. IPTG wirkt im pGEX-2T als künstlicher Induktor, da es an den *lac*-Repressor bindet und somit den *tac*-Promotor freisetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 4-5 h (25°C, 185 UpM) wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (Beckman-Zentrifuge J2-21, Rotor JA14, 5000 UpM, 10 min, 4°C). Die Bakterien-Pellets wurden in Lyse-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1/10 des Kulturvolumens) aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

2.5.2.2 Infektion der *E.coli*-Zellen mit λ-Phagen

Zur Infektion von *E. coli* Zellen mit λ-Phagen wurde eine XL1 Blue-Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 in LB mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose angezogen. 50 µl dieser Zellsuspension wurden mit 15 µl einer 200-fachen Verdünnung der λ-Phagen-Stocklösung gemischt und 15 min

bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit 3 ml vorgewärmter NZY-Topagarose (50-55°C) versetzt und auf NZY-Agarplatten (NZY mit 15 g/l Agar) ausplattiert. Die Platten wurden ca. 12 h bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C gelagert. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 86 mm. Bei Verwendung von größeren Petrischalen wurden die Volumina entsprechend erhöht.

NZY: 10 g/l NZ-Amine
 5 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl
 2 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

2.5.3 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit einem DNA-Synthesizer 391 (Applied Biosystems) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden durch eine ca. 12-stündige Inkubation mit 32% Ammoniak von dem Säulenmaterial gelöst und diese Suspension wurde dann lyophilisiert. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgte durch zweimaliges Fällern mit Ethanol. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.5.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.5.4.1 Photometrische Bestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Absorption von Nukleinsäurelösungen bei 260 nm in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm ermittelt. Für die Berechnung wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

Doppelsträngige DNA: 50 µg/ml pro OD₂₆₀-Einheit
Oligonukleotide: 33 µg/ml pro OD₂₆₀-Einheit

Die Reinheit der Nukleinsäurelösungen wurde über das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt. Es sollte bei reinen Nukleinsäurelösungen nicht unter 1,8 liegen.

2.5.4.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenz

Zur Mengenbestimmung durch Ethidiumbromid-Fluoreszenz wurden Nukleinsäuren gelelektrophoretisch in Gegenwart von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) aufgetrennt. Unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) wurde die Fluoreszenz-Intensität der Probe mit bekannten Standards verglichen und auf diese Weise die Menge abgeschätzt.

2.5.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2.5.5.1 Alkalische Mini-Präparation

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus kleinen Kulturvolumina wurde eine Modifikation der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) eingesetzt. 1,5 bis 3 ml einer Bakterienkultur wurden sedimentiert (Sigma-Zentrifuge 2K 15, 1 min, 15000 UpM, Rotor 12145, 4°C), in 50 µl Lösung I resuspendiert und durch Zugabe von 60 µl Lösung II lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 75 µl 3 M KAc pH 4,8 gefällt und durch Zentrifugation (Sigma-Zentrifuge 2K 15, 10 min, 15000 UpM, Rotor 12145, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das Plasmid-Pellet wurde in 10-20 µl TE-Puffer aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Glukose
 25 mM Tris/HCl pH 8,0
 10 mM EDTA

Lösung II: 0,2 M NaOH
 1% SDS

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0
 1 mM EDTA

2.5.5.2 Alkalische Maxipräparation

Größere DNA-Mengen wurden mit Quiagen-Anionenaustauscher-Säulen (Quiagen-Pack-500) aus 500 ml Bakterienkultur nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.5.6 Modifikation von Nukleinsäuren

2.5.6.1 Glätten überhängender Enden von DNA-Fragmenten

Zum Auffüllen von überhängenden 5'-DNA-Enden wurde das Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I eingesetzt. Durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms wurden gleichzeitig eventuell vorhandene überhängende 3'-DNA-Enden geglättet. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

Reaktionsansatz:	2 U/μg DNA Klenowenzym
	250 μM dNTP
	33 mM Tris-Acetat
	10 mM MgAc
	66 mM KAc
	0,5 mM DTE

Vor der weiteren Verwendung wurde die DNA zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol gefällt oder über Auftrennung und Elution mittels eines Agarose-Gels gereinigt (2.5.8).

2.5.6.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Durch PCR-Reaktionen angereicherte DNA-Fragmente, deren 5'-Enden nicht phosphoryliert waren, wurden vor der Klonierung durch T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

Reaktionsansatz: 5-10 U Enzym/ μ g DNA
7 mM Tris/HCl
1 mM MgCl₂
0,5 mM DTT
0,1 mM ATP pH 7,5

Die Reaktion wurde durch 5 min Erhitzen auf 65°C gestoppt.

2.5.6.3 Dephosphorylierung geschnittener Vektoren

Geschnittene Vektor-DNA mit kompatiblen überhängenden oder glatten Enden wurden zur Vermeidung der Religation mit alkalischer Phosphatase (Boehringer) dephosphoryliert. Die DNA wurde mit 0,04 U Phosphatase/ μ g DNA in 1x AP-Puffer (Boehringer) für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EGTA (Endkonzentration: 16,7 mM) und 10 min Erwärmen auf 68°C gestoppt. Die DNA wurde anschließend zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol gefällt.

2.5.7 Analyse von DNA

2.5.7.1 Restriktion von DNA

Die Restriktionen wurden unter den Bedingungen durchgeführt, die vom jeweiligen Hersteller der Restriktionsendonuklease angegeben wurden. Standardmäßig wurden die Proben 2 h bei 37°C mit 1-2 U Enzym/ μ g DNA inkubiert. Plasmid-DNA, die durch alkalische Mini-Präparation gewonnen worden war, wurde zusätzlich mit RNase/DNase-frei (Endkonzentration: 5 μ g/ml; Boehringer) versetzt. Je nach Verwendungszweck der geschnittenen DNA wurde der Ansatz entweder direkt zur Analyse elektrophoretisch aufgetrennt oder durch eine Phenolextraktion und anschließende Ethanol-Fällung gereinigt.

2.5.7.2 DNA-Sequenzierung

Die doppelsträngige Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) sequenziert. Vor der Sequenzierung wurde die DNA alkalisch denaturiert (Chen & Seeburg, 1985). Die Sequenzierreaktionen wurden mit modifizierter T7-DNA-Polymerase (Tabor & Richardson, 1987; 1989), Sequenase 2.0 (USB), nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Synthese wurde entweder durch den M13-(-40)-Universalprimer (USB), den M13-Reverse-Primer (USB) oder die im Anhang aufgeführten genspezifischen Primer gestartet. Zur Markierung der synthetisierten DNA-Fragmente wurde (α^{35})-dATP verwendet. Die Auftrennung der Sequenzierreaktionen erfolgte in 0,4 mm dicken, denaturierenden Polyacrylamid-Gelen in einer S2-Sequenzier-Kammer (BRL). Die Elektrophorese wurde je nach Anforderung zwischen 2 h bei 65 W (kurzer Lauf) und bis zu 16 h bei 20 W (langer Lauf) durchgeführt. Die Gele wurden anschließend 20 min fixiert (5% Ethanol, 5% Essigsäure), auf ein Filterpapier übertragen und im Vakuum getrocknet. Der Nachweis der markierten Fragmente erfolgte durch Autoradiographie (2.5.12.13).

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele: 6% Acrylamid/Bisacrylamid 19:1
8 M Harnstoff
1x Elektrophoresepuffer

Elektrophoresepuffer (1x TBE): 50 mM Tris/Borat pH 7,8
1 mM EDTA

2.5.7.3 Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden durch horizontale Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt (GNA 100; Pharmacia). Als Puffersystem diente 1x TAE. Die Agarosekonzentration lag entsprechend der jeweiligen Anforderung zwischen 0,5% (zur Trennung von Fragmenten größer als 3 kBp) und 2,0% (zur Trennung von Fragmenten kleiner als 500 Bp). Beim Gießen wurde den Gelen 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Elektrophorese wurde bei Spannungen zwischen 80 und 120 V bis zum Erreichen der erforderlichen Trennung durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 10x Probenpuffer versetzt.

1x TAE: 40 mM Tris/Acetat
1 mM EDTA pH 7,5

10x Probenpuffer: 50% Glyzerin
10 mM Tris/HCl pH 7,8
0,01% Xylemcyanol

2.5.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die DNA-Proben elektrophoretisch (2.5.7.3) aufgetrennt und der Bereich des zu isolierenden DNA-Fragments aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden durch Adsorption an Glaspartikel (Vogelstein & Gillespie, 1979) mit dem Quia-Ex-Kit (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers aus der Agarose eluiert.

2.5.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.5.9.1 Ligation

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren wurde ein 2- bis 10-facher molarer Überschuß an DNA-Fragment eingesetzt. Die Ligation wurde durch T4-DNA-Ligase im vom jeweiligen Hersteller vorgeschriebenen Puffer katalysiert. Die Ligation von kompatiblen überhängenden Enden erfolgte in 1-2 Stunden bei 22°C. Bei der Ligation von glatten Enden wurde 2-16 Stunden bei 14-22°C inkubiert.

2.5.9.2 Transformation

Kompetente *E.coli* Zellen wurden nach einer modifizierten CaCl_2 -Methode (Mandel & Higa, 1970) hergestellt. Die Bakterienkultur wurde in LB-Medium bei 37°C bis zu einer Dichte von 0,35 OD_{600} inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurde sedimentiert (Sigma 2K15, 3000 x g, Rotor 11133, 5 min, 4°C) und in der Hälfte des Kulturvolumens eiskalter

100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen nochmals pelletiert und in einem Zehntel des Kulturvolumens 100 mM CaCl₂/20% Glycerin auf Eis resuspendiert. Nach weiteren 2 bis 4 Stunden Inkubation auf Eis wurden die kompetenten Zellen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Plasmid-DNA wurde nach einer modifizierten „One Minute Transformation“ (Golub, 1988) transformiert. 10 bis 100 ng Plasmid-DNA in 10 µl TE-Puffer wurden auf Eis mit 40 µl kompetenten Zellen gemischt, 2 min auf Eis, 1 min bei 42°C, wieder 5 min auf Eis inkubiert und auf einer LB-Agarplatte (mit 0,1 mg/ml Ampicillin) ausplattiert.

Ligationsansätze wurden auf eine Endkonzentration von 10 mM CaCl₂/40 mM MgCl₂ eingestellt und ad 100 µl mit H₂O aufgefüllt. Die Ansätze wurden vorgekühlt und auf Eis vorsichtig mit 100 µl kompetenten Zellen vermischt. Zur Transformation der Zellen wurde 20 min auf Eis, 1 min bei 42°C und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurden die Zellen 30 min bei 37°C regeneriert, um die plasmidvermittelte Antibiotika-Resistenz auszuprägen. Die transformierten Zellen wurden anschließend auf plasmidselektiven Agarplatten ausplattiert.

2.5.9.3 Subklonierung von cDNA aus λ-Phagen

Rekombinante pBluescript SK(-)-Plasmide wurden aus λ-ZAPII-Phagen durch das „*in vivo* Excision“-Verfahren gewonnen. Die Präparation erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers (Stratagene).

2.5.10 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988) wurde zur Anreicherung von DNA-Fragmenten aus cDNA und zur Modifizierung von DNA-Sequenzen eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden in Gegenwart von 0,2 µM dNTP und 3,75 U/100 µl Taq-DNA-Polymerase (Pharmacia) oder 1,25 µl/100 µl PrimeZyme-DNA-Polymerase im vom jeweiligen Hersteller vorgeschriebenen Puffer inkubiert. Die Konzentration der Primer betrug jeweils 0,5 µM. Als Matrizen-DNA diente je nach Aufgabenstellung 1 bis 5 ng zirkuläre Plasmid-DNA oder

10 bis 50 ng doppelsträngige cDNA. Die Reaktionen wurden in einem Biometra Thermocycler durchgeführt. Zuerst wurde der Reaktionsansatz denaturiert (2 min, 94°C) und dann 20 bis 40 Zyklen mit folgenden Bedingungen durchlaufen: 50 sec Denaturierung bei 94°C, 50 sec Hybridisierung bei 37-64°C (je nach Basenzusammensetzung und Länge der Primer) und dann 40 sec Strangverlängerung bei 72°C. Die Hybridisierungstemperatur wurde so gewählt, daß sie der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Primer entsprach. Die Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer wurde anhand der folgenden Formel bestimmt:

$$T_m = (G/C) \times 4^\circ\text{C} + (A/T) \times 2^\circ\text{C} - (\text{Fehlbasenpaarung}) \times 4^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$$

Im Anschluß an die PCR-Reaktion wurde die DNA mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Amplifizierte Fragmente, die ohne vorherige Restriktion kloniert werden sollten, wurden zur Entfernung von möglichen überhängenden 3'-Enden (Clark, 1988) mit dem Klenow-Enzym (2.5.6.1) behandelt. Die 5'-Enden wurden mit Polynukleotid-Kinase phosphoryliert (2.5.6.2). Da die Fehlerrate der PCR relativ hoch ist (Ennis et al., 1990), wurde die Sequenz von PCR-Fragmenten, die in Plasmide für Expressionsexperimente kloniert worden waren, durch Sequenzieren auf ihre Authentizität hin geprüft.

2.5.11 Markieren von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente, die als Sonde für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden radioaktiv nach der „random priming“ Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983) mit ($\alpha^{32}\text{P}$)-dCTP (spezifische Aktivität: >6000 Ci/mmol) mit dem DECAprime DNA Labeling Kit (Ambion) markiert. Die Reaktionen wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden durch Gelfiltration (Sephadex G75, Pharmacia) abgetrennt. Der Einbau von ($\alpha^{32}\text{P}$)-dCTP wurde in einem Szintillationszähler (Tricarb 2000 CA, Packart) bestimmt.

2.5.12 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren

2.5.12.1 Transfer von Nukleinsäuren

DNA, die elektrophoretisch in einem Agarosegel augetrennt worden war, wurde nach der Methode von Weinkoth und Wahl (1984) auf Membranen transferiert („Southern Blot“). Die DNA wurde zunächst denaturiert (10 min, 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und dann neutralisiert (10 min, 0,5 M Tris pH 8,0, 1,5 M NaCl). Die DNA wurde durch Diffusion mit 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Zitrat, pH 7,0) in 12 bis 16 h auf eine Nylonmembran (Quiabran, Quiagen) transferiert.

λ -Phagen wurden von Agarplatten nach Benton und Davis (1977) auf Nylonfilter übertragen („Plaquelifting“). Die Filter wurden luftblasenfrei auf die abgekühlten Agarplatten aufgelegt und dort 2-3 min belassen. Die Orientierung der Membran wurde durch Einstiche in den Filter und die Agarplatte markiert. Die Filterabzüge wurden anschließend 5 min denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und 5 min neutralisiert (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl).

Auf Membranen transferierte Nukleinsäuren wurden von beiden Seiten durch UV-Quervernetzung (254 nm, 0,12 J/cm², Stratalinker, Stratagene) immobilisiert.

2.5.12.2 Hybridisierung

Für das Durchsuchen der cDNA-Bibliothek und für den Southern-Blot wurde eine ³²P-markierte Sonde verwendet. Die Hybridisierung erfolgte bei der cDNA-Bibliothek unter niedriger, beim Southern-Blot unter hoher Stringenz:

Prähybridisierung:

Hybridisierungslösung

cDNA-Bibliothek: 1 h, 60°C

Southern-Blot: 20 min, 65°C

Hybridisierung:

Hybridisierungslösung mit 50-100 ng ³²P-markierter DNA

cDNA-Bibliothek: 12 h, 60°C

Southern-Blot: 2 h, 65°C

Waschen: 1x SET/0,1% SDS
cDNA-Bibliothek: 2 x 25 min, 60°C
Southern-Blot: 2 x 30 min, 65°C

Hybridisierlösung: 5x SET
5x Denhardt's
0,1% SDS
100 µg/ml Hering Sperma DNA

20x SET: 3,0 M NaCl
0,02 M EDTA
0,4 M Tris/HCl pH 7,4-7,8

1x Denhardt's: 0,02% BSA
0,02% Ficoll 400
0,02% Polyvinylpyrrolidone

2.5.12.3 Detektion markierter Nukleinsäuren

Hybride aus Nukleinsäuren und radioaktiv markierten DNA-Sonden sowie die gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente von Sequenzierreaktionen wurden autoradiographisch nachgewiesen. Dazu wurden hochempfindliche Röntgenfilme (Kodak XAR5) verwendet. Sequenziergele mit ³⁵S-markierten Fragmenten wurden 12-48 h bei Raumtemperatur exponiert. Zum Nachweis von ³²P-markierten Nukleinsäuren wurde zwischen 5 min und 36 h bei -80°C mit Verstärkerfolien (Cronex Hi Plus, Du Pont) autoradiographiert.

2.6 Reinigung der rekombinanten GCAP1-Formen

Die Bakterien (2.4.2.1) wurden aufgetaut und 4 x 20 sec lang sonifiziert (Branson Sonificator B-12, Stufe 7-8). Die festen Bestandteile wurden abzentrifugiert (Sigma-Zentrifuge 2K15, Rotor 12139, 15000 UpM, 10 min, 4°C) und der klare Überstand wurde mit 10x PBS auf 1x PBS eingestellt.

1x PBS-Puffer:	137 mM NaCl	
	2,7 mM KCl	
	6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	
	1,5 mM KH ₂ PO ₄	pH 7,4

2.6.1 Glutathionagarose-Chromatographie

Dieser Überstand (55,5 ml) wurde mit 2 ml Glutathion-Agarose, die mit 1x PBS äquilibriert worden war, 1 h lang unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundene Fraktion wurde nach Zentrifugation (Sigma-Zentrifuge 2K15, Rotor 11133, 5000 g, 10 sec, 4°C) entfernt. Die Agarose wurde mit 3 x 12 ml Spaltungspuffer (150 mM NaCl, 60 mM Tris-HCl pH 8,0, 2,5 mM CaCl₂) gewaschen (Zentrifugation s.o.) und in 3 ml des gleichen Puffers aufgenommen.

2.6.2 Thrombinspaltung

Das gebunden Fusionsprotein (Glutathion-S-Transferase-GCAPX/T) wurde durch Zugabe von 25 Einheiten Thrombin (bzw. Faktor Xa, 3.9.1) und Inkubation bei Raumtemperatur für 2-3 h gespalten. GCAPX/T wurde durch Umfüllen der Suspension in eine Bio-Rad Poly-Prep-Chromatographie-Säule und anschließendes Waschen mit 2-3 ml Spaltungspuffer eluiert. Das Eluat wurde im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt und einer MonoQ-Anionenaustauschchromatographie unterzogen.

2.6.3 MonoQ-Anionenaustauschchromatographie

Eine MonoQ-Säule HR 5/5 (Pharmacia) wurde mit einer Flußrate von 0,5 ml · min⁻¹ mit Puffer A (2.4.2) äquilibriert. Die NaCl-Konzentration des Puffers wurde durch steigende Zugabe von Puffer B (2.4.3) erhöht. Bei der anfänglichen NaCl-Konzentration von 50 mM konnten die rekombinanten GCAP1-Formen an die Säule gebunden werden. Die nicht bindenden Proteine befanden sich im Durchfluß und wurden verworfen. Nach 13 ml begann der Fraktionssammler 0,5 ml-Fraktionen aufzufangen. Um die gebundenen Proteine von der Säule zu lösen, wurde die

NaCl-Konzentration bei einer Flußrate von $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ in zwei Stufen von 50 auf 175 mM in einem Zeitraum von 26 min und von 175 auf 500 mM innerhalb von 10 min erhöht. Anschließend wurde die Säule 4 min lang mit 100% Puffer B gespült. Das rekombinante Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von 390-400 mM in den Fraktionen 34-38, d. h. bei einem Elutionsvolumen von 17-19 ml. Diese Fraktionen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.7 Antikörper-Produktion

Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers wurde ein Kaninchen (Rasse: weißer Neuseeländer) verwendet. Etwa $100 \mu\text{g}$ rekombinantes GCAP1 wurden 1:1 mit Ribis Adjuvants gemischt und anschließend in einem Volumen von 1 ml subkutan im Bereich des Nackens injiziert. Nach zwei Wochen wurde die gleiche Menge Antigen nochmals injiziert. Zwei Wochen nach dieser Injektion wurde dem Tier aus der Ohrarterie Blut entnommen (ca. 7 ml). Das Serum wurde folgendermaßen aus dem Blut gewonnen: Die Gerinnung des Blutes erfolgte während einer 3- bis 4-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur. Zur Verfestigung des Blutkuchens wurde das Blut anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Der Blutkuchen und andere unlösliche Bestandteile wurden durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen sedimentiert (Sigma 2K15, Rotor 11133, 5000 UpM, 10 min, 4°C) und das Serum als Überstand abgenommen und aliquotiert. Die Lagerung der Seren erfolgte bei -80°C .

2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Eine Eichkurve wurde mit Bovine Serum Albumin (BSA) erstellt, wobei Proteinkonzentrationen von 0 bis $18 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ gegen einen Blindwert gemessen wurden. Die Eichlösungen wurden mit Wasser auf $800 \mu\text{l}$ aufgefüllt, so daß das Küvettenvolumen nach Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Bradford-Reagenz 1 ml betrug. Als Blindwert dienten $800 \mu\text{l}$ Wasser, denen $200 \mu\text{l}$ Bradford-Reagenz zugesetzt wurden.

2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) in einer Biometra Minigel-twin-Kammer durchgeführt. Die Proteinproben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer auf 1x SDS-Probenpuffer eingestellt, 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz zentrifugiert.

1x SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,2
 12,5% (v/v) Glycerin
 1% (v/v) Mercaptoethanol
 1,6% (w/v) SDS
 0,0013% (w/v) Bromphenolblau

Als Molmassenmarker diente ein „Low Molecular Weight Calibration Kit“ von Pharmacia, der folgende Proteine enthielt:

Markerprotein	Molekulargewicht
Phosphorylase b	94 kDa
Albumin	67 kDa
Ovalbumin	43 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa
α-Lactalbumin	14,4 kDa

2.9.1 Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese in der Biometra Minigel-Twin-Kammer wurden Gele der Größe 8 x 8 cm und 1 mm Dicke aus Trenn- und Sammelgel mit unten angegebener Zusammensetzung gegossen. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels betrug stets 12,5%.

Acrylamidlösung: 30% (w/v) Acrylamid
 0,75% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Zusammensetzung der Gele:

	Trenngel	Sammelgel
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,5 ml	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8		0,5 ml
Acrylamidlösung	2,5 ml	0,34 ml
TEMED	3 µl	2 µl
10% (w/v) SDS	60 µl	20 µl
10% (w/v) APS	40 µl	40 µl
H ₂ O	1,92 ml	1,12 ml

Die Gelplatten wurden vertikal in die mit Elektrodenpuffer gefüllte Kammer eingespannt und die Proteine zunächst bei 25 mV pro Gel bis zum Erreichen des Trenngels und danach bei 30 mV getrennt.

