



Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1

***Dynamik der cGMP-Synthese in Sehzellen -
Regulation membranständiger Guanylatzyklasen
durch modifizierte Kalzium-Sensor-Proteine***

Andreas Helten

***Dynamik der cGMP-Synthese in Sehzellen -
Regulation membranständiger Guanylatzyklasen
durch modifizierte Kalzium-Sensor-Proteine***

Andreas Helten

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4213

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung 1 Jül-4213

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2006)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung

Die membrangebundenen Guanylatzyklasen GC1 und GC2 sind wichtig für die Phototransduktion in Sehzellen. Sie bestimmen, im Wechselspiel mit einer Phosphodiesterase, die Konzentration des intrazellulären Signalmoleküls zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen werden die GCs von Guanylatzyklase aktivierenden Proteinen (GCAP1 und GCAP2) aktiviert. Die cGMP-Konzentration steigt und die Sehzelle adaptiert. Während dieses Vorgangs bildet ein GC-Dimer mit einer unbekanntem Zahl von GCAPs einen Proteinkomplex. Die Stöchiometrie und die Kalzium-abhängigen Konformationsänderungen innerhalb dieses Proteinkomplexes sind unbekannt.

GCAP2 besitzt drei Cystein-Reste, interessanterweise jeweils einen im ersten und dritten Kalzium-Bindungs-Motiv (EF-Hand-Motiv). In der vorliegenden Arbeit wurden Cystein-Mutanten von GCAP2 generiert, heterolog exprimiert und gereinigt. Die EC_{50} - und IC_{50} -Werte der Cystein-Mutanten waren denen von GCAP2-Wildtyp ähnlich. Jedoch aktivierten Cystein-Mutanten, die im ersten EF-Hand-Motiv keinen Cystein-Rest besaßen, die GCs schwächer, als dies GCAP2-Wildtyp tat. Dies zeigt, wie bedeutsam dieser Cystein-Rest für die GC-Regulation ist.

In weiteren Experimenten untersuchte ich die Zugänglichkeit der Cystein-Reste für die thiolreaktive Substanz 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid). Die Cystein-Reste im ersten und dritten EF-Hand-Motiv waren nur bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen zugänglich. Dies war überraschend, da für das erste EF-Hand-Motiv nur eine sehr geringe Kalzium-Affinität angenommen wird und demzufolge keine Konformationsänderung zu erwarten war. Durch die Bestimmung der Kalzium-Sensitivitäten der DTNB-Reaktionen, die als apparente Kalzium-Affinitäten der EF-Hand-Motive interpretiert werden können, konnte ich folgendes Modell erstellen: Die Kalzium-Dissoziation am dritten EF-Hand-Motiv induziert eine Konformationsänderung, die zur GC-Aktivierung führt. Ferner konnte ich nachweisen, daß Magnesium die apparenten Kalzium-Affinitäten des ersten EF-Hand-Motivs von GCAP2 und die des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAP1 erhöht.

Ich koppelte thiolreaktive Fluophore an die Cystein-Mutanten. Dadurch wollte ich Kalzium-abhängige Konformationsänderungen im Bereich der Fluophore messen. Ebenso wollte ich durch die Messung des Förster Resonanz Energie Transfers zwischen fluoreszenzmarkierten GCAP2-Mutanten und fluoreszenzmarkierten GCAP1-Mutanten die gleichzeitige Bindung beider GCAP-Isoformen an die GC1 nachweisen. Beide Versuchansätze brachten negative Ergebnisse. Auch mit löslichen, enzymatisch aktiven GC1- Konstrukten ließen sich nicht die erhofften Ergebnisse erzielen.

Abstract

Membrane bound guanylate cyclases GC1 and GC2 are important for the phototransduction in photoreceptors. They regulate, in an interplay with a phosphodiesterase, the concentration of the intracellular messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP). At low calcium-concentrations both GCs are activated by guanylate cyclase activating proteins (GCAP1 and GCAP2). The cGMP-concentration increases and the photoreceptor adapts. If GCs become activated a GC-dimer forms a complex with an unidentified number of GCAPs. The stoichiometry and calcium dependent conformational changes within this complex are unknown.

GCAP2 has three cysteine residues, interestingly one in the first and one in the third calcium-binding-motif (EF-hand-motif). In this work cysteine mutants of GCAP2 were generated, heterologously expressed, and purified. All cysteine mutants exhibited EC_{50} - and IC_{50} -values comparable to GCAP2-wildtype. However, mutants with no cysteine residue in the first EF-Hand-motif activated GCs weaker compared to GCAP2-wildtype. This indicates an important function of this cysteine residue in GC-regulation.