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,0
 192 mM Glycin
 0,1% (w/v) SDS

2.10 Färbung der Minigele mit Coomassie-Blue

Diese Färbung der Proteine wurde nach einer modifizierten Methode von Meyer und Lamberts (Meyer & Lamberts, 1965) durchgeführt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese zunächst einige Minuten in der Entfärbelösung fixiert, dann 30 min in der Färbelösung gefärbt und anschließend solange mit Entfärbelösung behandelt, bis der Hintergrund farblos war. Danach wurden die Gele in 1% Glyzerin aufbewahrt, bevor sie im Bio-Rad Gelrockner bei 80 °C 45 min auf Filterpapier getrocknet wurden.

Färbelösung:	Entfärbelösung:
0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250	25% (v/v) Ethanol
25% (v/v) Ethanol	5% (v/v) Essigsäure
5 % (v/v) Essigsäure	

2.11 Westernblotting

Proteine, die in Biometra-Minigelen elektrophoretisch getrennt wurden, konnten in der Biometra-Fastblotkammer B33 im Semi-Dry-Verfahren (Kyhe-Andersen, 1984) auf Nitrozellulose-Membranen (Porengröße 0,22 μm) übertragen werden (Towbin et al., 1979). Die Nitrozellulose-Membran sowie 10 Filterpapiere wurden in Blotpuffer getränkt. Das Gel und die Nitrozellulose-Membran wurden luftblasenfrei so zwischen zwei Graphitelektroden und je 5 Lagen Filterpapier gelegt, daß der Proteintransfer aus dem Gel heraus über die Membran zur Anode erfolgte. Bei einer angelegten Spannung von $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ dauerte der Transfer von 20 bis 30 kDa großen Proteinen 25 min.

Blotpuffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,3
 192 mM Glycin
 20% (v/v) Methanol

2.12 Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde diese folgendermaßen behandelt:

Blockieren: 1 h, PBS/0,05% Tween/1% (w/v) Magermilchpulver
Primärantikörper. 1 h, GCAP1-Antikörper 1:5000 in PBS/0,05% Tween
Waschen: 1 x 15 min, 2 x 5 min in PBS/0,05% Tween
Sekundärantikörper: 1 h, Anti-Kaninchen-IgG mit gekoppelter Meerrettichperoxidase aus
 Esel, 1:10000 in PBS/0,05% Tween/0,1% Milchpulver
Waschen: 1 x 15 min, 2 x 5 min in PBS

Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mit dem ECL-System von Amersham. Die ECL-Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, der Blot darin 1 min lang inkubiert und dann mit einem Autoradiographie-Film (Hyperfilm) 10-60 sec lang exponiert. Die Meerrettichperoxidase katalysierte in Anwesenheit von H_2O_2 die Oxidation von Luminol. Bei dieser Chemilumineszenzreaktion lag die maximale Lichtemission bei 428 nm und schwärzte daher an den entsprechenden Stellen den Film.

2.13 Amidoschwarzfärbung von Blotmembranen

Mit dieser Färbemethode konnten Proteine, deren Menge mindestens 500 ng betrug, auf einer Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht werden. Die Membran wurde 5 bis 10 min lang gefärbt und der Hintergrund anschließend durch mehrfachen Wechsel der Entfärbelösung entfärbt. Nach Waschen in Wasser wurde der Blot an der Luft getrocknet.

Färbelösung:

0,1% (w/v) Amidoschwarz
25% (v/v) Methanol
5% Essigsäure

Entfärbelösung:

90% (v/v) Methanol
2% (v/v) Essigsäure

2.14 Immunhistochemie

Augen von ausgewachsenen Rindern wurden vom lokalen Schlachthof bezogen. Die Augen wurden mit einem umrundenden Schnitt geöffnet und der vordere Pol und der Glaskörper wurden entfernt. Die Retina wurde im hinteren Augenbecher in 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 1-2 h lang immersionsfixiert. Die Retinen wurden anschließend freipräpariert, in Phosphatpuffer gewaschen, über Nacht mit 30% Sucrose in Phosphatpuffer infiltriert und in Gefriermedium (OCT-Medium, Reichert-Jung) eingefroren. Vertikale Schnitte, d.h. senkrecht zur retinalen Schicht, mit einer Dicke von 16 µm wurden in einem Kryostaten geschnitten und auf gelatinisierte Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden folgendermaßen behandelt:

- Blockieren:** 1 h, 10% normalem Ziegenserum/0,5% Triton-X-100 in Phosphat-Puffer
- Primärantikörper:** über Nacht, 1:600 in 3% normalem Ziegenserum/0,5% Triton-X-100/0,02% Natriumazid in Phosphatpuffer
- Waschen:** mehrfach mit Phosphatpuffer spülen
- Sekundärantikörper:** Anti-Kaninchen Carboxymethylindocyanin(cy3)-Konjugat (aus Ziege; Dianova) 1:1000 in 1% BSA, 0,5% Triton-X-100 in Phosphatpuffer
- Waschen:** mehrfach mit Phosphatpuffer spülen

Anschließend wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt und unter Epifluoreszenz untersucht.

2.15 Messung der retGC-Aktivität

Die Aktivität der retGC wurde anhand der Bildung von cGMP gemessen. Proteinproben, die auf retGC-stimulierende Aktivität getestet werden sollten, wurden zusammen mit 2x gewaschenen ROS-Membranen und GC-Puffer bei verschiedenen freien Calcium-Konzentrationen (2.17) für 5 oder 10 min bei 30°C in einem Gesamtvolumen von 50 µl inkubiert. Die Inkubation wurde durch die Zugabe von 50 µl 100 mM EDTA (eiskalt) und anschließendes 5-minütiges Kochen abgestoppt. Der GC-Assay wurde unter sehr schwachem Rotlicht durchgeführt.

Gewaschene ROS-Membranen wurden hergestellt, indem ROS 2 x 5-fach mit 5 mM Tris-HCl pH 8,0 verdünnt und dann zentrifugiert wurden (Beckman-Zentrifuge TL 100, Rotor TLA 45, 40000 UpM, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in der Hälfte des ursprünglichen Volumens in 500 mM KCl, 20 mM NaCl, 50 mM Hepes-KOH pH 7,4, 1 mM DTT resuspendiert. Diese Kalium-Konzentration war durch eine Versuchsreihe mit verschiedenen Kalium-Konzentrationen ermittelt worden.

Der cGMP-Gehalt der Ansätze konnte nach Auftrennung der Nukleotide mit einer reversed phase HPLC-Säule (250 x 4 mm, Hibar Lichrospher 100 RP 18, 5 µm, E. Merck, Darmstadt) bestimmt werden. Die Auftrennung erfolgte mit einem Methanol-Gradienten (0-60%) in 5 mM KH₂PO₄ pH 5,0.

Endkonzentration im Reaktionsansatz		
GC-Puffer:	100 mM MOPS pH 7,1	40 mM
	140 mM KCl	56 mM
	20 mM NaCl	8 mM
	25 mM MgCl ₂	10 mM
	5 mM GTP	2 mM
	1,1 mM Zaprinast (PDE-Inhibitor)	440 µM

2.16 Rekonstitutionsexperimente mit Okadasäure

Ganze ROS wurden mit Okadasäure (1 µM) in An- und Abwesenheit von ATP (100 µM) 30 min auf Eis inkubiert. Die ROS wurden dann zweimal gewaschen und resuspendiert wie oben beschrieben. Die Überstände wurden auf 100 µl eingengt, auf 50 mM NaCl eingestellt und vier

Minuten bei 95°C inkubiert, um die PDE zu inaktivieren. Die denaturierten Proteine wurden sedimentiert (Beckman-Zentrifuge TL 100, Rotor TLA 45, 40000 UpM, 15 min , 4°C) und die Überstände wurden dann mit standardmäßig behandelten Membranen rekonstituiert.

2.17 Calcium-Puffer

Die Berechnungen der freien Calcium-Konzentrationen erfolgten mit einem Calcium-Puffer-Programm (Fabiato, 1988), bei dem Konstanten von Martell und Smith (1974) verwendet wurden. Mit den Stocklösungen 10 mM Calcium bzw. 10 mM EGTA wurden folgende Ca^{2+} /EGTA-Verhältnisse eingestellt:

Ca^{2+} /EGTA	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ im GC-Assay	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ in der SDS-Probe
1,1	$150 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$0,17 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
1,0	$11 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$1,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
0,9	$1,53 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$112 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,85	-	$73 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,825	-	$61 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,8	$706 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$52 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,775	-	$45 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,75	-	$39 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,7	$425 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$31 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,6	-	$20 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,5	$172 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$13 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,4	$122 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$9 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,3	$79 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$6 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,2	$46 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
0,1	$20 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
- Ca^{2+}	$1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	$68 \cdot 10^{-12} \text{ M}$

2.18 Membran-Bindungsstudien

Die Bindung von GCAP1 an die ROS-Membranen wurde untersucht, indem ROS mit den unter 2.17 beschriebenen Calcium-Puffern auf unterschiedliche freie Calcium-Konzentrationen eingestellt und nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis zweimal mit 1x PBS gewaschen wurden (1:5-Verdünnung, Beckman-Zentrifuge TL 100, Rotor TLA 45, 40000 UpM, 15 min , 4°C). Die Überstände und Membranen wurden nach einem Western-Blot mit dem GCAP1-Antikörper analysiert.

2.19 ⁴⁵Calcium-Autoradiographie

Die Durchführung der ⁴⁵Calcium-Autoradiographie erfolgte nach Schmitz (1994).

3.0 ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung und Reinigung von GCAP1

3.1.1 Herstellung eines Lichtextraktes

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung von GCAP1 dienten ROS-Suspensionen mit einer Rhodopsinkonzentration zwischen 8 und 12 mg · ml⁻¹. Durch eine 15-minütige Belichtung der ROS-Suspension, die auf 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 3 mM ATP und 1 mM DTT eingestellt worden war, konnten ca. 35% der löslichen Proteine an die Membran gebunden werden (Kühn, 1980). Durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen wurde dann ein als Lichtextrakt bezeichneter klarer Überstand hergestellt, in dem sich die nicht gebundenen löslichen Proteine befanden. Im Gel (Abb. 3.1 c) sind sechs Hauptproteine bei 92, 57, 45, 40, 38 und 26 kDa zu erkennen. Der Lichtextrakt wurde anschließend 11,5-fach konzentriert.

Dieser Extrakt enthielt Guanylatcyclase-stimulierende Aktivität und wurde im Folgenden über eine Gelfiltrationschromatographie nach Molekulargewicht weiter aufgetrennt.

3.1.2 Gelfiltrationschromatographie

Nach Auftrennung des konzentrierten Lichtextraktes durch die Gelfiltrationschromatographie (Abb. 3.1) wurden die einzelnen Fraktionen auf Guanylatzyklase-stimulierende Aktivität hin durchgetestet. Die Aktivität eluierte bei einem Elutionsvolumen zwischen 26 und 36 ml. Das Hauptprotein (ca. 80%) dieser Fraktion war das Calcium-Bindungsprotein Recoverin, welches ursprünglich für den Aktivator der retGC gehalten worden war (Dizhoor et al., 1991; Lambrecht & Koch, 1991a). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und über eine MonoQ-Anionenaustauschchromatographie weiter aufgetrennt.

3.1.3 MonoQ-Anionenaustauschchromatographie

Bei einer NaCl-Konzentration von 50 mM konnten Recoverin und eine Reihe weiterer Proteine an die MonoQ-Säule gebunden werden. Diese Proteine wurden durch die Erhöhung der NaCl-Konzentration in einem kontinuierlichen Gradienten eluiert (Abb. 3.2). Dabei wurde Recoverin

von einer Proteinprobe getrennt, die Guanylatzyklase-stimulierende Aktivität zeigte. Während Recoverin bei einer Salzkonzentration von 110 bis 135 mM eluierte, befand sich die Aktivität in Fraktionen bei ca. 400 mM NaCl. Eine SDS-PAGE-Analyse ergab, daß diese Fraktionen zu >90% ein 20,5 kDa schweres Protein, das als GCAP1 identifiziert werden konnte, enthielten. Aus einer ROS-Menge mit einem Rhodopsingehalt von 124 mg konnten ca. 15 µg GCAP1 gereinigt werden. Dies entspricht ca. 0,21 mMol GCAP1 pro Mol Rhodopsin bzw. einem Verhältnis von 1:4750.

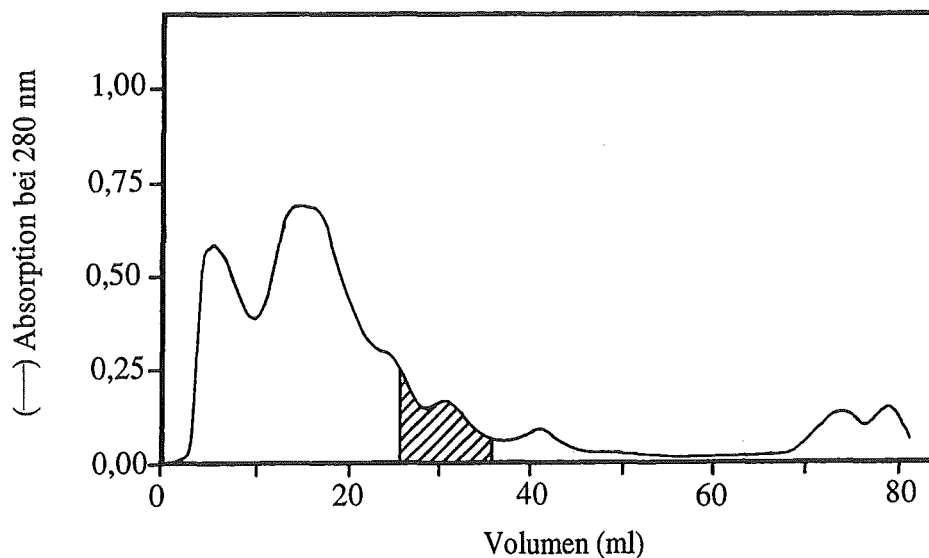


Abb. 3.1: Chromatogramm der Gelfiltration

Ein cytoplasmatischer Extrakt aus ROS ('Lichtextrakt') wurde durch Ultrafiltration (Centricon 10) auf 1,4 ml eingengt und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (Superdex 75 16/60). Die Chromatographie wurde mit einer Flußrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ durchgeführt. Die Fraktionen mit retGC-stimulierender Aktivität (schraffierter Bereich im Elutionsprofil zwischen 26-36 ml) wurden zusammengefaßt und auf eine MonoQ HR5/5 Säule aufgetragen.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtmenge Protein (mg)	Proteinkonzentration ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
ROS	12 ± 0	$124,1 \pm 2,9$	$10,3 \pm 0,2$
Lichtextrakt	16 ± 0	$24,1 \pm 3,0$	$1,5 \pm 0,2$
Gelfiltrationsfraktionen 14-18 (vereinigt)	10 ± 0	$1,18 \pm 0,2$	$0,118 \pm 0,018$
MonoQ-Fraktionen 30-31 (vereinigt)	1 ± 0	$0,0155 \pm 0,002$	$0,0155 \pm 0,002$

Tabelle 1: Reinigung von GCAP1 aus ROS

In Tabelle 1 sind die Durchschnittswerte von vier Reinigungen dieser Art aufgeführt. Die Rhodopsinkonzentration wurde nach deGrip (deGrip et al., 1972) bestimmt. Die Proteinkonzentrationen der anderen Reinigungsschritte wurden nach Bradford (2.8) bestimmt.

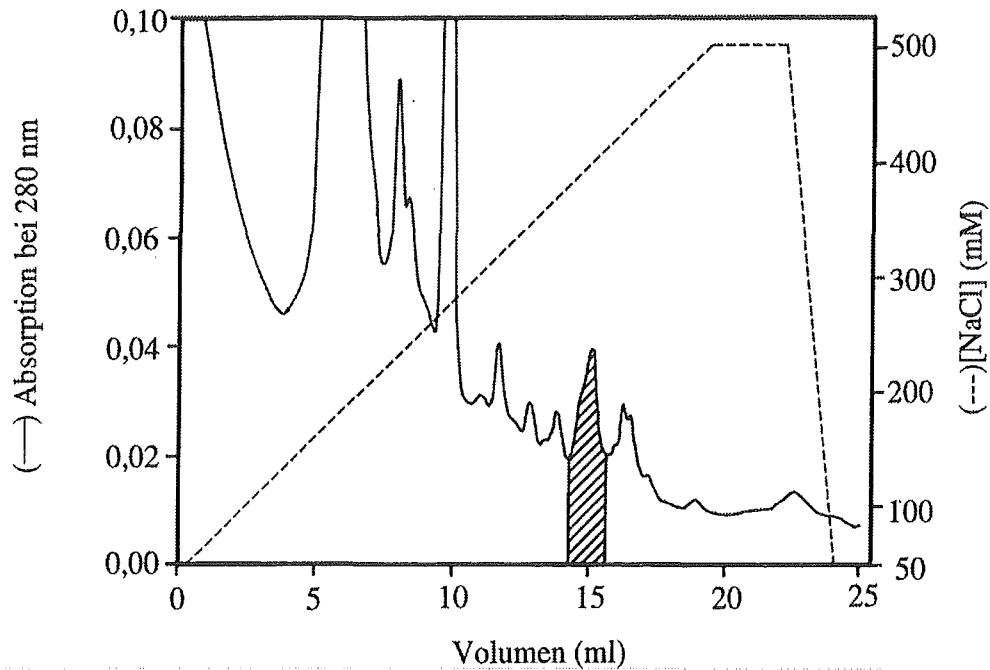


Abb. 3.2: Chromatogramm der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie

Die gebundenen Proteine wurden durch einen kontinuierlichen NaCl-Gradienten eluiert. GCAP1 eluierte bei einer NaCl-Konzentration von ca. 400 mM nach 14,5-15,5 ml von der Säule (schraffierter Bereich).

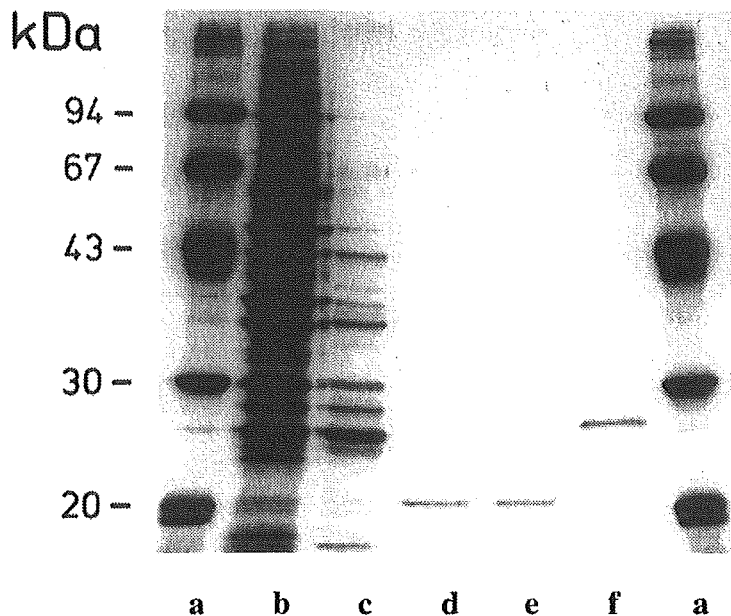


Abb. 3.3: Reinigungsschritte und Calcium-abhängige Verschiebung von GCAP1 im SDS-Gel

a: Low molecular weight Standard **b:** Lichtextrakt (18 µg) **c:** Gelfiltrationsfraktionen 14-18 (vereinigt; 1,6 µg) **d:** gereinigtes GCAP1 nach der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie (0,2 µg); Probe aus dem schraffierten Bereich des Elutionsprofils aus Abb. 3.2 **e:** Laufverhalten von GCAP1 in Anwesenheit von 2 mM Ca²⁺ **f:** Laufverhalten von GCAP1 in Anwesenheit von 2 mM EGTA. Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt.

3.2 Calciumbindung von GCAP1

3.2.1 Calcium-abhängige Verschiebung im SDS-Gel

Calcium-Bindungsproteine können manchmal über eine Calcium-abhängige Verschiebung im SDS-Gel identifiziert werden. GCAP1 zeigte eine deutliche Verschiebung: Bei einer Komplexbildung der in der Probe enthaltenen Ca^{2+} -Ionen mit EGTA lief dieses Protein im SDS-Gel bei 25 kDa (Abb. 3.3 e/f). Dabei war es nicht notwendig, das gesamte Gel jeweils auf Calcium- bzw. EGTA-Bedingungen einzustellen, sondern lediglich die jeweilige Probe.

3.2.2 Nachweis der Calcium-Bindung mit ^{45}Ca Calcium

Der Nachweis der Calcium-Bindung mit ^{45}Ca Calcium wurde von Dipl.-Biol. Gabriele Schmitz durchgeführt. Nach Inkubation einer GCAP1-haltigen Probe mit radioaktiv markiertem Calcium zeigte eine Autoradiographie, daß es sich bei GCAP1 um ein Calcium-Bindungsprotein handelt (ohne Abbildung).

3.3 Immunologische Untersuchungen zur Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse

Der Verwandtschaftsgrad der Calcium-Bindungsproteine GCAP1, Recoverin, VILIP, Frequenin, Centrin und Calmodulin (aus Schweinehirn) wurde untersucht. Bei VILIP und Frequenin handelte es sich um rekombinante Proteine. Die Ähnlichkeit zwischen den Proteinen wurde durch Kreuzreaktion der Antikörper gegen Recoverin, VILIP und Centrin mit den Proteinen untersucht. Der Anti-GCAP1-Antikörper stand zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht zur Verfügung. Die Verdünnung des Erst-Antikörpers betrug 1:1000, die des Zweit-Antikörpers 1:5000. Es wurden jeweils 100 ng Protein eingesetzt.

GCAP1 zeigte mit keinem der drei Antikörper eine Kreuzreaktion (ohne Abbildung). Lediglich Recoverin und Frequenin zeigten eine Kreuzreaktion mit dem VILIP-Antikörper. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Grad der Verwandtschaft überein.

3.4 Bestimmung der retGC-Aktivität

3.4.1 Basalaktivität der gewaschenen Membranen

Die Aktivität der retGC wurde jeweils an gewaschenen ROS-Membranen gemessen. Diese Membranen wurden zweimal mit hypotonischem Puffer gewaschen. Sie zeigten eine basale Aktivität der retGC, die etwa $2\text{--}3 \text{ nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Rhodopsin betrug. Diese Basalaktivität zeigte noch eine schwache Calcium-Abhängigkeit (Abb. 3.4 a): Die retGC-Aktivität bei einer niedrigen freien Calcium-Konzentration (1 nM) war gegenüber der Aktivität bei einer hohen freien Calcium-Konzentration (ca. 4 μM) um etwa 20% erhöht. Die schwache Calcium-Abhängigkeit war vermutlich darauf zurückzuführen, daß selbst nach sechsmaligem Waschen noch Reste von GCAP1 an den Membranen detektiert werden konnten (Abb. 3.5). Da die beiden ersten Waschschrte den größten Effekt zeigten, wurden die Membranen für Rekonstitutionsexperimente standardmäßig zweimal gewaschen. Die basale Aktivität der Membranen nahm durch vermehrtes Waschen leicht ab, was entweder auf eine Verschlechterung des Zustandes der Membranen oder möglicherweise auf das Wegwaschen eines weiteren, jedoch unbekannten Faktors zurückzuführen war.

Von Recoverin und Hippocalcin, GCAP1-verwandten Proteinen, ist eine Calcium-abhängige Membranbindung bekannt (4.5). Membran-Bindungsstudien, bei denen versucht wurde, GCAP1 mit PBS bei hohen und niedrigen Calcium-Konzentrationen von den ROS-Membranen zu extrahieren, brachten kein eindeutiges Ergebnis (ohne Abbildung).

3.4.2 Einstellung der optimalen Kalium-Konzentration für die Rekonstitutionsexperimente

Der Puffer, in dem die Membranen ursprünglich für die Rekonstitutionsexperimente resuspendiert wurden, enthielt 60 mM KCl. Da in Anbetracht der Bedingungen der retGC-Reinigung (Koch, 1991) eine hohe Kalium-Konzentration für die Stabilität und Aktivität der retGC vorteilhaft zu sein schien, wurden die Membranen in Puffern mit verschiedenen Kalium-Konzentrationen resuspendiert und mit retGC-aktivierenden Fraktionen rekonstituiert (ohne Abbildung). Ein Resuspendierungs-Puffer mit einer Kalium-Konzentration von 500 mM erwies sich als optimal. Sowohl bei zwei- als auch bei viermal gewaschenen Membranen war die retGC-Aktivität bei der höheren Ionenkonzentration um mehr als 100% erhöht. Eine direkte Stimulation der retGC durch K^+ -Ionen konnte ausgeschlossen werden, da sich die Aktivität nur bei niedrigen,

nicht aber bei hohen Calcium-Konzentrationen deutlich erhöhte. Da das Membranpellet in etwa dem gleichen Volumen Puffer resuspendiert wurde, lag die Kalium-Konzentration in den resuspendierten Membranen bei ca. 250 mM. Die resuspendierten Membranen machten 1/10 des Reaktionsansatzes aus, woraus eine Kalium-Konzentration von ca. 25 mM resultierte. Zusätzlich zu den 56 mM Kalium des GC-Puffers ergab sich somit eine Kalium-Konzentration von ca. 81 mM. Dieser Wert liegt noch deutlich unter der intrazellulären Kalium-Konzentration von ca. 150 mM.

3.5 Calcium-abhängige Aktivierung der retGC durch GCAP1

Die Fraktionen mit GCAP1 wurden auf ihre Fähigkeit, die retGC in Abhängigkeit von Calcium zu aktivieren, getestet: Bei einer Zugabe von GCAP1 erhöhte sich der bei niedrigen (<100 nM) Calcium-Konzentrationen gemessene Wert auf 5-7 nmol cGMP · min⁻¹ · mg⁻¹ Rhodopsin, während bei hohen Calcium-Konzentrationen der cGMP-Wert mit 1,5-2,5 nmol cGMP · min⁻¹ · mg⁻¹ Rhodopsin etwas unterhalb der Basalaktivität blieb (Abb. 3.4 b). Durch Zugabe von ATP (3.6) verdoppelten sich diese Werte und entsprachen damit den Werten, die in ganzen ROS gemessen werden (Koch & Stryer, 1988). Die Maximalwerte der retGC-Aktivierung wurden mit 23 nmol cGMP · min⁻¹ · mg⁻¹ Rhodopsin mit frisch gereinigtem GCAP1 bei einem molaren GCAP1: Rhodopsin-Verhältnis von ca. 1:270 gemessen (ohne Abbildung). Lag die GCAP1-Konzentration niedriger oder wurde GCAP1 zwischen Reinigung und Aktivitätstest eingefroren, sank die retGC-Aktivität.

Eine Analyse der retGC-Aktivierung durch GCAP1 in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration (Abb. 3.6) ergab einen ähnlichen Verlauf wie in ganzen ROS (3.10.3): Der EC₅₀-Wert von 100 nM befand sich in der gleichen Größenordnung wie ein Literatur-Wert für ganze ROS (EC₅₀ = 90 nM), während der Hillkoeffizient mit n = 2,3-2,5 deutlich niedriger lag (n = 3,9; Koch & Stryer, 1988). Insgesamt ließen die Parallelen zum nativen System darauf schließen, daß GCAP1 der Modulator ist, der die retGC in Abhängigkeit von Calcium reguliert.

Einen Hinweis auf die Stabilität von GCAP1 lieferten Rekonstitutionsexperimente mit nicht-fraktionierten Dunkelextrakten: Die Extrakte wurden zur Inaktivierung der PDE 4 min lang bei 95°C inkubiert, wobei die retGC-aktivierende Aktivität größtenteils erhalten blieb. Wurden die ROS, aus denen der Dunkelextrakt hergestellt wurde, mit 2 mM EGTA versetzt, so zeigte der resultierende Extrakt keine retGC-stimulierende Aktivität mehr (ohne Abbildung). Bei Einstellung einer hohen Calcium-Konzentration vor dem Kochen blieb die retGC-stimulierende Aktivität hingegen erhalten.

3.6 ATP-Abhängigkeit der retGC-Aktivierung

Bei einer Inkubation mit 100-125 μM ATP verdoppelte sich die retGC-Aktivität unabhängig von der Calcium-Konzentration und vom Zusatz von GCAP1. Die optimale ATP-Konzentration wurde in Anwesenheit von GCAP1 durch eine Titration der ATP-Konzentration ermittelt (Abb. 3.18): Maximale Aktivitäten der retGC wurden mit 14-18 $\text{nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Rhodopsin bei einer ATP-Konzentration zwischen 75-200 μM gemessen. Der stärkste Anstieg ist bereits bei einer Erhöhung der ATP-Konzentration von 0 auf 25 μM zu beobachten. Bei ATP-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ nahm die retGC-Aktivität wieder ab, vermutlich eine Folge der kompetitiven Inhibierung durch die hohen ATP-Konzentrationen.

Denkbar ist, daß ATP über eine Phosphorylierung von GCAP1 oder der retGC stimulierend auf den Reaktionsmechanismus wirkt. Um dies zu testen, wurde einigen Reaktionsansätzen Okadasäure zugesetzt, ein sehr potenter Inhibitor der Proteinphosphatasen 1 (PP1) und 2A (PP2A). PP1 und PP2A sind zwei der vier wichtigsten Serin-/Threonin-Phosphatasen im Cytosol von Säugerzellen (Cohen, 1989; Cohen & Cohen, 1989). Beide Phosphatasen sind bereits in ROS nachgewiesen worden (Fowles & Akhtar, 1989). PP2A wird bereits bei einer Okadasäure-Konzentration von 1 nM vollständig inhibiert während der IC_{50} für PP1 bei 10-15 nM liegt (Cohen et al., 1989). Bei Zusatz zum Inkubationsmedium steigert Okadasäure innerhalb von Minuten die Phosphorylierungsstufen von Proteinen um das 2,5-3fache in verschiedenen Zellsystemen (Bialojan & Takai, 1988; Haavik et al., 1989). Der Zusatz von 1 μM Okadasäure zu ganzen ROS zeigte weder in Ab- noch Anwesenheit von 100 μM ATP einen Einfluß auf die retGC. Dieses Ergebnis schließt jedoch eine Modulation der Reaktion durch einen Phosphorylierungsschritt nicht vollständig aus, da nicht alle Phosphatasen inhibiert werden.

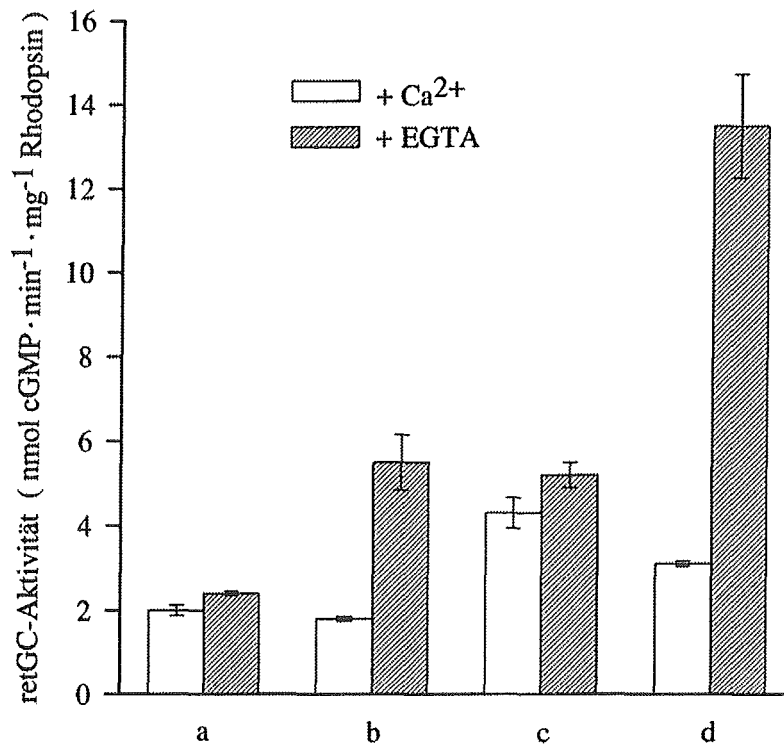


Abb. 3.4: Aktivierung der retGC in gewaschenen ROS-Membranen durch GCAP1

Die Ansätze enthielten jeweils 40 µg Rhodopsin. Die Inkubationen wurden bei hohen (8 µM, weiße Säulen) und niedrigen (1 nM, schraffierte Säulen) freien Calcium-Konzentrationen durchgeführt. Die gewaschenen Membranen zeigten nur eine basale retGC-Aktivität. Der Zusatz von gereinigtem GCAP1 stimulierte die retGC-Aktivität ca. dreifach. Der Zusatz von 100 µM ATP verstärkte die retGC-Aktivität unabhängig von der freien Calcium-Konzentration ungefähr zweifach. Der Zusatz von ATP und GCAP1 ergab eine ca. fünffache Verstärkung der Aktivierung. Die Daten sind die Durchschnittswerte von vier verschiedenen Messungen.

a: Basalaktivität der gewaschenen Membranen **b:** Aktivität der retGC bei Zusatz von GCAP1 (30 ng/Ansatz) **c:** Basalaktivität der gewaschenen Membranen bei 100 µM ATP **d:** Aktivität der retGC bei Zusatz von GCAP1 (30 ng/Ansatz) und 100 µM ATP

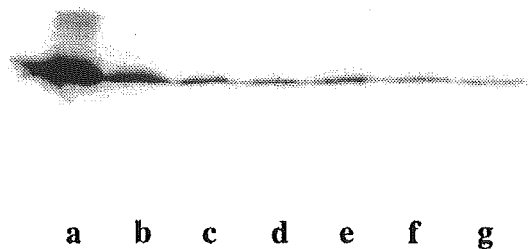


Abb. 3.5: Entfernung von GCAP1 von den Membranen durch mehrere Waschschr

itte
Durch Waschen der ROS (1:5 Verdünnung mit anschließendem Zentrifugationsschritt) wurden die cytoplasmatischen Proteine weitgehend extrahiert. Der größte Teil von GCAP1 wurde in den ersten beiden Waschschr

itten entfernt. Auch nach sechsmaligem Waschen verblieb noch ein Teil an den Membranen. Die Detektion erfolgte nach einem Western-Blot mit dem unter 3.11 beschriebenen Antikörper.

a: ganze ROS **b:** Membranen nach einem Waschschr

c-g: Membranen nach zwei bis sechs Waschschr

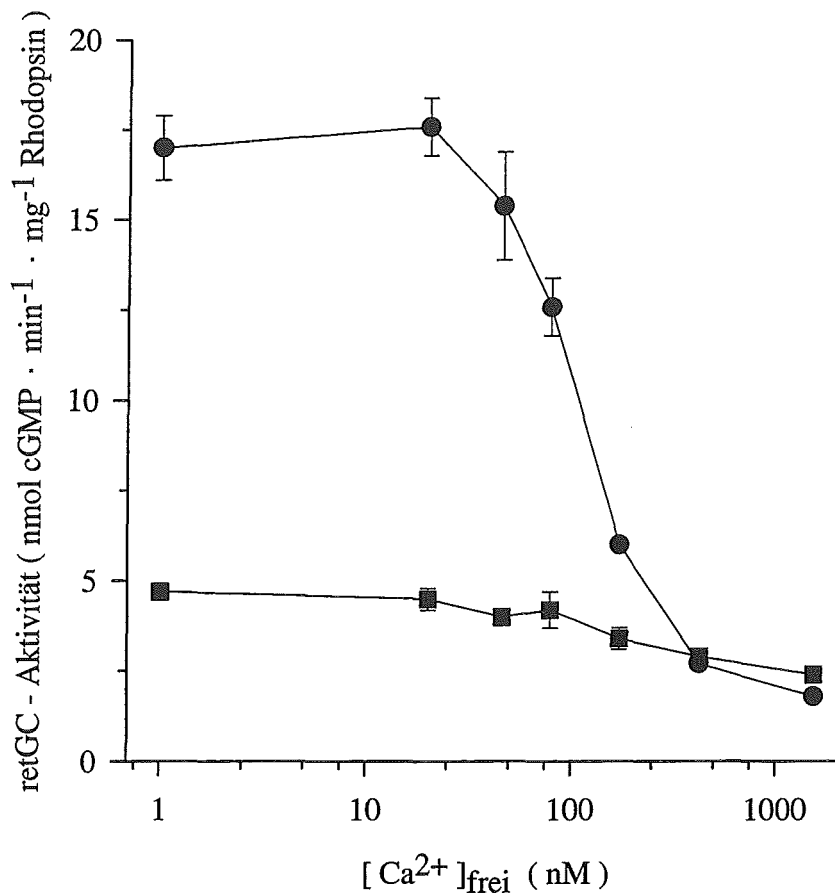


Abb. 3.6: Calcium-Abhängigkeit der Aktivierung der retGC durch GCAP1

GCAP1 wurde mit gewaschenen Membranen, die retGC enthielten, rekonstituiert. Das Verhältnis von gereinigtem GCAP1 zu Rhodopsin betrug 1:800. Alle Inkubationen erfolgten in Anwesenheit von 100 μM ATP. In der Kontrolle wurde kein GCAP1 zugesetzt. Die Daten sind die Durchschnittswerte von Triplets.

■ = Basalaktivität der gewaschenen Membranen; ● = Aktivität bei Zusatz von GCAP1

3.7 Klonierung von GCAP1

3.7.1 Partielle Sequenzierung von GCAP1

Die Sequenzierungsarbeiten an proteolytisch gewonnenen GCAP1-Peptiden wurden von Dr. Roland Kellner (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universität Mainz) durchgeführt. Zunächst wurde eine N-terminale Sequenzierung von GCAP1 versucht, die jedoch scheiterte. Der Grund hierfür lag höchstwahrscheinlich in einer N-terminalen Modifikation (kovalente Acylierung; 4.5) des nativen GCAP1. Daher wurden die angereicherten Banden meh-

rerer eindimensionaler SDS-Gele zusammengefaßt und mit Chymotrypsin verdaut. Die daraus resultierenden Fragmente wurden auf einer Reversed-Phase HPLC getrennt und fraktioniert. Eine Mikrosequenzierung von sieben Peptid-Fraktionen ergab die folgenden Resultate:

Peptid 1:	KKF
Peptid 2:	xxFMTECPSGQLTLY
Peptid 3:	MTECPSGQLTLY
Peptid 4:	EFRQF
Peptide 5/5a:	xFNKDG YIDFMEY
Peptid 6:	RLQNgEQDEEgAS

3.7.2 PCR auf Rinderretina-spezifischer cDNA

Die Peptide 2 und 5/5a eigneten sich sehr gut für die Synthese degenerierter Oligonukleotidsequenzen, da sie nur einen geringen Grad an Degeneration aufwiesen. Ausgehend von den Sequenzen dieser Peptide wurden die degenerierten Oligonucleotid-Primer #823 und #828 entworfen. Mit diesen beiden Primern wurde eine PCR auf Rinderretina-spezifischer, doppelsträngiger cDNA durchgeführt. Die PCR ergab eine Doppelbande bei ca. 160-200 bp, sowie zwei sehr schwache Banden zwischen 300 und 400 bp.

Die Aminosäure-Sequenzen der beiden Peptide stimmten weitgehend mit der EF-Hand 1 bzw. der EF-Hand 2 sämtlicher Recoverin-ähnlicher Proteine (1.9) überein. Daher wurde ein Fragment erwartet, das in der Größe dem Sequenzbereich vom Anfang der ersten bis zum Ende der zweiten EF-Hand (ca. 156 bp) entsprach (Abb. 3.7; da die erste EF-Hand bei GCAP1 degeneriert ist, ist sie hier mit EF-0 bezeichnet). Die beiden leichteren DNA-Fragmente (160-220 bp) wurden in einen mit EcoRV geschnittenen pBluescript SK(-)-Vektor kloniert. Zehn rekombinante Plasmide wurden präpariert und die Länge der Inserts durch Restriktionsanalyse mit HindIII und EcoRI bestimmt. Die Klone konnten nach den Restriktionsmustern zu fünf Gruppen zusammengefaßt werden und ein Klon jeder Gruppe wurde sequenziert. Unter den fünf verschiedenen Klonen befanden sich zwei Klone (2 und 4), die DNA-Fragmente mit den Sequenzen, die für die Peptide Nr. 2, 4 und 5/5a kodieren, enthalten.

3.7.3 Isolierung von cDNA-Molekülen

Aus der Plasmid-DNA von Klon 2 (3.7.2) wurde das Insert-Fragment mit Hind III und Eco RI ausgeschnitten, radioaktiv markiert und als Sonde benutzt, um über Hybridisierung eine Rinderretina-spezifische λ -ZAPII cDNA-Bank zu durchsuchen.

Ca. 700000 Phagen einer Rinderretina-spezifischen, NotI-gelinkerten cDNA-Bibliothek (Dr. Wolfgang Bönigk, IBI I) wurden ausplattiert. Filterabzüge der Platten (Dr. Heinz-Gerd Körschen, IBI I) wurden mit der Sonde hybridisiert (2.5.12.2). Es konnten ca. 300 positive Hybridisierungssignale detektiert werden. Hybridisierende Plaques wurden ausgestochen, vereinzelt und nochmals mit der Sonde hybridisiert. Phagen der vereinzelt, positiven Plaques wurden durch „in vivo Excision“ (2.5.1) in pBluescript SK(-)-Plasmide überführt.

Achtzehn rekombinante Plasmide wurden präpariert und durch Restriktionsanalyse mit SacI und EcoRI nach der Länge der Inserts in vier Gruppen aufgeteilt. Die Schnittstellen für SacI und EcoRI umrahmen die ursprüngliche NotI-Schnittstelle. Pro Gruppe wurde jeweils ein Klon ausgewählt und zusätzlich mit NotI restringiert (Klone 1,5,8,12). Dabei zeigte sich, daß in Klon 1 die NotI-Schnittstelle defekt war. Das Gel mit den Restriktionsanalysen wurde einem Southern-Blot unterzogen, wobei alle Klone ein positives Signal zeigten (Abb.3.8). Die Klone wurden sequenziert. Alle analysierten Klone sind im Bereich der kodierenden Region identisch und unterscheiden sich lediglich in der Länge der nicht-kodierenden Abschnitte. Die längste isolierte Sequenz (Klon 5) besteht aus 945 Basenpaaren und besitzt einen langen offenen Leserahmen (Abb. 3.8). Bis zum Start des offenen Leserahmens enthält die Sequenz einen 237 Nukleotide langen nicht-kodierenden 5'-Bereich. Das erste Startcodon dieses Leserahmens folgt einem Stopcodon, das ebenfalls in diesem Leserahmen liegt. Die im Folgenden verwendete Nukleotidnummerierung beginnt mit +1 bei der ersten Base dieses Startkodons. Von den fünf Nukleotiden vor diesem Kodon stimmen zwei mit der Konsensussequenz für die eukaryotische ribosomale Bindestelle (CCA/GCCATGG, Kozak 1984) überein. Ein TGA-Translations-Stopcodon erscheint im Leserahmen bei Position 616-618. Dem offenen Leserahmen von 618 Nukleotiden folgt die nicht-kodierende 3'-Region (90 Nukleotide). Ein typisches Polyadenylierungssignal, AATAAA bzw. ATTAAA (Proudfoot & Brownlee, 1976; Hagenbuchle et al. 1980; Jung et al. 1980) ist nicht vorhanden. Eine diesen Polyadenylierungssignalen ähnliche Sequenz, AATACT, befindet sich 15 Nukleotide (Position 688-693) vor dem Poly-dA-Bereich, der aus 28 Adeninresten besteht.

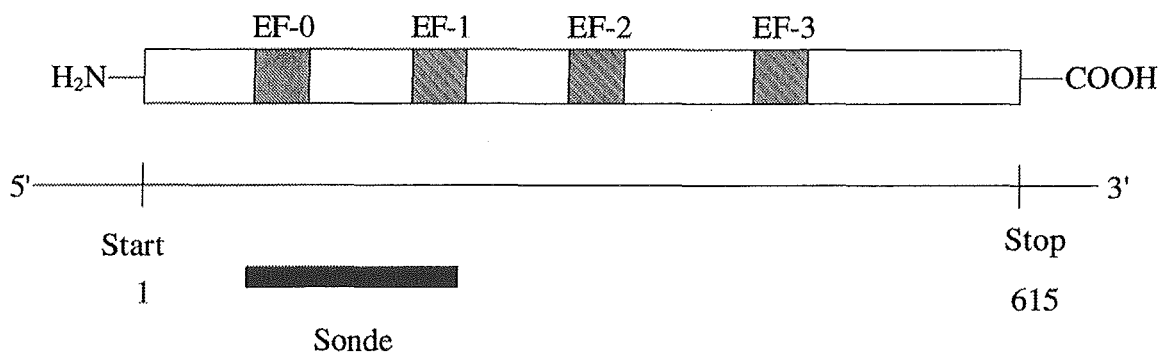


Abb. 3.7: Lage des als Sonde verwendeten PCR-Fragments (Nukleotide 73-227) innerhalb der cDNA und der Proteinstruktur von GCAP1

Die Nummerierung beginnt mit 1 beim ersten Nukleotid des Startkodons. Im oberen Teil ist die Proteinstruktur schematisch wiedergegeben. EF-0-3 bezeichnen die drei konventionellen (schraffiert) und die degenerierte EF-Hand (gerastert). Innerhalb der schematisch dargestellten cDNA sind der Beginn (Start) und das Ende (Stop) der kodierenden Region markiert. Das als Sonde verwendete PCR-Fragment ist als schwarzer Balken dargestellt.