In further experiments I investigated the accessibility of cysteine residues for the thiolreactive substance 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid). The cysteine residues within the first and third EF-hand-motif were only accessible at low calcium concentrations. This was surprising because the first EF-hand-motif is assumed to bind calcium with only very low affinity. Thus no calcium induced conformational change was expected. By determining the calcium sensitivities of the DTNB-reaction, which could be interpreted as apparent calcium affinities of the EF-hand-motifs, I was able to develop following model: calcium dissociation from the third EF-hand-motif in GCAP2 induces a conformational change that causes GC-activation. Furthermore I demonstrated that magnesium increases the apparent calcium affinities of the first EF-hand-motif in GCAP2 and of the first and third EF-hand-motif in GCAP1.

I coupled thiolreactive dyes to cysteine mutants of GCAP2. Thereby I wanted to detect conformational changes in the vicinity of the dye. Furthermore, by recording Förster Resonance Energy Transfer between dye labeled GCAP1- and GCAP2-mutants I wanted to show the simultaneous binding of both GCAP isoforms to GC1. Both experimental approaches gave negative results. Using a soluble, enzymatic active GC1-construct instead of wildtype GC1 produced also not the expected results.

Zusammenfassung	i
Abstract	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	vii
Aminosäuren	ix
1 Einleitung	1
1.1 Lichtwahrnehmung	1
1.1.1 Stäbchensehzellen und Zapfensehzellen	1
1.1.2 Die Phototransduktion in der Stäbchensehzele	2
1.1.3 Lichtadaptation	5
1.2 Partikuläre Guanylatzyklasen	6
1.2.1 GC1 und GC2	8
1.3 Die Regulatoren der GC1 und GC2 in Sehzellen: GCAPs	9
1.4 Die Regulation der GC1-Aktivität durch GCAPs	10
1.4.1 Interaktionsstellen zwischen GC1 und GCAPs	12
1.4.2 Modelle der GC-Aktivierung durch GCAPs	15
1.5 Die GC1 außerhalb des Außensegments von Sehzellen	16
1.6 Fragestellung und experimenteller Ansatz	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Chemikalien und Materialien	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Geräte und Materialien	20
2.1.3 Bakterienstämme	20
2.1.4 Plasmide	21
2.1.5 Molekulargewichtsstandards	21
2.1.5.1 Proteinstandards	21
2.1.5.2 DNA-Standards	21
2.2 Molekularbiologische Arbeiten	22
2.2.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	22
2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA	22
2.2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> BL21 codon plus	22
2.2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> XL1 blue	23
2.2.3 Phenol / Chloroform-Extraktion	23
2.2.4 Ethanol-Präzipitation von DNA	23

2.2.5	Mini-Plasmid-Präparation	24
2.2.6	Maxi-Plasmid-Präparation	24
2.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.2.7.1	Konzentrationsbestimmung von DNA mit Hilfe von Agarosegelen	25
2.2.7.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.2.8	DNA-Gelelektrophorese	25
2.2.9	Elution von DNA aus Agarosegelen	26
2.2.10	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
2.2.11	Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.2.12	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, <i>polymerase chain reaction</i>)	27
2.2.12.1	Oligonukleotide	27
2.2.12.2	Bedingungen für die PCR-Reaktionen	27
2.2.12.3	Reinigung der PCR-Produkte	28
2.2.13	DNA-Sequenzierung mittels LICOR-Sequenzierer	28
2.2.14	Generierung genetisch veränderter GCAPs	29
2.2.15	Generierung löslicher GC1-Konstrukte	30
2.3	Heterologe Genexpression in tsA-Zellen	31
2.3.1	Transiente Expression	31
2.3.2	Präparation von tsA-Zellmembranen	32
2.4	Heterologe Genexpression in Sf9-Zellen	32
2.5	Allgemeine biochemische Methoden	33
2.5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33
2.5.1.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	33
2.5.1.2	Amido-Schwarz Proteinbestimmung	33
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.5.3	Western Blot	35
2.5.4	<i>reversed phase</i> HPLC	36
2.5.4.1	Trennung von Proteinen	37
2.5.4.2	Trennung von Nukleotiden	37
2.6	Expression und Reinigung von GCAPs	38
2.6.1	Expression von GCAPs	38
2.6.2	Bakterien-Aufschluß und Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	38
2.6.3	Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie	39
2.6.4	Lyophilysieren und Lagerung von GCAPs	40