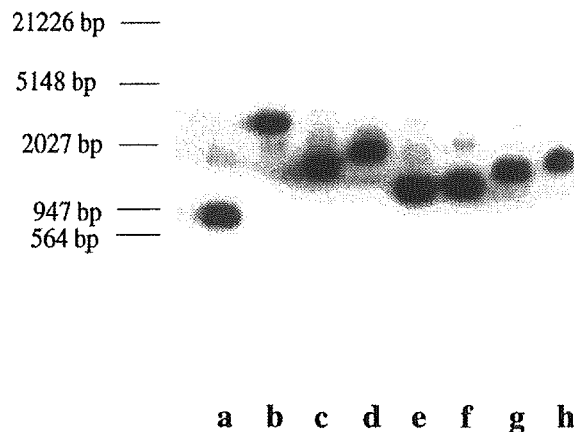


Abb. 3.8: Southern-Blot-Analyse der Klone 1, 5, 8 und 12

Die Klone 1, 5, 8, und 12 wurden mit SacI/EcoRV bzw. mit NotI verdaut und einer Elektrophorese unterzogen. Nach einem Southern-Blot (2.5.12) wurde die DNA mit der unter 3.7.3 beschriebenen Sonde hybridisiert. Alle vier Klone zeigten positive Signale.

a, b: Klon 1, **c, d:** Klon 5; **e, f:** Klon 8; **g, h:** Klon 12; **a, c, e, h:** Verdau mit SacI und EcoRV; **b, d, f, h:** Verdau mit NotI

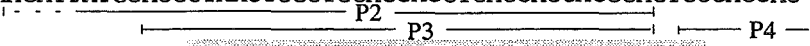
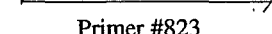
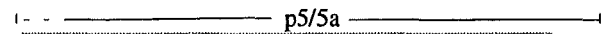
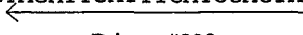
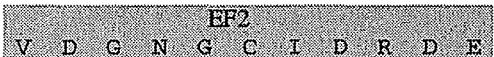
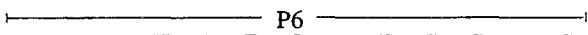
ACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGCCACAGCCCCCGTGACCTCCTCTCCTCTGCT	-181
TACCTCCTCTAGTCATTTCCCTGCGCTTTGGGATTTCAGGCCCTTCCTCGCTCAGATCTGG	-121
GGAAGCTCAGGCTTGTGAGCGAGGAGGGCCAGTGTAGGAAGCCCAGCCGCGCTGGTGTG	-61
GGGACCAGCGGTGAAAAGAACCGGTCCCCCTTGGGCATCAGCCTCCCGCAGGCCTGAGCG	-1
	
M G N I M D G K S V E E L S S T E C H Q	20
ATGGGGAACATTATGGACGGTAAGTCGGTGGAGGAGCTGAGCAGCACCGAGTGCCACCAG	60
	
W Y K K F M T E C P S G Q L T L Y E F R	40
TGGTACAAGAAGTTCATGACAGAGTGCCCTCCGGCCAGCTCACCTCTACGAGTCCGC	120
	
Q F F G L K N L S P W A S Q Y V E Q M F	60
CAGTTCTTCGGCCTCAAGAACCTGAGCCCGTGGGCCAGCCAGTACGTGGAGCAGATGTTT	180
	
E T F D F N K D G Y I D F M E Y V A A L	80
GAGACCTTTGACTTCAACAAAGACGGCTACATTGATTTCATGGAGTACGTGGCGGCTCTG	240
	
S L V L K G K V E Q K L R W Y F K L Y D	100
AGCCTGGTCCTCAAGGGGAAGGTGGAACAGAAGCTGCGTTGGTACTTCAAGCTCTACGAC	300
	
V D G N G C I D R D E L L T I I R A I R	120
GTGGACGGCAACGGATGCATCGACCGCGACGAGCTGCTACCATCATCCGGGCCATCCGA	360
A I N P C S D S T M T A E E F T D T V F	140
GCCATTAACCCCTGCAGCGACTCGACCATGACCGCCGAGGAGTTCACCGATACAGTGTTC	420
	
S K I D V N G D G E L S L E E F M E G V	160
TCCAAGATTGACGTCAATGGGGATGGGGAACCTCCCTAGAGGAGTTCATGGAGGGCGTC	480
Q K D Q M L L D T L T R S L D L T R I V	180
CAGAAGGACCAGATGCTCTTGGACACGCTGACCCGAAGCTTGGACCTTACCCGCATTGTG	540
	
R R L Q N G E Q D E E G A S G R E T E A	200
CGCAGGCTCCAGAATGGAGAGCAGGATGAGGAGGGGGCTAGCGGCAGGGAAACGGAGGCC	600
A E A D G	205
GCGGAGGCCGACGGCTGAGCTCACTGCCTACTCTTTCTGTACTGGGGAGGGTGTGTACGG	660
TGGTGCCTGCTGTTTCACTGTTGTTTTAATACTAGATAGAGTCTACTG	708

Abb. 3.9: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 5 von GCAP1

Die Aminosäuren sind mit ihren Ein-Buchstabensymbolen bezeichnet. Das Symbol am N-terminalen Glycin steht für eine Acylgruppe (4.5). Die Sequenzen der proteolytisch erhaltenen Peptide sind durch schwarze Linien markiert. Die Primer #823 und #828 sind die von den Peptiden abgeleiteten, degenerierten Oligonukleotide. Die drei konventionellen EF-Hand-Bindungsstellen sind schattiert. Die degenerierte EF-Hand (EF-0) ist in einem helleren Grauton schattiert.

3.8 Die Primärstruktur von GCAP1

Die abgeleitete Polypeptid-Sequenz besteht aus 205 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 23510 Dalton (Abb. 3.9). Alle mikrosequenzierten Peptide wurden in diesem vollständigen Klon gefunden. Der mit dem PC/Gene Programm CHARGPRO berechnete isoelektrische Punkt beträgt 4.11. Mögliche Modifikationen von Aminosäuren sowie mögliche spezielle Domänen wurden mit dem PC/Gene Programm PROSITE (Bairoch,1992) ermittelt: In der Sequenz befinden sich drei kanonische EF-Hände (Aminosäuren 64-75, 100-111, 144-155) und eine nicht-kanonische EF-Hand (Aminosäuren 27-38; durch visuelle Inspektion ermittelt). Die Aminosäuresequenz enthält eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C (AS 194) und sieben für die Caseinkinase II (AS 9, 14, 35, 131, 141, 152, 194). Die Aminosäuren 2-9 bilden das ATP/GTP-Bindungsstellen-Motiv A (P-Schleife). An den Positionen 34-49 findet sich das 'Greek key'-Motiv.

Über Massenspektroskopie am nativen Protein konnte von Palczewski et al. (1994) gezeigt werden, daß GCAP1 am N-terminalen Glycin heterogen mit den Fettsäuren C14:0 (Myristinsäure), C14:1 (Myristoleinsäure), C14:2 (nach Geigy,1969, kein Trivialname bekannt) und C12:0 (Laurinsäure) acyliert ist. Diese Fettsäuren werden von der Myristoyltransferase übertragen. Dieses Enzym acyliert das N-terminale Glycin, wobei es keine regelrechte Konsensussequenz benötigt: Studien mit Peptiden zeigten, daß sich Peptide, die hinter dem N-terminalen Glycin ein Asparagin, Glutamin, Serin, Valin oder Leucin besitzen, gut als Substrate eignen (Towler et al., 1987). Diese Voraussetzung ist bei GCAP1, bei dem hinter Gly² ein Asparagin folgt, gegeben.

3.9 Expression der rekombinanten GCAP1-Formen

3.9.1 Herstellung von Expressionsklonen

Um GCAP1 heterolog zu exprimieren, wurden zwei unterschiedliche Subklone (pG-GCAPX und pG-GCAPT) konstruiert, wobei pGEX-2T (Pharmacia) als Vektor benutzt wurde. Die entsprechenden Proteine wurden als GCAPX und GCAPT bezeichnet. Die cDNA-Fragmente wurden unter Erhalt des Leserasters in den 3'-terminalen Bereich des Gens für die Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* in den Vektor pGEX-2T kloniert. Die Expression beider GCAP1-Moleküle erfolgte als GST-Fusionsprotein in *E. coli*.

Die für GCAP1 kodierenden DNA-Fragmente wurden über die BamHI (GCAPX) bzw. BamHI/EcoRI-Schnittstelle (GCAPT) in den pGEX-2T-Vektor kloniert. Da in der entsprechenden cDNA-Sequenz diese Restriktionsschnittstellen nicht vorhanden sind, wurden sie über die PCR-Technik eingefügt. Der kodierende Bereich der GCAP1-cDNA wurde mit den Primer-Paaren #979 und #929 bzw. #1257 und #1261 ausgehend von cDNA-Klon 5 durch PCR vervielfältigt. Der Primer #979 führt in Kombination mit dem pGEX-2T-Vektor eine Thrombin-Schnittstelle sechs Aminosäuren stromaufwärts des Start-Methionins sowie eine Faktor Xa-Schnittstelle direkt vor dem Start-Methionin ein. Der Primer #929 enthält das Stopcodon. Diese beiden Primer wurden benutzt, um GCAPX zu konstruieren. Da es nicht gelang, das entsprechende Fusionsprotein mit Faktor Xa zu spalten, wurde eine Version ohne die Faktor Xa-Schnittstelle geschaffen: Mit den Primern #1257 und #1261 wurde pG-GCAPT konstruiert. Der Primer #1257 fügt ein Glycin und ein Serin stromaufwärts des Start-Methionins ein, so daß in Kombination mit der Sequenz der GST eine Thrombin-Schnittstelle eingefügt wird. Die PCR-Produkte wurden mit BamHI bzw. BamHI/EcoRI verdaut und in gleichermaßen verdaute pGEX-2T-DNA subkloniert.

Abb. 3.10: Konstruktion der Expressionsklone GCAPX und GCAPT

3.9.2 Optimierung der Expressionsbedingungen

Zunächst wurde das rekombinante GCAP1 in *E.coli* XL1-Blue-Zellen bei 37°C exprimiert. Bei der Reinigung stellte sich heraus, daß die Expressionsrate gering war und ein Großteil des exprimierten Proteins in unlöslichen Partikeln, den sogenannten 'Inclusion bodies', vorlag. Da ein Bakterien-Wachstum bei niedrigeren Temperaturen in manchen Fällen einer Inclusion-Body-Bildung entgegenwirkt (Schein & Noteborn, 1988), wurde GCAP1 im *E.coli* K12-Derivat GI698 bei 25-27°C exprimiert. Der Stamm GI698 wächst bei niedrigen Temperaturen erheblich besser als der XL1-Blue-Stamm. Die Menge an gereinigtem GCAP1 konnte dadurch ca. verzwanzigfacht werden. Für DNA-Präparationen wurden jedoch weiterhin XL1-Blue-Zellen verwendet, da sich aus GI698-Zellen nur sehr wenig DNA isolieren ließ.

Diverse Versuche, GCAP1 direkt in *E. coli* oder gemeinsam mit der Myristoyltransferase aus *S. cerevisiae* in *E. coli* zu exprimieren, brachten kein positives Ergebnis (ohne nähere Beschreibung und Abbildung): GCAP1 wurde zwar exprimiert, lag jedoch in so geringen Mengen vor, daß es sich nur über einen Western-Blot detektieren ließ. Möglicherweise wurde es sofort nach der Synthese als Fremdprotein erkannt und wieder abgebaut.

3.9.3 Affinitätsreinigung über Glutathion-Agarose

Das aus den Expressionskulturen hergestellte Bakterienlysat (2.5.1) wurde mit Glutathion-Agarose inkubiert, wobei das Fusionsprotein über die hochaffine Wechselwirkung zwischen der Glutathion-S-Transferase und Glutathion an die Agarose gekoppelt wurde. Nach mehreren Waschgängen wurde GCAPX/T dann mit Thrombin von der Agarose herunter verdaut, während die Glutathion-S-Transferase weiterhin an die Agarose gekoppelt blieb.

3.9.4 MonoQ-Anionenaustauschchromatographie

Die Fraktion, die nach dem Thrombin-Verdau von der Agarose eluierte, wurde weiter über eine MonoQ-Anionenaustauschchromatographie gereinigt (Abb. 3.11/12). Dieser Schritt diente hauptsächlich der Entfernung des Thrombins. Die Ausbeuten waren sehr unterschiedlich, je nach Zeitpunkt und Dauer der Expression. Die Menge an gereinigtem GCAPT lag deutlich niedriger

als die von GCAPX. Der Maximalwert lag für GCAPX bei 4,2 mg/l Kulturvolumen, für GCAPT hingegen nur bei 650 µg/l Kulturvolumen. Es scheint sich jedoch um keinen prinzipiellen Unterschied zu handeln, da in nachfolgenden Reinigungen mit pG-GCAPT höhere Werte erzielt wurden (persönliche Kommunikation, Christian Lange).

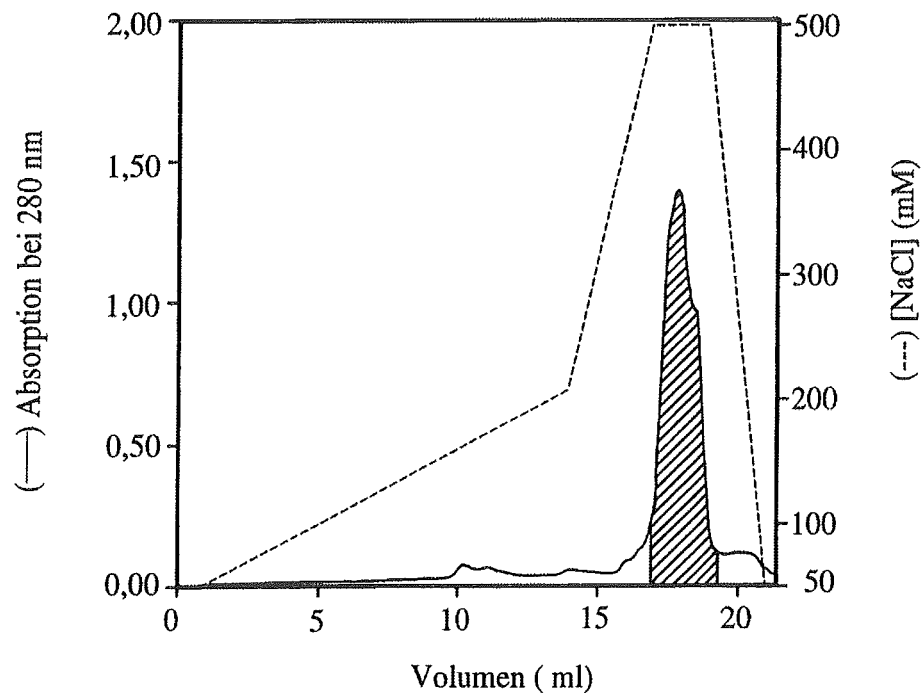


Abb. 3.11: Chromatogramm der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie

Die gebundenen Proteine wurden durch einen zweistufigen NaCl-Gradienten eluiert. Das rekombinante GCAP1 eluierte bei einer NaCl-Konzentration von ca. 400 mM nach 17-19 ml von der Säule (schraffierter Bereich).

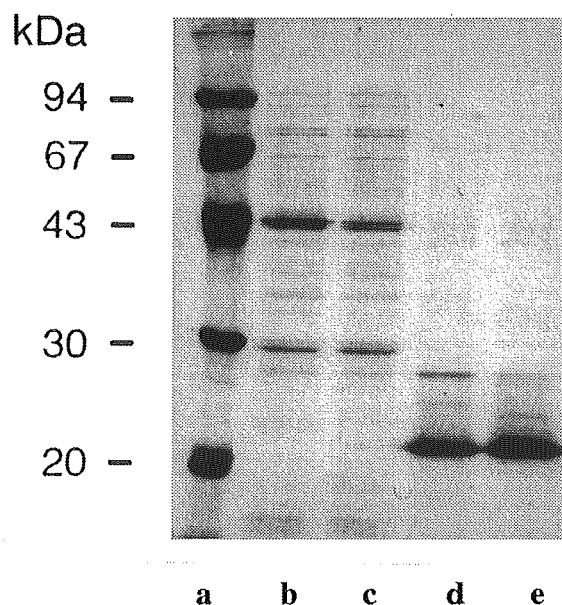


Abb. 3.12: Reinigung des rekombinanten GCAPX

Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt. **a:** Low molecular weight-Standard **b:** Bakterien-Lysat **c:** ungebundene Fraktion nach Glutathion-Agarose-Chromatographie **d:** Eluat nach Thrombin-Verdau **e:** gereinigtes rekombinantes GCAPX nach MonoQ-Chromatographie

Tabelle 2 faßt die Durchschnittswerte von sechs GCAPX und drei GCAPT-Reinigungen zusammen:

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtmenge Protein (mg)	Proteinkonzentration (mg · ml ⁻¹)
Zellysat	55,5 ± 0 (55,5 ± 0)	45,6 ± 22,4 (21,2 ± 8,4)	0,82 ± 0,4 (0,38 ± 0,15)
Eluat nach Throm- binspaltung	5,2 ± 0,33 (5,0 ± 0)	1,6 ± 0,9 (0,45 ± 0,07)	0,31 ± 0,17 (0,09 ± 0,01)
MonoQ- Anionenaustausch- chromatographie Fraktionen 34-38 (vereinigt)	2,5 ± 0 (2,2 ± 0,3)	1,1 ± 0,8 (0,26 ± 0,11)	0,42 ± 0,36 (0,12 ± 0,05)

Tabelle 2: Reinigung des rekombinanten GCAPX bzw. GCAPT (in Klammern)

3.10 Eigenschaften des rekombinanten GCAP1 im Vergleich zum nativen GCAP1

3.10.1 Calcium-abhängige Verschiebung des nativen und des rekombinanten GCAP1 im SDS-Gel

Die Calcium-abhängige Verschiebung des nativen Proteins und der beiden rekombinanten GCAP1-Formen war mit ca. 5 kDa in allen drei Fällen gleich groß. Die beiden rekombinanten Formen GCAPT und GCAPX liefen sowohl in Gegenwart von Calcium als auch von EGTA etwas höher als das native Protein (ca. 1 kDa). Möglicherweise ist dies auf die fehlende Acylierung der rekombinanten Formen zurückzuführen. Zwischen den beiden rekombinanten Formen war ein weiterer, noch kleinerer Mobilitätsunterschied festzustellen: GCAPX, das vier Aminosäuren länger ist als GCAPT, lief etwa 0,5-1 kDa höher als GCAPT.

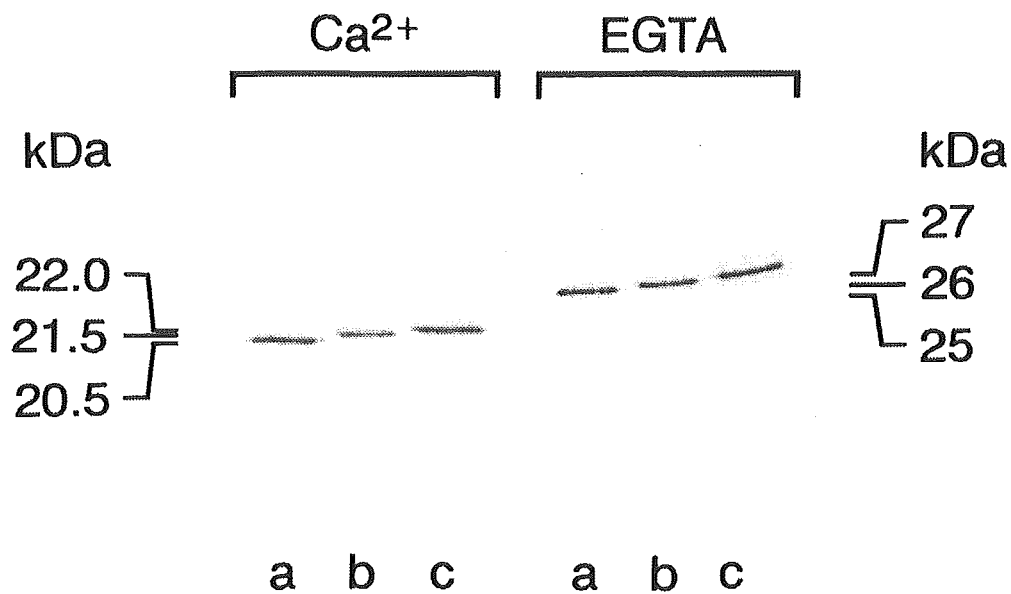


Abb. 3.13: Calcium-abhängige Verschiebung der drei GCAP1-Formen im SDS-Gel

Die Calcium-abhängige Verschiebung ist in allen drei Fällen gleich groß. Untereinander sind die drei Formen leicht gegeneinander verschoben, was zum Einen vermutlich auf die fehlende Acylierung der rekombinanten Formen und zum Anderen auf den realen Größenunterschied zurückzuführen ist (GCAPT mit zwei, GCAPX mit sechs zusätzlichen Aminosäuren im Vergleich zum nativen GCAP1). Das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt.

a: natives GCAP1 **b:** rekombinantes GCAPT **c:** rekombinantes GCAPX.

3.10.2 Titration der Calcium-abhängigen Verschiebung im SDS-Gel

In Analogie zu anderen Calcium-Bindungsproteinen (z. B. Calmodulin) kann man annehmen, daß eine Calcium-induzierte Konformationsänderung von GCAP1 den Calcium-abhängigen Verlauf der retGC-Aktivierung bestimmt. Daher war es interessant, den genauen Bereich der freien Calcium-Konzentration, in dem die Konformationsänderung stattfindet, festzustellen. Die Calcium-abhängige Verschiebung im SDS-Gel ist auf die Konformationsänderung zurückzuführen. Deshalb wurden Proben mit nativem bzw. rekombinantem GCAP1 auf verschiedene freie Calcium-Konzentrationen eingestellt und einer SDS-PAGE unterzogen. Diese Titration der Calcium-abhängigen Verschiebung ergab für natives GCAP1 einen Bereich zwischen 20 nM und 52 nM freiem Calcium (Abb. 3.14). Rekombinantes GCAP1 änderte seine Konformation bei einer freien Calcium-Konzentration zwischen 52 nM und 112 nM (Abb. 3.15).

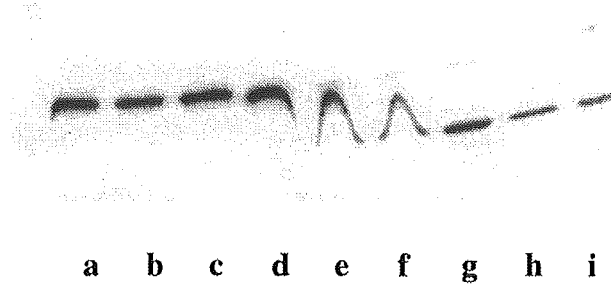


Abb. 3.14: Verschiebung des nativen GCAP1 im SDS-Gel in Abhängigkeit von der freien Calcium-Konzentration

Natives GCAP1 änderte seine Konformation zwischen 20 nM und 52 nM $[Ca^{2+}]_{frei}$. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-GCAP1-Antikörper nach einem Western-Blot.

a: 9 nM b: 13 nM c: 20 nM d: 31 nM e: 39 nM f: 45 nM g: 52 nM h: 61 nM i: 73 nM

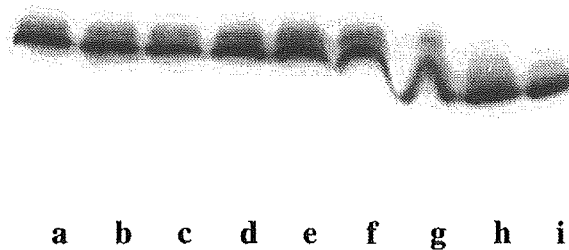


Abb. 3.15: Verschiebung des rekombinanten GCAP1 im SDS-Gel in Abhängigkeit von der freien Calcium-Konzentration

Rekombinantes GCAP1 änderte seine Konformation zwischen 52 nM und 112 nM $[Ca^{2+}]_{frei}$. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-GCAP1-Antikörper nach einem Western-Blot.

a: 20 nM b: 31 nM c: 39 nM d: 45 nM e: 52 nM f: 61 nM g: 73 nM h: 112 nM i: 2268 nM

3.10.3 Calcium-abhängige Aktivierung der retGC durch natives und rekombinantes GCAP1

Die Calcium-abhängige Aktivierung der retGC durch die native und die beiden rekombinanten GCAP1-Formen wurde bei verschiedenen freien Calcium-Konzentrationen in einem Bereich zwischen 1 nM und 150 μ M getestet (Abb. 3.16). Das native Protein stimulierte die retGC-Aktivität 5-10-fach mit hoher Kooperativität in dem physiologisch bedeutsamen Bereich zwischen 50 nM und 400 nM. Hierbei betrug der EC_{50} -Wert 100 nM und der Hill-Koeffizient lag bei $n = 2,5$.

Beim rekombinanten GCAPT war eine Verminderung der Kooperativität (Hill-Koeffizient $n = 2,0$) und eine Verschiebung des EC_{50} -Wertes auf 261 nM zu beobachten. Diese Veränderungen waren unabhängig von der GCAPT-Konzentration.

Meistens war ein leichter Abfall der retGC-Aktivität bei einer freien Calcium-Konzentration < 50 nM, bei der ein EGTA-Überschuß eingesetzt wird, zu beobachten. Das Kurven-Anpassungsprogramm wurde daher nur auf Werte zwischen 50 nM und 150 μ M freies $[Ca^{2+}]$ angewendet: Hiermit ergab sich für natives GCAP1 ein EC_{50} von 97 nM und ein Hill-Koeffizient von 2,3 und für rekombinantes GCAPT ein EC_{50} von 210 nM sowie ein Hill-Koeffizient von 1,5. GCAPX, das vier Aminosäuren länger ist als GCAPT, aktivierte die retGC in einer vergleichbaren Weise wie GCAPT.

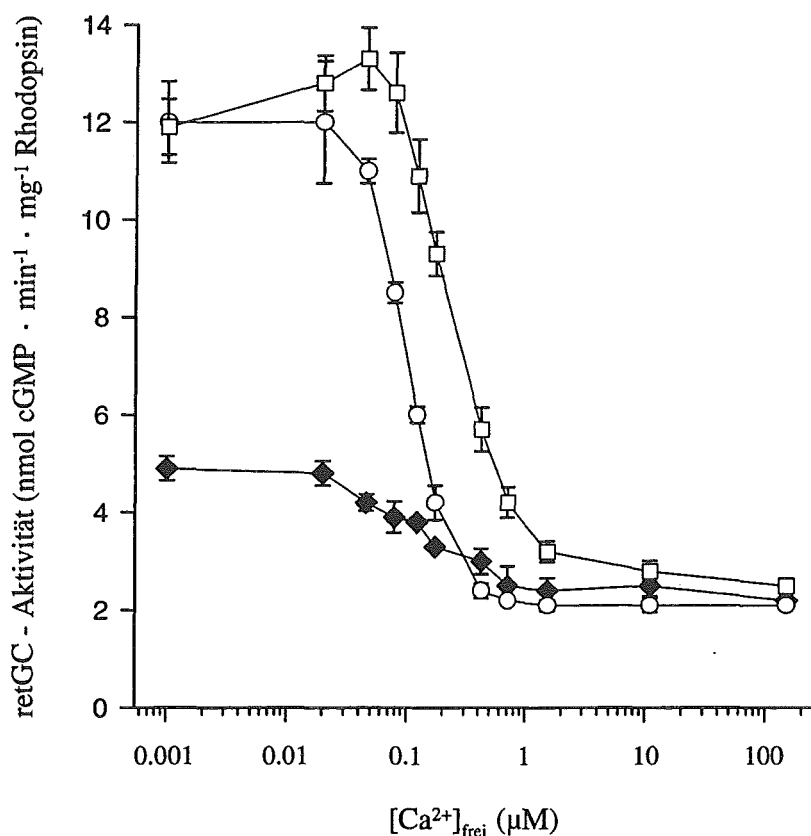


Abb.3.16: Vergleich der Calcium-abhängigen Aktivierung der retGC durch natives und rekombinantes GCAP1

GCAP1 wurde mit gewaschenen ROS-Membranen, die retGC enthalten, rekonstituiert. Das Verhältnis von nativem GCAP1 zu Rhodopsin betrug 1:800. Das molare Verhältnis von rekombinantem GCAPT zu Rhodopsin betrug 1:20. Alle Inkubationen wurden in der Anwesenheit von 100 μ M ATP durchgeführt. In der Kontrolle wurde kein GCAP1 zugesetzt. Die Daten stellen die Durchschnittswerte von Triplets dar.

◆ = Basalaktivität der gewaschenen Membranen; ○ = Aktivierung durch natives GCAP1;

□ = Aktivierung durch rekombinantes GCAPT

3.10.4 Verhältnis von nativem und rekombinantem GCAP1 zu Rhodopsin in den Rekonstitutionsexperimenten

Die höchste retGC-Aktivität ($23 \text{ nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Rhodopsin) wurde bei einem molaren Verhältnis von nativem GCAP1 : Rhodopsin von 1:270 gemessen (3.4). Werte von bis zu $18 \text{ nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Rhodopsin wurden aber auch noch bei einem molaren Verhältnis von 1:800 erreicht. Rekombinantes GCAP1 mußte hingegen in einer viel höheren Konzentration eingesetzt werden, um die retGC maximal zu aktivieren (Abb. 3.17). Mit steigenden GCAPX-Konzentrationen erhöhte sich nicht nur die retGC-Aktivität bei einer niedrigen (20 nM), sondern - wenngleich in deutlich geringerem Umfang - auch bei einer hohen freien Calcium-Konzentration ($1,53 \text{ } \mu\text{M}$). Um alle unspezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen auszuschließen, wurden die Proben in Anwesenheit von jeweils $30 \text{ } \mu\text{g}$ BSA inkubiert. Eine Inkubation nur mit BSA zeigte keinerlei Einfluß auf die retGC-Aktivität.

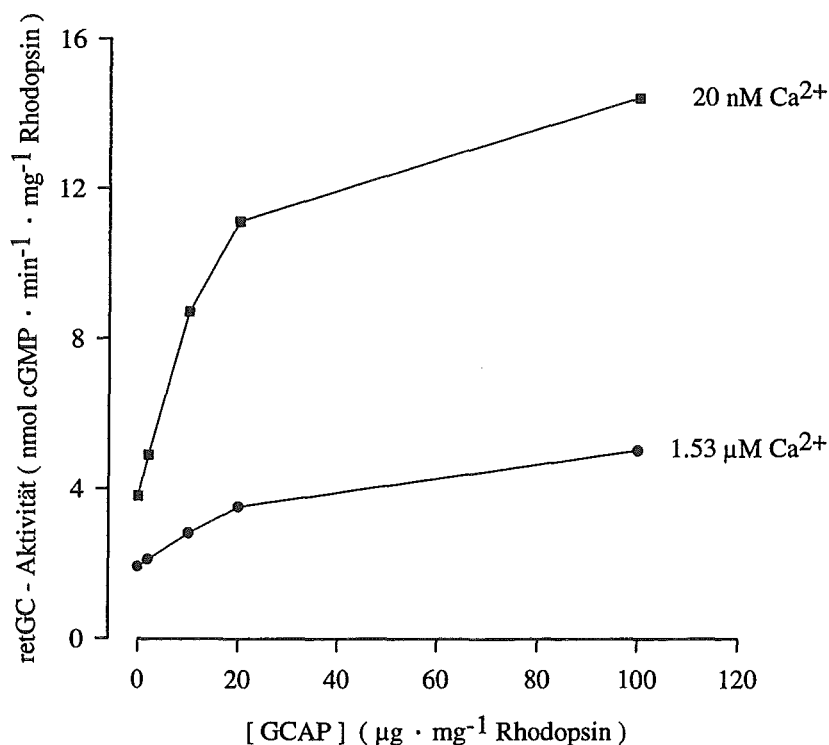


Abb. 3.17: Abhängigkeit der Aktivierung der retGC von der Menge rekombinanten GCAPX

Die Aktivierung der retGC stieg bei 20 nM Ca^{2+} mit zunehmender Menge deutlich an, während bei $1,53 \text{ } \mu\text{M Ca}^{2+}$ ebenfalls ein - allerdings niedrigerer - Anstieg zu verzeichnen war.

3.10.5 ATP-Abhängigkeit der Aktivierung der retGC durch natives und rekombinantes GCAP1

Wie bereits unter 3.5 beschrieben, steigert eine ATP-Konzentration von 100-125 μM die Aktivität der retGC um ca. 100%. Da in der Literatur auch eine kompetitive Inhibierung der retGC durch ATP beschrieben wird (Sitaramayya et al., 1991), wurde durch eine Titration die optimale ATP-Konzentration ermittelt (Abb. 3.18).

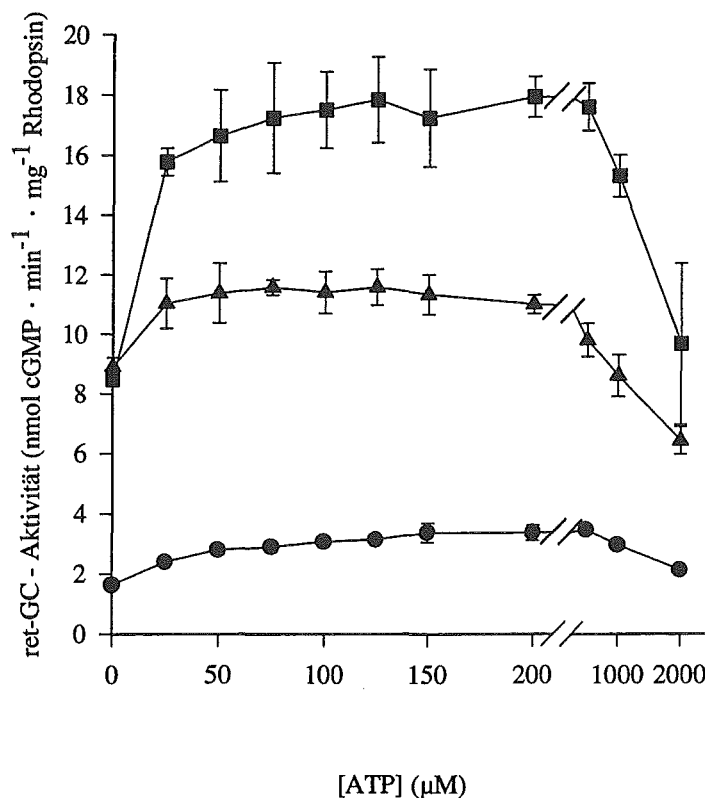


Abb. 3.18: Vergleich der ATP-Abhängigkeit der Aktivierung der retGC durch natives und rekombinantes GCAP1 bei 1 nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$

GCAP1 wurde mit gewaschenen ROS-Membranen, die retGC enthalten, rekonstituiert. Das Verhältnis von nativem GCAP zu Rhodopsin betrug 1:450. Das molare Verhältnis von rekombinantem GCAPX zu Rhodopsin betrug 1:6. In der Kontrolle wurde kein GCAP1 zugesetzt. Die Daten stellen die Durchschnittswerte von Triplets dar.

● = Basalaktivität der gewaschenen Membranen; ■ = Aktivierung durch natives GCAP1;
▲ = Aktivierung durch rekombinantes GCAP1

Bei nativem GCAP1 steigt die Aktivität bereits bei einer ATP-Konzentration von 25 μM um fast das Doppelte an. Bis zu einer Konzentration von 125 μM steigt die Aktivität weiterhin leicht an. Bei einer Steigerung der ATP-Konzentration von 500 μM auf 1 mM sinkt die Aktivität um ca. 30%, um bei einer Konzentration von 2 mM fast wieder den Ausgangswert zu erreichen.

Bei rekombinalem GCAP1 ist der Zuwachs an Aktivität bei niedrigen ATP-Konzentrationen deutlich geringer. Bei ATP-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ ist wie bei nativem GCAP1 ebenfalls ein Abfall der retGC-Aktivität um ca. 30% zu beobachten. Die retGC-Aktivität bei 2 mM ATP liegt sogar noch unter dem Ausgangswert. Bei vereinzelt vorangehenden Experimenten (ohne Bild) mit geringeren GCAPX-Mengen war jedoch durchaus eine Verdoppelung der retGC-Werte bei ATP-Zusatz beobachtet worden. Eine Titration der GCAPX-Menge mit und ohne ATP ergab, daß bei hohen GCAPX-Konzentrationen der ATP-Effekt abnimmt. Die Lineweaver-Burk-Auftragung zeigte, daß der ATP-Effekt sich in erster Linie auf den apparenten K_M auswirkte, während sich $V_{\max}$ nur wenig änderte (Abb. 3.18): Der K_M betrug ohne ATP-Zusatz $0,46 \mu\text{M}$ und mit ATP $0,2 \mu\text{M}$, während sich $V_{\max}$ von $12,7 \text{ nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Rhodopsin}$ auf $16 \text{ nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Rhodopsin}$ erhöhte.

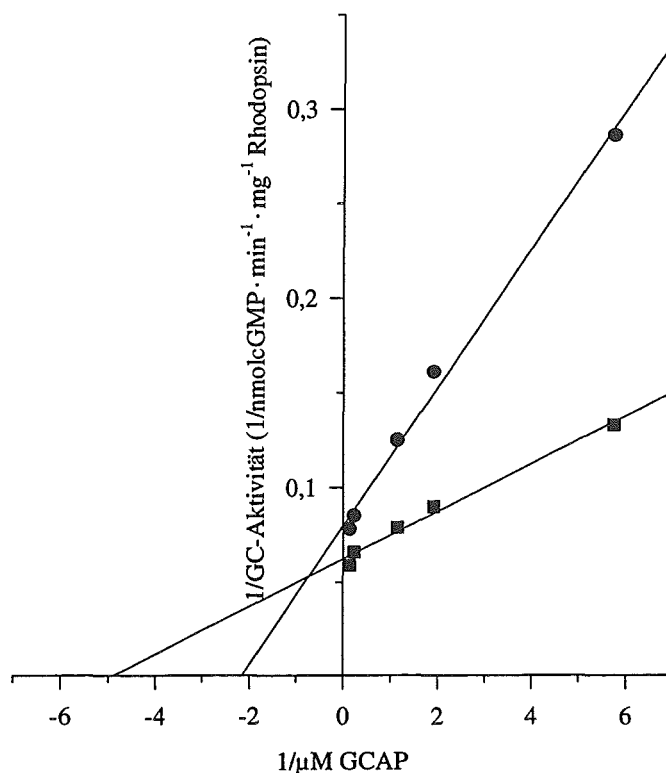


Abb. 3.19: Lineweaver-Burk-Auftragung der retGC-Aktivierung in Abhängigkeit von der Menge an rekombinalem GCAP1 und ATP

Rekombinantes GCAPX wurde mit gewaschenen ROS-Membranen, die retGC enthalten, rekonstituiert. Die Reaktionsansätze wurden ohne oder mit $125 \mu\text{M}$ ATP inkubiert.

$V_{\max} (-\text{ATP}) = 12,7 \text{ nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Rhodopsin}$; $V_{\max} (+\text{ATP}) = 16 \text{ nmol cGMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Rhodopsin}$; $K_M (-\text{ATP}) = 0,44 \mu\text{M}$; $K_M (+\text{ATP}) = 0,2 \mu\text{M}$

● = Aktivierung durch rekombinantes GCAPX ohne ATP ■ = Aktivierung durch rekombinantes GCAPX bei einer ATP-Konzentration von $125 \mu\text{M}$

3.11 Immunreaktivität des Anti-GCAP1-Antikörpers

Zur Herstellung eines spezifischen Antikörpers wurde gereinigtes, rekombinantes GCAP1 in ein Kaninchen injiziert (2.7). Das gewonnene Antiserum wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt. Es wurde beim Immunoblotting (Abb. 3.20) in einer Verdünnung von 1:5000 und bei der Immunhistochemie (Abb. 3.21) in einer Verdünnung von 1:600 eingesetzt. Ein Zusatz von Anti-GCAP1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:8 zu den Rekonstitutionsexperimenten inhibierte die Calcium-abhängige Aktivierung der retGC (ohne Abbildung)

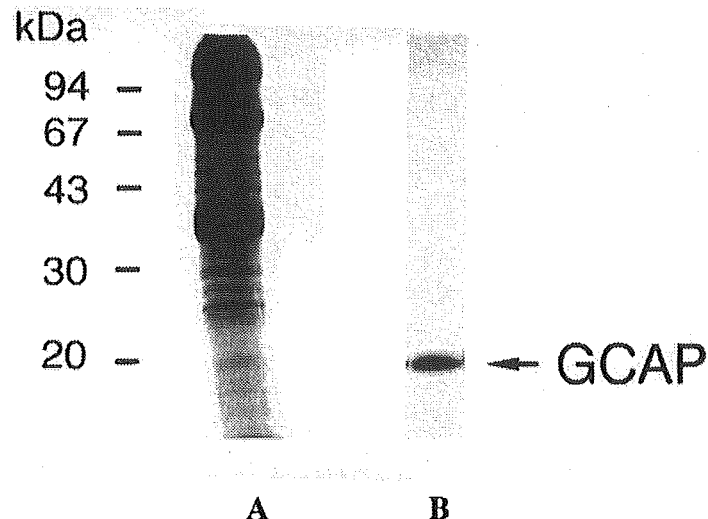


Abb. 3.20: Immunreaktivität des Anti-GCAP1-Antikörpers nach einem Western-Blot

Der Anti-GCAP1-Antikörper detektiert GCAP1 in gelelektrophoretisch aufgetrennten ROS-Proteinen (Western-Blot).

A: Coomassie Blue-gefärbte ROS-Proteine im SDS-Gel **B:** Detektion von GCAP1 in ROS mit dem Anti-GCAP1-Antikörper (1:5000) nach einem Western-Blot

3.12 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden von Dr. Frank Müller (IBI I) durchgeführt. Ein polyklonaler Antikörper, der gegen rekombinantes GCAP1 hergestellt worden waren, erkannte rekombinantes GCAP1 und natives GCAP1 in ROS-Präparationen auf Western-Blots und wurden daher für immunhistochemische Studien eingesetzt (Abb. 3.21). Mit diesem Antikörper wurde in Vertikalschnitten durch die Retina GCAP1-artige Immunreaktivität in der Photorezeptorschicht gefunden. Die Anfärbung war besonders deutlich in den Außensegmenten von Stäbchen und Zapfen, jedoch waren auch andere Kompartimente der Photorezeptoren wie Soma, Axon und Axon-Ende angefärbt. Im Vergleich zu den Stäbchen waren die Zapfen sehr stark angefärbt. Die Außensegmente der Zapfen und die Somata, Axone und Pedikel konnten klar

identifiziert werden. In der inneren Retina wurden nur gelegentlich kleine Somata in der inneren Nuklear-Schicht und in der Ganglienzellschicht angefärbt (ohne Abbildung). Mit Ausnahme dieser extrem seltenen Amakrinzellpopulation fand sich keine Immunreaktivität in anderen Zelltypen. Ohne Erstantikörper sowie nach Präadsorption mit rekombinantem GCAP1 konnte keine Färbung beobachtet werden (ohne Abbildung).

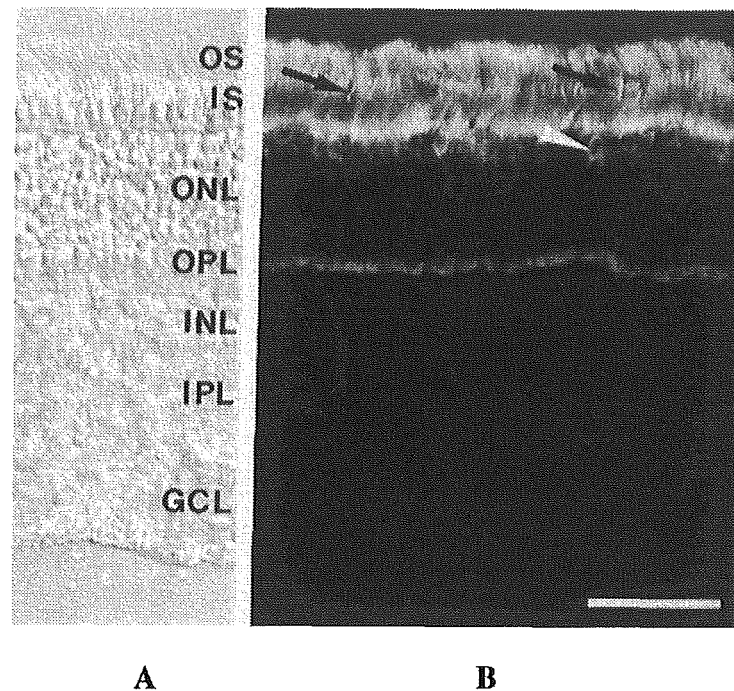


Abb. 3.21: GCAP1-Immunreaktivität in der Retina

Die gesamte Photorezeptorschicht zeigte eine Anfärbung mit dem Anti-GCAP1-Antikörper, die jedoch in den Außensegmenten von Stäbchen und Zapfen am stärksten auftrat. Die Pfeile weisen auf einige Zapfen-Außensegmente, der Pfeilkopf auf ein Zapfen-Soma. Die Zapfen-Axone projizieren in die äußere plexiforme Schicht, in der ihre Pedikel ein dichtes Netzwerk formen. Die Somata und Fortsätze der Stäbchen werden weniger stark angefärbt. Der Maßstab zeigt 50 μm an.

A: Nomarski-Mikrograph der Retina-Schichten (OS = Außensegmente, IS = Innensegmente, ONL = äußere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglien-Zellschicht) B: Indirekte Immunfluoreszenz der GCAP1-artigen Immunreaktivität.

3.13 GCAP1-Konzentration in den ROS-Präparationen

Die Detektion von GCAP1 durch den Anti-GCAP1-Antikörper erfolgte über das ECL-System (Amersham). Bei diesem System führt die Umsetzung von Luminol mit der H_2O_2 -Peroxidase, die an den Zweit-Antikörper gekoppelt ist, zu einer Aussendung von Licht der Wellenlänge $\lambda = 428 \text{ nm}$ (2.12). Diese Lichtsignale können mittels eines Luminographen detektiert und quantifiziert

werden. Mit dieser Methode kann der GCAP1-Gehalt einer Probe quantifiziert werden. Dazu wird auf demselben Blot, auf dem sich die zu vermessende Probe befindet, mit definierten GCAP1-Mengen eine Kalibrierung erstellt. Aus der Kalibrierung kann der genaue GCAP1-Gehalt der Probe ermittelt werden. Für GCAP1 wurde ein molares Verhältnis zu Rhodopsin von $1:983 \pm 212$ ($n = 11$) ermittelt. Da das Verhältnis von retGC zu Rhodopsin in den gleichen ROS-Präparationen $1:220 \pm 14$ ($n = 4$) (persönliche Kommunikation K.-W. Koch) beträgt, ergibt sich daraus ein Verhältnis von GCAP1 zur retGC von ca. 1:4.

Ob dieses Verhältnis auch *in vivo* in den Außensegmenten vorliegt, bleibt fraglich, da die Außensegmente bei der Präparation von den Innensegmenten abgebrochen werden und sich die Plasmamembranen nicht in allen Fällen auch wieder schließen (persönliche Kommunikation K.-W. Koch).

3.14 GCAP1-Gehalt des ROS-Gradienten

Die Immunhistochemie läßt erkennen, daß GCAP1 nicht nur in den Außensegmenten der Photorezeptoren vorkommt. Wie auch alle übrigen Photorezeptorproteine wird es in den Innensegmenten synthetisiert und kommt außerdem in den synaptischen Fortsätzen der Photorezeptoren vor.

Um eine Vorstellung davon zu erhalten, ob bereits bei der Präparation der ROS größere Mengen GCAP1 verloren gehen, wurde im Sucrose-Gradienten, der zur ROS-Präparation verwendet wird, der Rhodopsin- und der GCAP1-Gehalt bestimmt (Abb. 3.22). GCAP1 ist in den ersten Gradienten-Fractionen enthalten, nimmt dann stark ab, um kurz hinter dem Rhodopsin-Peak (Fraktion 12) ein Maximum zu erreichen (Fraktionen 14 und 15). Diese stark GCAP1-haltigen Fraktionen entsprechen vermutlich Außensegmenten, an denen Teile abgebrochener Innensegmente hängen. Nach diesem Maximum nimmt der GCAP1-Gehalt wieder stetig bis zur letzten Fraktion hin ab. Lediglich die rhodopsinhaltigen Fraktionen (12-16) werden als ROS zusammengefaßt. Da jedoch in fast allen Fraktionen GCAP1 enthalten ist, geht somit bei der Präparation der ROS GCAP1 verloren.

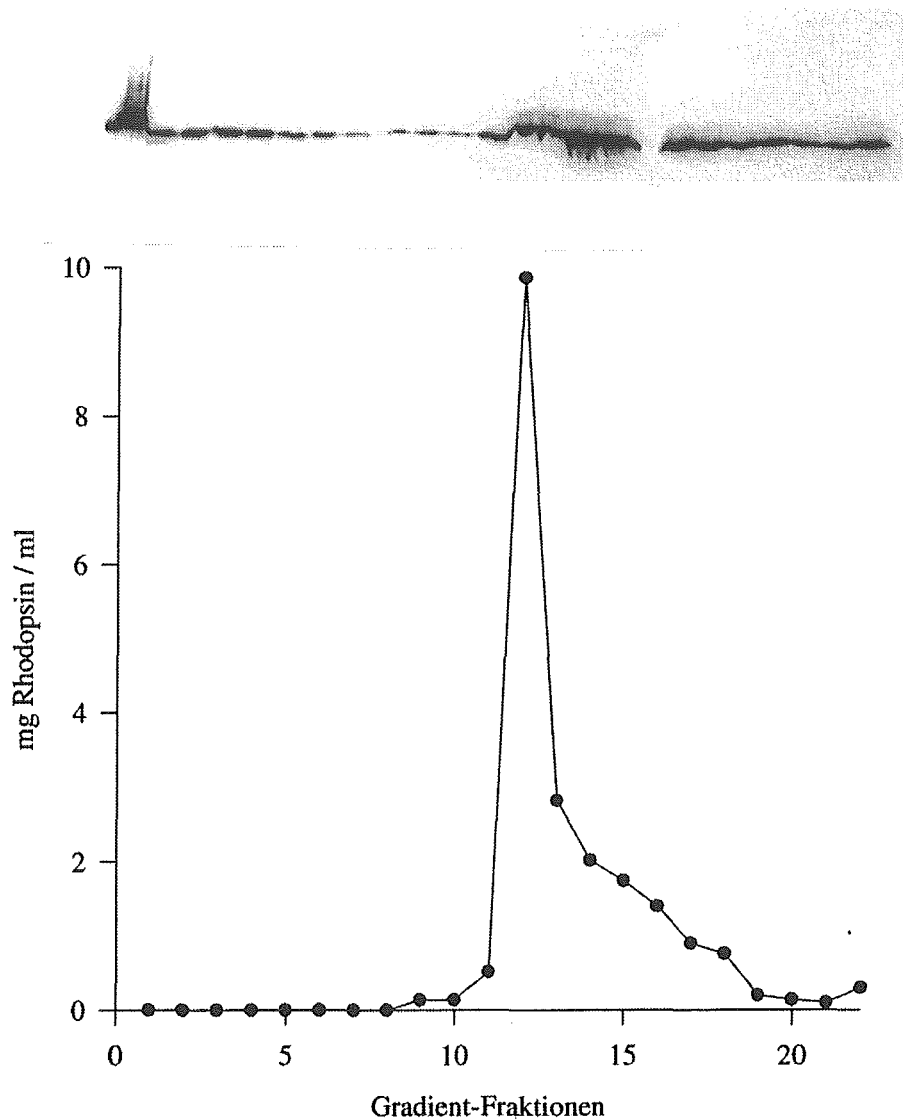


Abb. 3.22: GCAP1- und Rhodopsin-Gehalt des Sucrose-Gradienten, mit dem die ROS präpariert wurden

Der Sucrose-Gradient, mit dem die ROS präpariert wurden, wurde auf seinen GCAP1 und Rhodopsin-Gehalt hin untersucht. Die Fraktionen mit maximalem GCAP1-Gehalt folgten der Fraktion mit maximalem Rhodopsin-Gehalt. GCAP1 konnte in allen Gradienten-Fractionen detektiert werden. Die Fraktionen 12-16 wurden zusammengefaßt und als ROS-Suspension bezeichnet.

Grafik: Rhodopsingehalt der Gradienten-Fractionen **Photographien:** Mit Anti-GCAP1-Antikörper immungefärbter Blot der Gradienten-Fractionen. In der linken Spur ist die Ausgangsfraktion (2.2) aufgetragen, die Spuren mit den Fraktionen 1-22 sind über den jeweiligen Fraktionen angeordnet.

4.0 DISKUSSION

4.1 Die Aktivierung der retGC durch natives GCAP1

Der Abfall der cytoplasmatischen Calcium-Konzentration wird als einer der Haupt-Kontrollschritte bei der Modulation der Phototransduktion betrachtet und spielt eine entscheidende Rolle bei der Lichtadaptation. Einer der Schlüsselvorgänge für die Erholung von einem Lichtpuls und für die Lichtadaptation ist der Anstieg der retGC-Aktivität bei einer niedrigen freien Calcium-Konzentration.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß ein Calcium-Bindungsprotein mit einem berechneten Molekulargewicht von 23.51 kDa als cytoplasmatischer Aktivator der retGC agiert. Eine unterschiedliche Strategie bezüglich Reinigung und Klonierung führte zu dem gleichen Aktivator-Protein, das Palczewski et al. (1994) als GCAP beschrieben haben und das nach Klonierung eines weiteren retGC-aktivierenden, verwandten Proteins (GCAP2) als GCAP1 bezeichnet wurde (Gorczyca et al., 1995; Dizhoor et al., 1995). GCAP2 ist ebenfalls als Aktivator der retGC postuliert worden (Dizhoor et al., 1995).

Die Aktivierung der retGC in gewaschenen ROS-Membranen durch gereinigtes, natives GCAP1 war bezüglich der Calcium-Sensitivität mit einem EC_{50} -Wert von 100 nM und einer maximalen Stimulation von 6-18 nmol cGMP $\cdot$ min⁻¹ $\cdot$ mg⁻¹ Rhodopsin (je nach ATP-Gehalt des Reaktionsansatzes) vergleichbar zu der Aktivierung der retGC in ganzen ROS (Koch & Stryer, 1988; Dizhoor et al., 1991; Lambrecht & Koch, 1991a). Die maximalen Werte stehen auch in Übereinklang mit den cGMP-Umsatzraten, die an intakten Kaninchen-Retinen durch den Einbau von ¹⁸O in Guanin-Nukleotide gemessen wurden (Ames et al., 1986). Diese ¹⁸O-Studien zeigten bei Belichtung einen Anstieg des cGMP-Flusses von 12 auf 67 μ M $\cdot$ sec⁻¹ (im ROS-Volumen). Nimmt man eine Rhodopsin-Konzentration von 6 mM in den Scheibchen, die das halbe Volumen eines Außensegmentes ausmachen, an so entspricht die von mir gemessene basale retGC-Aktivität von 2-3 nmol cGMP $\cdot$ min⁻¹ $\cdot$ mg⁻¹ Rhodopsin einem Umsatz von 8-12 μ M $\cdot$ sec⁻¹ und die stimulierte Aktivität von 16-18 nmol cGMP $\cdot$ min⁻¹ $\cdot$ mg⁻¹ Rhodopsin einem Umsatz von 64-72 μ M sec⁻¹ (Aktivitäten bei Zusatz von 100-125 μ M ATP). Wolbring und Schnetkamp (1995) kamen mit einem optischen Assay, der auf der Messung der Pyrophosphatkonzentration beruht, zu sehr ähnlichen Ergebnissen: Sie bestimmten - unter Annahme einer Inhibierung der retGC durch hohe Calcium-Konzentrationen - für die Calcium-Abhängigkeit einen IC_{50} -Wert von 83-144 nM und eine retGC-Aktivität von 13-23 nmol cGMP $\cdot$ min⁻¹ $\cdot$ mg⁻¹ Rhodopsin.

Die Kooperativität war mit einem Hillkoeffizienten von $n = 2,3-2,5$ geringer als in ganzen ROS ($n = 3,9$; Koch & Stryer, 1988). Koutalos et al. (1995a) diskutieren einen Einfluß der Magnesium-Konzentration auf die Kooperativität der retGC-Aktivierung. In den Rekonstitutionsansätzen wurde mit 10 mM Mg^{2+} eine geringere Magnesium-Konzentration eingesetzt als bei Koch und Stryer (12 mM; 1988). Diese Konzentration hatte sich jedoch in vorangegangenen Konzentrationsreihen als optimal bezüglich der maximalen retGC-Aktivierung in Rekonstitutionsexperimenten erwiesen (persönliche Kommunikation K.-W. Koch). Mit dem physiologischen Substrat GTP wurden zwei- bis achtmal so hohe Aktivitäten gemessen, als Gorczyca et al. (1994a/b) mit dem Phosphorothioat-Analogon von GTP, S_p -GTP α S, erhielten. Bei Einsatz dieses Analogons als Substrat bleibt der Reaktionsmechanismus der Guanylatzyklase erhalten, die Maximalgeschwindigkeit kann jedoch bis um den Faktor zwanzig niedriger sein (Koch et al., 1990).

Vorläufige Kreuzvernetzungsstudien ergaben, daß retGC in nativen ROS-Membranen als Oligomer vorliegt (persönliche Kommunikation K.-W. Koch). Gelfiltrationsstudien, welche eine Elution der retGC-Aktivität in Assoziation mit einem Komplex mit hohem Molekulargewicht zeigten, ließen ebenfalls auf eine oligomere Struktur der retGC schließen (Hakki & Sitaramaya 1990; Hayashi & Yamazaki, 1991; Koch, 1992). Eine Dimerisierung ist für die ANP-Rezeptor-Guanylatzyklase beschrieben worden und ist bei dieser Guanylatzyklase eine Voraussetzung für die katalytische Aktivität (Wilson & Chinkers, 1995). Die Kreuzvernetzungsstudien (siehe oben) zeigten, daß sich GCAP1 mit einem retGC-Monomer vernetzen ließ. Die Menge an vernetztem Protein war interessanterweise bei einer hohen Calcium-Konzentration höher als bei einer niedrigen Calcium-Konzentration, bei der die retGC durch GCAP1 aktiviert wird. Eine Vernetzung von GCAP1 mit einem retGC-Oligomer konnte bislang nicht gezeigt werden.

Die Aminosäuresequenz von GCAP2 ist ca. 53% homolog zu der von GCAP1. Die beiden GCAPs sind sich am ähnlichsten in den Calcium-Bindungsdomänen sowie zwischen EF-2 und EF-3. Dies sind jedoch auch die Abschnitte hoher Homologie zu anderen Recoverin-ähnlichen Proteinen. Möglicherweise wird die retGC-aktivierende Domäne eher durch eine Tertiär-Struktur, die entfernte Elemente der Primär-Struktur zusammenbringt, gebildet wird als durch einen kurzen, speziellen Aminosäure-Sequenz-Abschnitt (Dizhoor et al., 1995). Peptid-Kompetitions-experimente legten hingegen nahe, daß der N-terminale Teil von GCAP1 für den Aktivierungsprozeß entscheidend ist (Palczewski et al., 1994). Dagegen spricht jedoch, daß sich GCAP2 innerhalb der ersten zwanzig Aminosäuren stark von GCAP1 unterscheidet (Dizhoor et al., 1995).

Zur Zeit kann nicht ausgeschlossen werden, daß zusätzliche Faktoren (z. B. ATP; 4.2) eine wichtige Rolle bei der retGC-Aktivierung spielen. Der Befund von Pepe et al. (1986), daß die retGC-Aktivität im Dunkeln nicht von der Calcium-Konzentration beeinflusst wird, konnte nicht

bestätigt werden. In allen durchgeführten Inkubationen war die retGC-Aktivität von der freien Calcium-Konzentration abhängig. Allerdings kann ein Einfluß des Rotlichts, bei dem die ROS präpariert und die Rekonstitutionsexperimente durchgeführt wurden, nicht ausgeschlossen werden.

Eine Erhöhung der Kalium-Konzentration gegenüber den anfänglichen Rekonstitutionsbedingungen steigerte die retGC-Aktivität (3.4.2). Die positive Wirkung von Kalium auf die retGC-Aktivität ist in Übereinklang mit den Ergebnissen von Ertel (1994), der bei einem Vergleich verschiedener monovalenter Kationen in Anwesenheit von Kalium die kürzeste Erholungsphase von der Lichtantwort beobachtet und dieses auf eine fördernde Wirkung von Kalium auf die retGC zurückführt. Auch bei der Reinigung der retGC nach Koch (1991) hat sich eine hohe Kalium-Konzentration (1 M) als günstig erwiesen.

4.2 Die Rolle von ATP bei der retGC-Aktivierung

Bei einer ATP-Konzentration von $\geq 500 \mu\text{M}$ trat eine kompetitive Inhibierung mit dem Substrat GTP ein. ATP-Konzentrationen von $100\text{--}125 \mu\text{M}$ verdoppelten die retGC-Aktivität unabhängig von der freien Calcium-Konzentration. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit den von Gorczyca et al. (1994b) beschriebenen Werten überein. Daher wurde in allen GC-Ansätzen $100\text{--}125 \mu\text{M}$ ATP eingesetzt, um die Antwort zu maximieren. Der Mechanismus, über den ATP auf die retGC wirkt, ist noch nicht geklärt: Einerseits wäre eine Bindung von ATP an die „Kinase Homology Domain“ (KHD) und eine daraufhin erfolgende Konformationsveränderung denkbar. Diese Art der Aktivierung wurde bereits bei Guanylatzyklasen, die über natriuretische Peptide reguliert werden, durch die Charakterisierung von Deletionsmutanten postuliert (Chinkers & Garbers, 1989; Koller et al., 1992; Duda et al., 1993).

Die Aktivierung durch ATP könnte auch durch einen Phosphorylierungsschritt erfolgen. In Stäbchen-Außensegmenten vom Frosch werden drei endogene Kinase-Aktivitäten gefunden: Protein-Kinase C, Protein-Kinase A und Rhodopsin-Kinase (Binder et al., 1989). Nach Wolbring und Schnetkamp (1995) kann eine Steigerung der retGC-Aktivität durch ATP durch spezifische Proteinkinase C-Inhibitoren verhindert werden. Sie finden zwar ebenfalls eine Verdopplung der retGC-Aktivität durch ATP, jedoch bereits bei ATP-Konzentrationen zwischen 1 und $10 \mu\text{M}$. Für einen Phosphorylierungsschritt würde nach ihren Ergebnissen auch sprechen, daß das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon ATP- β,γ -methylen die retGC-Aktivität nicht steigert. Außerdem konnten sie die ATP-abhängige Aktivitätssteigerung durch Waschschrte entfernen und durch gereinigte, konstitutiv aktive Proteinkinase C rekonstituieren. Einen entgegengesetzten Einfluß

einer Phosphorylierung auf den cGMP-Umsatz zeigen die Ergebnisse von Binder et al. (1989): Eine Behandlung von intakten Stäbchen mit dem Protein-Kinase C-Aktivator Oleoylacylglycerol (OAG) senkt die Dunkel-Konzentration von cGMP sowie die Amplitude der Photoantwort um 40%.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wolbring und Schnetkamp (1995) ließ sich die ATP-abhängige Aktivierung durch die in dieser Arbeit standardmäßig durchgeführten zwei Waschschrte nicht entfernen. Auch eine Inhibierung der Phosphatasen PP1 und PP2A mit Okadasäure zeigte keinen Einfluß auf die retGC-Aktivierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß sich die Anwesenheit von ATP nur geringfügig auf $V_{\max}$, wohl aber auf den apparenten K_M auswirkt (3.9.5). Das bedeutet, daß ohne ATP die GCAP1-Menge, die benötigt wird, um die retGC zu einer bestimmten Aktivität zu stimulieren, größer sein muß als mit ATP. Gegen die Möglichkeit, daß GCAP1 und ATP um dieselbe Bindestelle konkurrieren, spricht allerdings, daß ATP die Wirkung von GCAP1 verstärkt und mit ATP allein lediglich eine Verdopplung der retGC-Aktivität erreicht werden kann, die nicht sensitiv für die Calcium-Konzentration ist.

4.3 Die Calcium-Bindung von GCAP1

Das EF-Hand-Calciumbindungsmotiv besteht aus einer Schleife aus 12 aufeinanderfolgenden Aminosäureresten mit Sauerstoff-Atomen, die an der Ca^{2+} -Koordination beteiligt sind. Dieser Komplex wird von zwei flankierenden α -Helices stabilisiert. Die Ca^{2+} -Bindungsschleifen enthalten eine strikte räumliche Anordnung, bei der sich in den Positionen 1, 3, 5 und 9 Sauerstoffenthaltende Aminosäure-Seitenketten, in Position 6 ein Glycin, in Position 8 ein Isoleucin, Leucin oder Valin und in Position 12 eine Glutaminsäure befinden. In Position 1 liegt meist eine Asparaginsäure vor.

Dieses Motiv kommt in GCAP1 an drei Positionen vor (Abb. 3.9). Die Präsenz von drei Calcium-Bindungsstellen ist in Übereinstimmung mit einem Hill-Koeffizienten von 2,3 -2,5, wie er bei der Aktivierung der retGC durch natives GCAP1 auftritt. Weiterhin liegt in den Aminosäure-Positionen 27-38 eine degenerierte EF-Hand vor, die mit einem Threonin beginnt und in Position 29 ein Cystein enthält. Vermutlich ist diese EF-Hand nicht funktionell. Subbaraya et al. (1994) diskutieren auch, daß ein starres Prolin in Position 30 eine Calcium-Bindung verhindern könnte. Mit radioaktivem ^{45}Ca konnte eine Calcium-Bindung an GCAP1 gezeigt werden (3.2.2). Außerdem konnte eine Calcium-Bindung von GCAP1 durch eine Verschiebung des Fluoreszenz-

Emissionsspektrums bei $\lambda = 291 \text{ nm}$, die in Abhängigkeit von Calcium auftritt, nachgewiesen werden (Palczewski et al., 1994).

Bei GCAP2 hingegen ist nicht nur die erste EF-Hand degeneriert, sondern auch die zweite weicht etwas von der EF-Hand-Konsensussequenz ab. In EF-1 sind zwei Sauerstoff-enthaltende Reste (Positionen 35 und 41) der Konsensussequenz durch Cystein bzw. Phenylalanin ersetzt. EF-2 hingegen besitzt alle Sauerstoff-enthaltenden Aminosäurereste, aber in Position 74 ist ein Konsensus-Glycin durch ein Asparagin ersetzt (Dizhoor et al., 1995). Für die konventionellen EF-Hände von GCAP1 und GCAP2 wurden noch keine Dissoziationskonstanten für die Bindung von Calcium ermittelt, da bislang weder natives noch rekombinantes Protein in großen Mengen vorlag.

Die Bindung von Calcium an GCAP1 läßt sich in der SDS-PAGE gut veranschaulichen: Natives und rekombinantes GCAP1 zeigten eine Calcium-abhängige Verschiebung von ca. 5 kDa (3.10.1). Eine Titration der freien Calcium-Konzentration ergab, daß diese Verschiebung bei nativem GCAP1 zwischen 20 nM und 52 nM auftritt, bei rekombinantem GCAP1 hingegen zwischen 52 nM und 112 nM (3.10.2). Dieser Unterschied könnte auf Ungenauigkeiten beim Einstellen der freien Calcium-Konzentration zurückzuführen sein, es könnte sich aber auch um unterschiedliche Proteineigenschaften handeln. Letztere Möglichkeit stünde in Übereinklang mit dem auf 261 nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ erhöhten EC_{50} -Wert (3.10.3).

Obwohl GCAP2 mit einem berechneten Molekulargewicht von 23759 Dalton schwerer ist als GCAP1, zeigt es in der SDS-PAGE mit 18 kDa ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht als GCAP1 (20,5 kDa). Es zeigt in Abhängigkeit von Calcium eine ebenso große Verschiebung im SDS-Gel wie GCAP1 (Gorczyca et al., 1995). Das erste Calcium-Bindungsprotein, an dem eine Interaktion mit Calcium in der Gegenwart von SDS dokumentiert wurde, war Calmodulin. Diese Interaktion manifestierte sich in einer Veränderung des Laufverhaltens: In Gegenwart von EDTA lief Calmodulin bei einem Molekulargewicht von 21 kDa, in Gegenwart von Calcium bei 15 kDa (Burgess et al., 1980). Die Ursache hierfür liegt in einer veränderten Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle oder in einer Veränderung der exponierten geladenen Aminosäure-Seitenketten durch eine Konformationsänderung des Proteins. Diese Vorstellung widerspricht dem klassischen Modell der SDS-Gelelektrophorese, bei dem davon ausgegangen wird, daß durch eine Hitze-Denaturierung in Anwesenheit von SDS die Polypeptidketten vollständig entfaltet und mit SDS-Molekülen bedeckt werden. Bei Calcium-Bindungsproteinen könnte die Bindung von Calcium die Tertiär-Konformation während der Hitze-Denaturierung stabilisieren. Ein Indiz dafür ist, daß Extrakte von ROS, die bei einer niedrigen freien Calcium-Konzentration hitzedenaturiert wurden (4 min, 95°C), keine retGC-stimulierende Aktivität aufwiesen. Im Gegensatz dazu

zeigten Extrakte, die bei einer hohen freien Calcium-Konzentration hitzedenaturiert wurden, retGC-stimulierende Aktivität. Ein weiterer Hinweis darauf, daß im SDS-Gel die Ca^{2+} -freie Form die denaturierte Form darstellt, findet sich bei Calmodulin: Über lange Zeiten gelagertes Calmodulin, das vermutlich einen höheren Prozentsatz an denaturiertem Protein aufweist, tritt eher in der bei einem höheren Molekulargewicht laufenden Ca^{2+} -freien Form auf (Burgess et al., 1980).

4.4 Die Stellung der GCAPs innerhalb der Familie der EF-Hand-Calciumbindungsproteine

Die höchste Identität von GCAP1 wurde mit 39% zu NVP-3 (neural visinin-like Ca^{2+} -binding protein) gefunden, welches aus Rattenhirn kloniert wurde (Kajimoto et al., 1993). Die Identität zu Recoverin ist mit 33% und zu Visinin, einem Protein aus der Hühner-Retina, mit 29% weniger ausgeprägt. Insgesamt läßt sich jedoch schließen, daß die GCAPs zur Familie der Recoverin-ähnlichen Proteine gezählt werden können. Diese Familie umfaßt eine schnell ansteigende Anzahl von neuronalen Calcium-Bindungsproteinen. Dazu zählen unter anderem VILIP (Visinin-like Protein) aus dem Hühner-Gehirn, Neurocalcin aus dem zentralen Nervensystem, Hippocalcin aus dem Hippocampus der Ratte, p23K aus Ratten- und Mäuse-Gehirn und Frequenin, ein Recoverin-Homolog aus Invertebraten (Lenz et al., 1992; Okazaki et al., 1992; Nakano et al., 1992; Kobayashi et al., 1992; Takamatsu & Uyemura, 1992; Takamatsu et al., 1992; Pongs et al., 1993). Die Homologie von humanem GCAP1 zu humanem Calmodulin ist hingegen mit 26% eher gering (Palczewski et al., 1994).

4.5 Die chemischen und strukturellen Eigenschaften von GCAP1

GCAP1 enthält in dem Sequenzbereich um die degenerierte 'EF-Hand' ein sogenanntes Greek key Motiv. Greek key Motive deuten auf antiparallele β -Strang-Strukturen hin. Daher liegt die symmetrische Helix-Schleife-Helix-Konfiguration (EF1, EF2 und EF3, EF4 getrennt durch eine Furche), die für die Tertiär-Struktur von Recoverin charakteristisch ist, vermutlich bei GCAP1 nicht vor (Subbaraya et al., 1994).

Die berechneten pIs von GCAP1 und GCAP2 liegen zwischen 4.1-4.4 (3.8; Gorczyca et al., 1995). Nach der Aminosäure-Sequenz zu urteilen ist GCAP1 ein lösliches, saures Protein ohne

hydrophobe Domänen. Der Umstand, daß natives GCAP1 membranassoziiert und hydrophob ist, könnte an einem Zusammenspiel der N-terminalen Acylierung und einer Anhäufung positiver Ladungen (Position 85-97), die mit negativ geladenen Phospholipid-Kopfgruppen interagieren, liegen (Subbaraya et al., 1994). Bindungsstudien mit gewaschenen ROS-Membranen ergaben, daß GCAP1 bei physiologischen Ionenstärken an die Membran bindet, diese Bindung jedoch anders als bei Recoverin nicht Calcium-abhängig ist (Gorczyca et al., 1995). Membran-Bindungsstudien im Rahmen dieser Arbeit zeigten in Bezug auf Calcium-Abhängigkeit keine eindeutigen Ergebnisse (3.4.1). Bei Recoverin konnte ein sogenannter 'Calcium-Myristoyl-Switch' nachgewiesen werden, d. h. bei Bindung von Calcium bindet Recoverin an die Membran, wobei die Myristoylgruppe in die Membran inseriert. Im Calcium-freien Zustand wird die Myristoylgruppe hingegen im Protein verborgen, welches sich dann von der Membran lösen kann (Zozulya & Stryer, 1992; Dizhoor et al., 1993; Hughes et al., 1995). Auch beim Recoverin-verwandten Hippocalcin ist die Eigenschaft zur Calcium-abhängigen Membran-Assoziation an eine Myristoylierung gekoppelt (Kobayashi et al., 1993).

GCAP1 ist heterogen mit vier verschiedenen Fettsäuren acyliert (Palczewski et al., 1994). Bislang wurde eine heterogene Acylierung nur bei retinalen Proteinen gefunden. GCAP1 ist, wie auch die beiden Photorezeptorproteine Recoverin und die Transducin α -Untereinheit, am N-terminalen Glycin über eine Amidbindung heterogen acyliert (Palczewski et al., 1994; Dizhoor et al., 1992; Neubert et al., 1992; Kokame et al., 1992). Bei allen drei Proteinen handelt es sich um die gleichen Fettsäuren C14:0 (Myristinsäure), C14:1 (Myristoleinsäure), C14:2 (nach Geigy, 1969, kein Trivialname bekannt) und C12:0 (Laurinsäure). Für Recoverin konnte gezeigt werden, daß seine unterschiedlich acylierten Formen die Rhodopsin-Phosphorylierung bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen unterschiedlich stark inhibieren (Sanada et al., 1995). Die heterogene Acylierung bietet in diesem Fall eine Möglichkeit zu Feinabstimmung. Wie am Beispiel von Transducin gezeigt werden konnte, kann die Acylierung bei verschiedenen Arten variieren (Johnson et al., 1994).

4.6 Funktionelle Expression rekombinanter GCAP1-Formen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte rekombinantes GCAP1 in *E. coli* funktionell exprimiert werden. Durch eine Erniedrigung der Expressionstemperatur von 37°C auf 25-27°C und einen Wechsel des Bakterienstammes war es möglich, große Mengen rekombinanten Proteins in löslicher Form zu exprimieren und zu reinigen. Die herabgesetzte Expressionstemperatur war vermutlich der Hauptgrund für die drastische Reduktion der 'Inclusion Bodies'. Liegt exprimiertes

Protein in den nur sehr schlecht löslichen 'Inclusion bodies' vor, so wird es in der Regel bei der Extraktion denaturiert und muß anschließend renaturiert werden.

Versuche anderer Arbeitsgruppen, GCAP1 und GCAP2 in *E. coli* zu exprimieren, scheiterten an der 'Inclusion Body'-Bildung bzw. an dem Problem, GCAP1 nach der Extraktion aus den 'Inclusion Bodies' wieder zu renaturieren (Palczewski et al., 1994; Dizhoor et al., 1995). Im Fall von GCAP1 wurde ohne Angabe von Gründen von Palczewski et al. (1994) eine trunkierte Version von GCAP1 exprimiert. Die Deletionsmutante war allerdings nicht aktiv, wobei nicht klar wurde, ob die mangelnde Aktivität an der Deletion oder an einer mißglückten Renaturierung lag. GCAP1 und GCAP2 wurden von den anderen Arbeitsgruppen in eukaryotischen Zellen exprimiert. GCAP1 wurde in seiner vollständigen Länge in Insekten-Zellen exprimiert (Gorczyca et al., 1995), GCAP2 in HEK 293 Zellen (Dizhoor et al., 1995). In beiden Fällen wurden Extrakte der Zellen hergestellt und mit Extrakten nicht-transfizierter Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Calcium-abhängigen retGC-Aktivierung verglichen. Die rekombinanten Proteine aktivierten die retGC in ROS-Membranen bei niedrigen Calcium-Konzentrationen. Für GCAP1 wurde auch die Aktivierung einer rekombinanten retGC gezeigt. Weder für rekombinantes GCAP1 noch für rekombinantes GCAP2 wurden der EC₅₀-Wert und der Hill-Koeffizient bestimmt, so daß ein Vergleich zu den nativen Proteinen nicht möglich ist (Gorczyca et al., 1995; Dizhoor et al., 1995). Eine Expression in eukaryotischen Zellen ist im Vergleich zu einer Expression in *E. coli* besonders interessant, da den *E. coli*-Zellen eine Myristoyltransferase-Aktivität fehlt (Duronio et al., 1990), die fast alle eukaryotischen Zellen besitzen (Deichaite et al., 1988). Eine genauere Charakterisierung der rekombinanten, acylierten Proteine würde klären, ob diese sich genau wie die nativen Proteine verhalten. In diesem Fall wären die in dieser Arbeit beschriebenen veränderten Eigenschaften (3.10) des rekombinanten GCAP1 allein auf die fehlende Acylierung zurückzuführen.

4.7 Ein Vergleich der Eigenschaften von nativem GCAP1 mit den rekombinanten Formen

Die beiden rekombinanten Formen GCAPX und GCAPT zeigten bei der Aktivierung der retGC identische Eigenschaften und werden daher im Folgenden nicht getrennt diskutiert.

Natives und rekombinantes GCAP1 zeigten unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf die Aktivierung der retGC. Die maximale Aktivierung bei einer niedrigen Calcium-Konzentration erreichte mit nativem GCAP1 genau die gleichen Werte, die auch in ganzen ROS-Präparationen

beobachtet werden. Mit nativem GCAP1 lag die halbmaximale Aktivierung bei 100 nM und zeigte mit einem Hillkoeffizienten von $n = 2,3-2,5$ einen hohen Grad an Kooperativität.

Eine effiziente Aktivierung mit rekombinantem GCAP1 konnte mit höheren GCAP1-Konzentrationen erreicht werden (3.10.4). Bei Aktivierung durch das rekombinante GCAP1 stieg der EC_{50} -Wert auf 210-261 nM $[Ca^{2+}]_{frei}$ an, während der Hill-Koeffizient auf 1,5-2,0 abnahm (siehe 3.10.3). Für diese Unterschiede sind mehrere Gründe denkbar:

1) Natives GCAP1 ist am N-Terminus heterogen acyliert (Palczewski et al. 1994). Da die heterologe Expression in *E. coli* rekombinante Proteine ohne posttranslationale Modifikationen ergibt, könnte das Fehlen der N-terminalen Acylierung die Veränderung von EC_{50} -Wert und Kooperativität verursachen. Eine geringere Kooperativität der Calcium-Bindung bei fehlender N-terminaler Acylierung ist bereits bei Recoverin nachgewiesen worden (Ames et al., 1995). Die fehlende Acylgruppe könnte auch eine mangelnde Membranbindung zur Folge haben (siehe unten). Eine Bindung an die Membran setzt die Dimensionalität der Protein-Diffusion von drei auf zwei Dimensionen herab und kann z. B. die effektive Konzentration eines Proteines bei einer sphärischen Zelle mit einem Radius von $r = 10 \mu m$ um den Faktor 1000 erhöhen (McLaughlin & Aderem, 1995). Dieses Modell bietet eine gute Erklärung dafür, daß rekombinantes, nicht-acyliertes GCAP1 nur in hohen Konzentrationen die retGC stimuliert (3.10.4).

2) Rekombinantes GCAP1 könnte eine beeinträchtigte Calcium-Bindung aufweisen oder könnte durch die Sonifizierung während des Lysis-Schrittes z. T. denaturiert oder falsch gefaltet sein (2.6). Die Calcium-induzierte Konformationsänderung war jedoch beim rekombinanten GCAP1 mit der des nativen Proteins identisch, wie die Calcium-bedingte Verschiebung im SDS-Gel zeigte. Die Verschiebung fand allerdings bei etwas höheren Calcium-Konzentrationen als beim nativen GCAP1 statt. Diese Veränderung steht im Einklang mit der Verschiebung des EC_{50} -Wertes (3.10.1-3.10.3).

Nach Gorczyca et al. (1995) ist die Calcium-abhängige Aktivierung der retGC durch GCAP1 und GCAP2 nahezu identisch, wobei allerdings weder EC_{50} -Wert noch Hill-Koeffizient bestimmt wurden. Dizhoor et al. (1994) finden für GCAP2 einen EC_{50} -Wert von 200 nM, der somit doppelt so hoch ist wie der in dieser Arbeit für GCAP1 bestimmte EC_{50} -Wert. Der Unterschied könnte auf unterschiedliche Calcium-Puffer und Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein oder unterschiedliche Proteineigenschaften widerspiegeln. Eine Parallelbestimmung beider GCAPs wäre sehr interessant, da für die Zelle eine Differenz von 100 nM $[Ca^{2+}]_{frei}$ in Bezug auf den EC_{50} -Wert bedeutende physiologische Konsequenzen haben kann. Da anscheinend beide

GCAPs in den Stäbchen vorliegen (4.8), wäre je nach Calcium-Konzentration eine mehr oder minder starke Stimulation der retGC durch eines der beiden Proteine denkbar. Sowohl GCAP1 als auch GCAP2 können die retGC bis zu einer Sättigung der Aktivität hin aktivieren, wobei sie sich bei gleichzeitiger Anwesenheit kaum gegenseitig inhibieren. Liegen beide in nicht-sättigenden Konzentrationen vor, so addieren sich ihre Effekte (Gorczyca et al., 1995).

4.8 Das Vorkommen von GCAP1 in der Retina

Immuncytochemische Anfärbungen von vertikalen Retinaschnitten mit einem polyklonalen Anti-GCAP1-Antikörper ergaben eine starke Färbung der Photorezeptorschicht. Dies ist in Übereinklang mit der spezialisierten Funktion von GCAP1 in der Kontrolle der retGC-Aktivität. Die Anfärbung der Zapfen deutet darauf hin, daß die gleiche oder eine sehr ähnliche Form von GCAP1 sowohl in Stäbchen als auch in Zapfen existiert. Nachdem durch *in situ* Hybridisierung das Vorkommen der GCAP1-mRNA im Myoid-Teil der Photorezeptoren gezeigt werden konnte (Palczewski et al., 1994), ergaben die Immunlokalisationen, daß GCAP1 hauptsächlich in den Außensegmenten der Stäbchen und Zapfen vorkommt (3.12; Gorczyca et al., 1995). GCAP2 konnte hingegen nur in den Stäbchen detektiert werden, wobei neben den Außensegmenten besonders der obere Teil der Innensegmente sowie auch die synaptischen Enden angefärbt wurden (Dizhoor et al., 1995). Einer Anfärbung nach einer SDS-Gelelektrophorese zufolge kommt GCAP1 in der Retina etwa dreimal häufiger vor als GCAP2 (Gorczyca et al., 1995).

Ausgehend von frischen Rinder-ROS-Präparationen korrelierte in der Gelfiltrations- und Anionenaustausch-Chromatographie die retGC-stimulierende Aktivität nur mit GCAP1. Soweit anhand von Coomassie-Blue und Silber-gefärbten Gelen zu erkennen war, enthielten die Fraktionen kein anderes Protein mit ähnlichem Molekulargewicht (16-26 kDa). In Ermangelung eines Antikörpers gegen GCAP2 konnte nicht abschließend geklärt werden, ob GCAP2 auch in unseren ROS-Präparationen enthalten war.

4.9 Ausblick

Da es mit den in dieser Arbeit konstruierten Klonen möglich ist, große Mengen rekombinantes GCAP1 herzustellen, bietet sich die Möglichkeit zu einer Kristallisation. Durch eine Kristallisation im Calcium-freien und im Calcium-beladenen Zustand könnte der Unterschied in der Ter-

tiärstruktur ermittelt werden. Die Herstellung von großen Mengen rekombinanten Proteins ermöglicht die Untersuchung der Calcium-Bindung mittels Gleichgewichtsdialyse. Diese Untersuchungen wären besonders interessant im Vergleich mit acyliertem, rekombinantem Protein, das bislang noch nicht in großen Mengen hergestellt werden kann.

Es wurden bereits erste Versuche unternommen, eine Wechselwirkung von retGC und GCAP1 mittels der Surface-Plasmon-Resonance-Technik zu zeigen. Auf diese Weise könnte die Reaktionskinetik der retGC-Aktivierung aufgeklärt werden.

Die Beziehung zwischen GCAP1 und GCAP2 ist bislang ungeklärt. Es sollten noch genauere Vergleiche der maximalen retGC-Aktivierung, der Hill-Koeffizienten und des EC_{50} -Wertes für die frei Calcium-Konzentration angestellt werden.

5.0 Zusammenfassung

Die membrangebundene Guanylatzyklase ist eines der wichtigsten Enzyme bei der Wiederherstellung des Dunkelzustandes in Photorezeptoren. Ihre Regulation ist abhängig von der freien Calcium-Konzentration und wird durch ein Calcium-Bindungsprotein vermittelt. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde dieses Calcium-Bindungsprotein identifiziert, kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert. Es erwies sich als identisch mit GCAP1, dessen Sequenz veröffentlicht wurde, während die hier beschriebenen Sequenzierungsarbeiten im Gange waren (Palczewski et al., 1994). GCAP1 hat eine Länge von 205 Aminosäuren und ein berechnetes Molekulargewicht von 23510 Da. In der Sequenz finden sich ein degeneriertes und drei konventionelle EF-Hand-Calcium-Bindungsmotive. Die höchste Identität wurde mit 39% zu NVP-3 (neural visinin-like Ca^{2+} -binding protein) gefunden. Damit gehört GCAP1 zu den Recoverin-verwandten Proteinen, einer Familie von Calcium-Bindungsproteinen, die bislang ausschließlich in neuronalem Gewebe gefunden wurden. Das rekombinante Protein wurde in *E. coli* exprimiert. Die Eigenschaften des nativen und des rekombinanten GCAP1 wurden miteinander verglichen. Beide Formen zeigten im SDS-Gel eine Calcium-abhängige Verschiebung um ca. 5 kDa. Die Aktivität von nativem und rekombinantem GCAP1 wurde anhand ihrer Fähigkeit, die retGC zu aktivieren, untersucht. Ein Zusatz von 100-125 μM ATP zu den Reaktionsansätzen verdoppelte die Aktivität der retGC unabhängig von der freien Calcium-Konzentration und GCAP1. Bei ATP-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ wurde die retGC-Aktivität inhibiert. Die Aktivierung der retGC durch natives GCAP1 war halbmaximal bei 100 nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ mit einem Hill-Koeffizienten von 2,5. Die Aktivierung durch rekombinantes GCAP1 zeigte einen niedrigeren Grad an Kooperativität ($n = 2,0$) und die halbmaximale Aktivierung wurde zu 261 nM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ verschoben. Es wurde ein polyklonaler GCAP1-Antikörper hergestellt. Eine immunocytochemische Lokalisation zeigte, daß GCAP1 in den Stäbchen und Zapfen der Retina lokalisiert ist.

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht in:

Frins, S., Bönigk, W., Müller, F., Kellner, R. & Koch, K.-W. (1996): Functional characterization of a guanylyl cyclase-activating protein from vertebrate rods. J. Biol. Chem. (in press)

6.0 Literaturverzeichnis

- Ames, A. III, Walseth, T.F., Heyman, R.A., Barad, M., Graeff, R.M. & Goldberg, N.D. (1986)**
Light-induced increases in cGMP metabolic flux correspond with electrical responses of photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 261, 13034-13042.
- Bairoch, A. (1991)**
PCGENE, nucleic acid and protein analysis software system Rel. 6.7.
- Baylor, D.A. & Hodgkin, A.I. (1973)**
Detection and resolution of visual stimuli by turtle photoreceptors. *J. Physiol.* 234, 163-198.
- Baylor, D.A., Lamb, T.D. & Yau, K.-W. (1979)**
Responses of retinal rods to single photons. *J. Physiol.* 288, 613-634.
- Benton, W.D. & Davis, R.W. (1977)**
Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196, 180-182.
- Bialojan, C. & Takai, A. (1988)**
Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.* 256, 283-290.
- Binder, B.M., Brewer, E. & Bownds, M.D. (1989)**
Stimulation of protein phosphorylation in frog rod outer segments by protein kinase activators. *J. Biol. Chem.* 264, 8857-8864.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)**
A rapid alkaline extraction for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bradford, M.M. (1976)**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987)**
XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-378.
- Cervetto, L., Lagnado, L., Perry, R.J., Robinson, D.W. & McNaughton, P.A. (1989)**
Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature* 337, 740-743.
- Chen, E.Y. & Seeburg, P.H. (1985)**
Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4, 165-170.

- Chinkers, M. & Garbers, D.L. (1989)**
The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* 245, 1392-1394.
- Clark, J.M. (1988)**
Novel non-templated nucleotide addition reactions catalysed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acid Res.* 16, 9677-9686.
- Cohen, P. (1989)**
The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508.
- Cohen, P. & Cohen, P.T.W. (1989)**
Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* 264, 21435-21438.
- Cohen, P., Holmes, C.F.B. & Tsukitani, Y. (1990)**
Okadaic acid : a new probe for the study of cellular regulation. *TIBS* 15, 98-102.
- Cohen, P, Klumpp, S. & Schelling D.L.(1989)**
An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett* 250, 596-600.
- Cook, N.J. & Kaupp, U.B. (1988)**
Solubilization, purification and reconstitution of the sodium-calcium exchanger from bovine retinal rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 263, 11382-11388.
- Cook, N.J., Hanke, W. & Kaupp, U.B. (1986)**
Identification, purification and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 585-589.
- deGrip, W.J., Daemen, F.J.M. & Bonting, S.L.M. (1972)**
Enrichment of Rhodopsin in rod outer segment membrane preparations. *Vision Res.* 12, 1697-1707.
- Duronio, R.J., Jackson-Machelski, E., Heuckeroth, R.O., Olins, P.O., Devine, C.S., Yonemoto, W., Slice, L.W., Taylor, S.S. & Gordon J.I. (1990)**
Protein N-myristoylation in *Escherichia coli*: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1506-1510.
- Deichaite, I., Casson, L.P., Ling, H.-P. & Resh, M.D. (1988)**
In vitro synthesis of pp60^{v-src}: Myristylation in a cell-free system. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4295-4301.
- Dizhoor, A. M., Ray, S., Kumar, S., Niemi, G., Spencer, M., Brolley, D., Walsh, K.A., Philipov, P.P., Hurley, J.B. & Stryer, L. (1991)**
Recoverin: A calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 251, 915-918.
- Dizhoor, A.M., Ericsson, L.H., Johnson, R.S., Kumar, S., Olshevskaya, E., Zozulya, S., Neubert, T.A., Stryer, L., Hurley, J.B. & Walsh, K.A. (1992)**
The NH₂-terminus of retinal Recoverin is acylated by a small family of fatty acids. *J. Biol. Chem.* 267, 16033-16036.

Dizhoor, A.M., Chen, C.-K., Olshevskaya, E., Sinelnikova, V.V., Phillipov, P. & Hurley, J.B. (1993)

Role of the acylated amino terminus of Recoverin in Ca^{2+} -dependent membrane interaction. *Science* 259, 829-832.

Dizhoor, A.M., Lowe, D.G., Olshevskaya, E., Laura, R.P. & Hurley, J.B. (1994)

The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, retGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron* 12, 1345-1352.

Dizhoor, A.M., Olshevskaya, E.V., Henzel, W.J., Wong, S.C., Stults, J.T., Ankoudinova, I. & Hurley, J.B. (1995)

Cloning, sequencing, and expression of a 24-kDa Ca^{2+} -binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 270, 25200-25206.

Duda, T., Goraczniak, R.M. & Sharma, R.K. (1993)

Core sequence of ATP regulatory module in receptor guanylate cyclases. *FEBS* 315, 143-148.

ECL western blotting protocols (1993)

Amersham Life Science International plc..

Ennis, P.D., Zemmour, J., Salter, R.D. & Parham, P.(1990)

Rapid cloning of HLA-A,B cDNA by using the polymerase chain reaction: Frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2833-2837.

Ertel, E.A. (1994)

Modulation of guanylate cyclase and phosphodiesterase by monovalent cations and nucleoside triphosphates in light-sensitive patches of rod outer segments. *Pflügers Arch.* 428, 372-381.

Fabiato, A. (1988)

Computer programs for calculating total from specific free or free from specific total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods in Enzymology* 157, 378-417.

Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983)

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.

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.

Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. & Lyubarsky, A.L. (1986)

Direct action of cGMP on the conductance of the retinal rod plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 856, 661-671.

Fleischman, D., Denisevich, M., Raveed, D. & Pannbacker, R.G. (1980)

Association of guanylate cyclase with the axoneme of retinal rods. *Biochim. Biophys. Acta* 630, 176-186.

- Fowles, C. & Akhtar, M. (1989)**
Interplay of phosphorylation and dephosphorylation in vision: protein phosphatases of bovine rod outer segments. *Biochemistry* 28, 9385-9391.
- Fung, B.K.K. & Stryer, L. (1980)**
Photolyzed Rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for GDP in retinal rod outer segment membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7, 25000-25004.
- Fung, B.K.K., Hurley, J.B. & Stryer, L. (1980)**
Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 152-156.
- Golub, E.I. (1988)**
'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 16, 1641.
- Goraczniak, R.M., Duda, T., Sitaramayya, A. & Sharma, R.K. (1994)**
Structural and functional characterization of the rod outer segment membrane guanylate cyclase. *Biochem. J.* 302, 455-461.
- Gorczyca, W.A., Gray-Keller, M.P., Detwiler, P.B. & Palczewski, K. (1994a)**
Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 4014-4018.
- Gorczyca, W.A., Van Hooser, P. & Palczewski, K. (1994b)**
Nucleotide Inhibitors and activators of retinal guanylyl cyclase. *Biochemistry* 33, 3217-3222.
- Gorczyca, W.A., Polans, A.S., Surgucheva, I.G., Subbaraya, I., Baehr, W. & Palczewski, K. (1995)**
Guanylyl cyclase activating protein. *J. Biol. Chem.* 270, 22029-22036.
- Goto, K., Miki, N. & Kondo, H. (1989)**
An immunohistochemical study of pinealocytes of chicks and some other lower vertebrates by means of visinin (retinal cone specific protein) immunoreactivity. *Arch. Histol. Cytol.* 52, 451-458.
- Gray-Keller, M.P., Polans, A.S., Palczewski, K. & Detwiler, P.B. (1993)**
The effect of Recoverin-like Calcium-binding proteins on the photoresponse of retinal rods. *Neuron* 10, 523-531.
- Haavik, J., Schelling, D.L., Campbell, D.G., Andersson, K.K., Flatmark, T. & Cohen P. (1989)**
Identification of protein phosphatase 2A as the major tyrosine hydroxylase phosphatase in adrenal medulla and corpus striatum: evidence from the effects of oadaic acid. *FEBS lett.* 251, 36-42.
- Hagenbuchle, O., Borey, R. & Young, R.A. (1980)**
Tissue-specific expression of mouse α -amylase genes: Nucleotide sequence of isoenzyme RNAs from pancreas and salivary gland. *Cell* 21, 179-187.
- Hayashi, F. & Yamazaki, A. (1991)**
Polymorphism in purified guanylate cyclase from vertebrate rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4746-4750.

- Haynes, L.W. & Yau, K.-W. (1985)**
Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membranes of catfish cones. *J. Physiol.* 429, 451-481.
- Hurley, J.B., Dizhoor, A.M., Ray, S. & Stryer, L. (1993)**
Recoverin's role: Conclusion withdrawn. *Science* 260
- Johnson, R.S., Ohguro, H., Palczewski, K., Hurley, J.B., Walsh, K.A. & Neubert, T. (1994)**
Heterogeneous N-acylation is a tissue- and species-specific posttranslational modification. *J. Biol. Chem.* 269, 21067-21071.
- Jung, A., Sippel, A.E., Grez, M. & Schutz, G. (1980)**
Exons encode functional and structural units of chicken lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5759-5763.
- Kajimoto, Y., Shirai, Y., Mukai, H., Kuno, T. & Tanaka, C. (1993)**
Molecular cloning of two additional members of the neural Visinin-like Ca^{2+} -binding protein gene family. *J. Neurochem.* 61, 1091-1096.
- Kaupp, U.B. (1991)**
The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci.* 14, 150-157.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. & Numa, S. (1989)**
Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* 342, 762-766.
- Kawamura, S. (1993)**
Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature* 362, 855-857.
- Kawamura, S. & Murakami, M. (1991)**
Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods. *Nature* 349, 420-423.
- Kawamura, S., Takamatsu, K. & Kitamura, K. (1992)**
Purification and characterization of S-Modulin, a calcium-dependent regulator of cGMP phosphodiesterase in frog rod photoreceptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 186, 411-417.
- Kobayashi, M., Takamatsu, K., Saitoh, S., Miura, M. & Noguchi, T. (1992)**
Molecular cloning of Hippocalcin, a novel calcium-binding protein of the Recoverin family exclusively expressed in Hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 511-517.
- Kobayashi, M., Takamatsu, K., Saitoh, S. & Noguchi, T. (1993)**
Myristoylation of Hippocalcin is linked to calcium-dependent membrane association properties. *J. Biol. Chem.* 268, 18898-18904.
- Koch, K.-W. (1991)**
Purification and identification of photoreceptor guanylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 266, 8634-8637.

- Koch K.-W. & Stryer, L. (1988)**
Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature* 334, 64-66.
- Koch, K.-W., Eckstein, F. & Stryer, L. (1990)**
Stereochemical course of the reaction catalyzed by guanylate cyclase from bovine retinal rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 265, 9659-9663.
- Koch, K.-W., Stecher, P. & Kellner, R. (1994)**
Bovine retinal rod guanyl cyclase represents a new N-glycosylated subtype of membrane-bound guanyl cyclases. *Eur. J. Biochem.* 222, 589-595.
- Kokame, K., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Takao, T. & Shimonishi, Y. (1992)**
Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein α -subunit. *Nature* 359, 749-752.
- Koller, K.J., de Sauvage, F.J., Lowe, D.G. & Goeddel, D.V. (1992)**
Conservation of the kinase-like regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2581-2590.
- Koutalos, Y., Nakatani, K., Tamura, T. & Yau, K.-W. (1995a)**
Characterization of guanylate cyclase activity in single retinal rod outer segments. *J. Gen. Physiol.* 106, 863-890.
- Koutalos, Y., Nakatani, K. & Yau, K.-W. (1995b)**
The cGMP-phosphodiesterase and its contribution to sensitivity regulation in retinal rods. *J. Gen. Physiol.* 106, 891-921.
- Kozak, M. (1984)**
Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eucaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.* 12, 857-872.
- Kühn, H. (1980)**
Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes. *Nature, London* 283, 587-589.
- Kühn, H., Bennett, N., Michel-Villaz, M. & Cabre, M. (1981)**
Interactions between photoexcited Rhodopsin and GTP-binding protein: Kinetic and stoichiometric analysis from light-scattering changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6873-6877.
- Kühn, H., Hall, S.W. & Wilden, U. (1984)**
Light-induced binding of 48 kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of Rhodopsin. *FEBS Lett.* 176, 473-478.
- Kyhe-Anderson, J. (1984)**
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10, 203-209.
- Lagnado, L. & Baylor, D.A. (1992)**
Signal flow in visual transduction. *Neuron* 8, 995-1002.

- Lagnado, L. & Baylor, D.A. (1994)**
Calcium controls light-triggered formation of catalytically active Rhodopsin. *Nature* 367, 273-277.
- Lagnado, L., Cervetto, L. & McNaughton, P.A. (1992)**
Calcium homeostasis in the outer segments of retinal rods from the tiger salamander. *J. Physiol.* 455, 111-142.
- Laemmli, U.K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambrecht, H.-G. & Koch, K.-W. (1991)**
A 26 kDa calcium binding protein from bovine rod outer segments as modulator of photoreceptor guanylate cyclase. *EMBO Journal* 10, 793-798.
- Lambrecht, H.-G. & Koch, K.-W. (1992)**
Recoverin, a novel calcium binding protein from vertebrate photoreceptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1160, 63-66.
- Lenz, S.E., Henschel, Y., Zopf, D., Voss, B. & Gundelfinger, E.D. (1992)**
VILIP, a cognate protein of the retinal calcium binding proteins Visinin and Recoverin, is expressed in the developing chicken brain. *Mol. Brain Res.* 15, 133-140.
- Lowe, D.G., Dizhoor, A. M., Liu, K., Gu, Q., Spencer, M., Laura, R., Lu, L. & Hurley J.B. (1995)**
Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (retGC), retGC-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5535-5539.
- Liu, X., Seno, K., Nishizawa, Y., Hayashi, F., Yamazaki, A., Matsumoto, H., Wakabayashi, T. & Usukura, J. (1994)**
Ultrastructural localization of retinal guanylate cyclase in human and monkey retinas. *Exp. Eye res.* 59, 761-768.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970)**
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159-162.
- Matthews, H.R., Murphy, R.L.W., Fain, G.L. & Lamb, T.D. (1988)**
Photoreceptor light adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration. *Nature* 334, 67-69.
- Martell, A. E. & Smith, R.M. (1974)**
Critical stability constants, Vol. 1. Plenum, New York.
- Meyer, T.S. & Lamberts, B.L. (1965)**
Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* 107, 144-145.
- McCarthy, S.T., Younger, J.P. & Owen W.G. (1994)**
Free calcium concentrations in bullfrog rods determined in the presence of multiple forms of Fura-2. *Biophys. J.* 67, 2076-2089.

- Mullis, K.B., Faoona, F.A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, H. (1986)**
Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring harbour Symp. Quant. Biol. 51, 263-273.
- Nakano, A., Terasawa, M., Watanabe, M., Usuda, N., Morita, T. & Hidaka, K. (1992)**
Neurocalcin, a novel calcium binding protein with three EF-hand domains, expressed in retinal amacrine cells and ganglion cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186, 1207-211.
- Nakatani, K. & Yau, K.-W. (1988)**
Calcium and light adaptation in retinal rods and cones. Nature 334, 69-71.
- Neubert, T.A., Johnson, R.S., Hurley, J.B. & Walsh, K.A. (1992)**
J. Biol. Chem. 267, 18274-18277.
- Nunn, B.J. & Baylor, D.A. (1982)**
Visual transduction in the retinal rods of the monkey *Macaca fascicularis*. Nature 229, 726-728.
- Okazaki, K., Watanabe, M., Ando, Y., Hagiwara, M., Terasawa, M. & Hidaka, K. (1992)**
Full sequence of Neurocalcin, a novel calcium binding protein abundant in central nervous system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 185, 147-153.
- Olson, E.N. & James, G. (1990)**
The biology of lipid-containing membrane proteins. NATO ASI Series H 40, 15-27.
- Palczewski, K., McDowell, J.H. & Hargrave, P.A. (1988)**
Purification and characterization of Rhodopsin kinase. J. biol. Chem. 266, 14067-14073.
- Palczewski, K., Subbaraya, I., Gorczyca, W.A., Helekar, B.S., Ruiz, C.C., Ohguro, H., Huang, J., Zhao, X., Crabb, J.W., Johnson, R.S., Walsh, K.A., Gray-Keller, M.P., Detwiler, P.B. & Baehr, W. (1994)**
Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein. Neuron 13, 395-404.
- Peichl, L. (1990)**
Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina. Optometrie 3, 3-12.
- Pepe, I.M., Panfoli, I. & Cugnoli, C. (1986)**
Guanylate cyclase in rod outer segments of the toad retina. FEBS Lett. 203, 73-76.
- Pongs, O., Lindemeier, J., Zhu, X.R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jentgens, I., Lambrecht, H.-G., Koch, K.-W., Schwemer, J., Rivoisechi, R., Mallart, A., Galceran, J., Canal, I., Barbas, J.A. & Ferrus, A. (1993)**
Frequenin - a novel calcium binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. Neuron 11, 15-28.
- Pozdnyakov, N., Yoshida, A., Cooper, N.G.F., Margulis, A., Duda, T., Sharma, R.K. & Sitaramayya, A. (1995)**
A novel calcium-dependent activator of retinal rod outer segment membrane guanylate cyclase. Biochemistry 34, 14279-14283.

Proudfoot, N.J. & Brownlee, G.G. (1976)

3' Non coding region sequences in eucaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211-214.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H. (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sanada, K., Kokame, K., Yoshizawa, T., Takao, T., Shimonishi, Y. & Fukada, Y. (1995)

Role of heterogeneous N-terminal acylation of Recoverin in Rhodopsin phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270, 15459-15462.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Schein, C.H. & Noteborn, M.H.M. (1988)

Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Biotechnology* 6, 291-294.

Schmitz, G. (1994)

Calciumbindungsstudien an Recoverin, einem Protein aus der Retina. Diplomarbeit, Universität zu Bonn

Schnetkamp, P.P.M. (1989)

Na-Ca or Na-Ca-K exchange in rod photoreceptors. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 54, 1-29.

Schnetkamp, P.P.M. & Daemen, F.J.M. (1982)

Isolation and characterization of osmotically sealed bovine rod outer segments. *Methods of Enzymology* 81, 110-116.

Schnetkamp, P.P.M. & Szerencsei, R. (1993)

Intracellular Ca^{2+} sequestration and release in intact bovine retinal rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 268, 12449-12457.

Semple-Rowland, S.L., Helekar, B., Ruiz, C., Zhao, X., Palczewski & Baehr, W. (1995)

Normal and rd/rd mutant chicken retina guanylate cyclase-activating protein (GCAP). Abstract ARVO Meeting, 1995.

Shirley, C.E. & Lee, A. (1980)

[^3H]Ouabain autoradiography of frog retina. *J. Cell. Biol.* 85, 313-324.

Sitaramayya, A. (1986)

Rhodopsin kinase prepared from bovine rod disk membranes quenches light activation of cGMP phosphodiesterase in a reconstituted system. *Biochemistry* 25, 5460-5468.

Stryer, L. (1986)

Cyclic GMP cascade of vision. *Ann. Rev. Neurosci.* 9, 87-119.

Stryer, L. (1990)

Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft.

- Subbaraya, I., Ruiz, C.C., Helekar, B.S., Zhao, X., Gorczyca, W.A., Pettenati, M.J., Rao, P.N., Palczewski, K. & Baehr, W. (1994)**
Molecular characterization of human and mouse photoreceptor guanylate cyclase-activating protein (GCAP) and chromosomal localization of the human gene. *J. Biol. Chem.* 269, 31080-31089.
- Subbaraya, I., Ruiz, C.C. & Baehr, W. (1995)**
Cloning and expression of frog (*Rana pipiens*) guanylyl cyclase activating protein (GCAP). Abstract ARWO Meeting, 1995.
- Shyjan, A.W., de Sauvage, F.J., Gillett, N.A., Goeddel, D.V. & Lowe, D.G. (1992)**
Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase. *Neuron* 9, 727-737.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1987)**
DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 4767-4771.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1989)**
Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by *in vitro* mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 264, 6447-6458.
- Takamatsu, K. & Uyemura, K. (1992)**
Identification of Recoverin-like immunoreactivity in mouse brain. *Brain Res.* 571, 350-353.
- Takamatsu, K., Kitamura, K. & Noguchi, T. (1992)**
Isolation and characterization of Recoverin-like Ca^{2+} -binding protein from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 245-251.
- Torre, V., Matthews, H.R. & Lamb, T.D. (1986)**
Role of calcium in regulating the cyclic GMP cascade of phototransduction in retinal rods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7109-7113.
- Towbin, H., Staehlin, T. & Gordon, J. (1979)**
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Towler, D.A., Eubanks, S.R., Towery, R.S., Adams, S.P. & Glaser, L. (1987a)**
Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* 262, 1030-1036.
- Towler, D.A., Adams, S.P., Eubanks, S.R., Towery, D.S., Jackson-Machelski, E., Glaser, L. & Gordon, J.I. (1987b)**
Purification and characterization of a yeast myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2708-2712.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979)**
Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615-619.
- Vuong & Cabre (1991)**
Deactivation kinetics of the transduction cascade of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9813-9817.

Wilden, U. & Kühn, H. (1982)

Light-dependent phosphorylation of Rhodopsin: number of phosphorylation sites. *Biochemistry* 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.

Wilson, E. M. & Chinkers, M. (1995)

Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* 34, 4696-4701.

Yamagata, K., Goto, K., Kuo, C.-H., Kondo, H. & Miki, N. (1990)

Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells. *Neuron* 2, 469-476.

Yang, R.-B., Foster, D.C., Garbers, D.L. & Fülle, H.-J. (1995)

Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 602-606.

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.

Zimmerman, A.L., Yamanaka, G., Eckstein, F., Baylor, D.A. & Stryer, L. (1985)

Interaction of hydrolysis-resistant analogs of cyclic GMP with the phosphodiesterase and light-sensitive channel of retinal rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8813-8817.

7.0 Anhang

```

1  ACAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGCCACAGCCCCCGTGACCTCCTCTCTCTGCTTAC
                                     5'-GGA
61  CTCCTCTAGTCATTTCCCTGCGCTTTGGGATTCAGGCCCTTCCTCGCTCAGATCTGGGGA
    ACTCAGGCTTGTG-3' (911)
121  ACTCAGGCTTGTGAGCGAGGAGGGCCAGTGTTAGGAAGCCAGCCGCGCTGGTGTGGGG
                                     5'-ATCAGCggatCcataGaagGAcgGATG
                                     5'-taGaagGAtCcATG
181  ACCAGCGGTGAAAAGAACCGGTCCCCCTTGGGCATCAGCCTCCCGCAGGCCGTGAGCGATG
    GGAACATTATGG-3' (979)
    GGAACATTATGGAC-3' (1257)
241  GGAACATTATGGACGGTAAGTCGGTGGAGGAGCTGAGCAGCACCGAGTGCCACCAGTGG
    5'-TTYATGACNGARTGYCC-3' (823)
301  TACAAGAAGTTCATGACAGAGTGCCCTCCGGCCAGCTACCCCTCTACGAGTTCGCCAG
    3'-TTCTTCAAGTACTGTCTC-5' (897)
    5'-TCAAGAACCTGAGCC-3' (1268)
361  TTCTTCGGCCTCAAGAACCTGAGCCCGTGGGCCAGCCAGTACGTGGAGCAGATGTTTGAG
421  ACCTTTGACTTCAACAAAGACGGCTACATTGATTTTCATGGAGTACGTGGCGGCTCTGAGC
    3'-ATRTADCTRAARTACCTYAT-5' (828)
                                     5'-TACGACGTG
481  CTGGTCCTCAAGGGGAAGGTGGAACAGAAGCTGCGTTGGTACTTCAAGCTCTACGACGTG
    GACGGCAA-3' (896)
541  GACGGCAACGGATGCATCGACCGCGACGAGCTGCTCACCATCATCCGGGCCATCCGAGCC
                                     5'-CTCC
601  ATTAACCCCTGCAGCGACTCGACCATGACCGCCGAGGAGTTCACCGATACAGTGTCTCC
    AAGATTGACGTCA-3' (912)
661  AAGATTGACGTCAATGGGGATGGGGAACCTCTCCCTAGAGGAGTTCATGGAGGGCGTCCAG
    3'-GAGGGATCTCCTCAAGT-5' (913)
721  AAGGACCAGATGCTCTTGGACACGCTGACCCGAAGCTTGGACCTTACCCGCATTGTGCGC
781  AGGCTCCAGAATGGAGAGCAGGATGAGGAGGGGGCTAGCGGCAGGGAAACGGAGGCCGCG
    3'-GC
    3'-CGC
841  GAGGCCGACGGCTGAGCTCACTGCCTACTCTTTCTGTACTGGGGAGGGTGTGTACGGTGG
    CTCCGGCTGCCGACTattacttaaGATG-5' (1290)    3'-CACACATGCCACC
    CTCCGGCTGCCGACTactcctAgGGATGAG-5' (929)
901  TGCCTGCTGTTTCACTGTTGTTTTAATACTAGATAGAGTCTACTG
    ACGGA-5' (898)

```

Abb. 7.1: Zur Sequenzierung von GCAP1 verwendete Oligonukleotide

Primer, deren Sequenzen dem kodierenden Strang der cDNA entsprechen, stehen über der cDNA-Sequenz. Unter der cDNA-Sequenz sind die Primer aufgeführt, die komplementär zum kodierenden Strang sind. Die Bezeichnung der Primer ist in Klammern angegeben. Oligonukleotide, die im Text nicht erwähnt sind, wurden ausschließlich zum Sequenzieren der GCAP1-Klone verwendet. Nukleotide innerhalb der Primersequenzen, die von der cDNA-Sequenz abweichen, sind mit kleinen Buchstaben oder R/Y/D/N bezeichnet.

R: A/G Y: C/T D: A/G/T N: A/C/G/T

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
M13- Universal- Primer	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Sequenzierung
M13-Revers- Primer	3'-CAGGAAACAGCTATGAC-5'	Sequenzierung

Tab. 7.1: Weitere zum Sequenzieren oder als PCR-Primer verwendete Oligonukleotide

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung I (IBI I) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Priv.-Doz. Karl-Wilhelm Koch für die Überlassung des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Korrektur der Arbeit,
- Frau Doris Höppner-Heitmann und Herrn Rudolf Esser für die unzähligen Netzhautpräparationen,
- Herrn Dr. Wolfgang Bönigk für seine unglaubliche Geduld und Hilfsbereitschaft bei den molekularbiologischen Arbeiten,
- Herrn Dr. Arnd Baumann für viele hilfreiche Ratschläge,
- Herrn Dr. Frank Müller für die Durchführung der immunhistochemischen Versuche und die Überlassung der Abbildungen,
- Herrn Dr. Roland Kellner, Mainz, für die Sequenzierungsarbeiten an den proteolytisch gewonnenen Peptiden,
- Herrn Dipl.-Chem. Martin Zoche für die gute Zusammenarbeit,
- Frau Dipl.-Biol. Gabriele Schmitz für die Durchführung der ⁴⁵Calcium-Autoradiographie,
- Herrn Prof. Michael Melkonian, Köln, für die Überlassung des Proteins Centrin und des Centrin-Antikörpers,
- Herrn Prof. Eckart Gundelfinger, Magdeburg, für die Überlassung des Proteins VILIP und des VILIP-Antikörpers.

Jül-3269
August 1996
ISSN 0944-2952