2.7	Fluoreszenzmarkierung von GCAPs	40
2.8	DTNB-Reaktion von GCAPs	41
2.9	Reinigung von CitrinGC1cyt	43
2.10	Präparation von ROS-Membranen	43
2.11	Bestimmung der GC-Aktivität	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Charakterisierung von GCAP2-Mutanten	45
3.1.1	Expression, Reinigung und Identifizierung von GCAP2-Mutanten	46
3.1.2	Die elektrophoretische Mobilität von GCAP2-Mutanten	49
3.1.3	Der Myristylierungsgrad der GCAP2-Mutanten	50
3.1.3	Regulation von GCs durch GCAPs	52
3.1.3.1	GC-Assays mit ROS-Membranen	53
3.1.3.2	GC-Assays mit heterolog exprimierten GCs	58
3.1.3.2a	GC-Assays mit hetGC1	59
3.1.3.2b	GC-Assays mit hetGC2	63
3.1.4	Zwischenbilanz der bisherigen Ergebnisse	68
3.2	Die Zugänglichkeit der Cystein-Reste von GCAP2	68
3.2.1	Die Zugänglichkeit zweier Cystein-Reste ist Kalzium-abhängig	69
3.2.2	Kalzium-Sensitivität der DTNB-Reaktionen	71
3.2.2.1	Kalzium-Sensitivität der DTNB-Reaktionen von GCAP2-Mutanten	72
3.2.2.2	Kalzium-Sensitivität der DTNB-Reaktionen von GCAP1-Mutanten	74
3.2.3	Zusammenfassung der DTNB-Experimente	75
3.3	Fluophore als Monitor für Konformationsänderungen	77
3.3.1	Fluophore als Monitor für Kalzium-abhängige Konformationsänderungen von GCAP2	77
3.3.2	Fluophore als Monitor für Kalzium-abhängige Interaktionen des GC1/GCAP-Systems	81
3.3.3	Zusammenfassung der Experimente mit fluoreszenzmarkierten Proteinen	87
4	Diskussion	88
4.1	Einfluß der AS-Austausche auf die GC-Regulation	88
4.2	Die GC2 wird von GCAP1 und GCAP2 reguliert	91
4.3	Zwei Cystein-Reste von GCAP2 reagieren Kalzium-abhängig mit DTNB	92

4.3.1	Die Kalzium-Affinitäten des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAPs	93
4.4	Fluophore als Monitor für Kalzium-abhängige Konformationsänderungen	96
4.4.1	Fluophore als Monitor für Konformationsänderungen von GCAP2	96
4.4.2	Fluophore als Monitor für Kalzium-abhängige Interaktionen des GC1/GCAP-Systems	96
4.5	Ausblick	98
5	Literaturverzeichnis	99

Anhang

AS-Sequenz der GC1		A
Vergleich der AS-Sequenzen von GCAP1 und GCAP2		B
DNA-Sequenz von GCAP2 mit Mutagenese-Primern		C
Vergleich der AS-Sequenzen von eYFP und Citrin		D

Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp / kbp	Basenpaare / Kilobasenpaare
cGMP	Guanosin-3':5'-monophosphat; zyklisches Guanosinmonophosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis[2-aminoethoxy]ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FPLC	Flüssigkeits-Chromatographie, <i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm bzw. Normal-Fallbeschleunigung (9,81 m · sek ⁻²)
GC	Guanylatzyklase
GCAP	Guanylatzyklase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HMW	Protein-Molekulargewichtsstandard für den hochmolekularen Bereich
HPLC	Hochdruck-Chromatographie, <i>high pressure liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactosid
KAc	Kaliumacetat
Da / kDa	Dalton / Kilodalton
l	Liter

LMW	Protein-Molekulargewichtsstandard für den niedermolekularen Bereich
M	Molar (mol / l)
m	Meter
min	Minute(n)
msek	Millisekunde
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NMT	N-terminale Myristoyltransferase aus <i>S.cerevisiae</i>
NTA	Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	Stäbchen-Außensegment
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiaminomethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol Umsatz} \cdot \text{min}^{-1}$)
ü.N.	Über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v / v	Volumen zu Volumen
w / v	Gewicht zu Volumen
Zaprinast	1,4-Dihydro-5-[2-propoxyphenyl]-7H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-on
λ	Wellenlänge

Einbuchstabencode der AS

<u>Aminosäure</u>	<u>Einbuchstabencode</u>
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutamat	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1 Einleitung

1.1 Lichtwahrnehmung

Im Laufe der Evolution entwickelten viele Organismen die Fähigkeit Licht, und somit ihre Umgebung, wahrzunehmen. Dabei entstanden so unterschiedliche Organe zur Lichtwahrnehmung wie das Grubenaug der Plattwürmer, das Komplexauge der Insekten oder das Linsenaug der Wirbeltiere. Ein gemeinsames Merkmal aller Augenformen ist, daß sie optische Reize in elektrische Information wandeln. Dieser Prozeß heißt Phototransduktion. Da ich während meiner Doktorarbeit Proteine der Phototransduktion im Rinderauge untersuchte, werde ich nur auf das Linsenaug eingehen. Im Linsenaug wird einfallendes Licht am dioptischen Apparat (die Gesamtheit aller lichtbrechenden Elemente) gebrochen und dadurch auf die Netzhaut fokussiert. Dort wird das Licht von Sehzellen, spezialisierten Nervenzellen in denen die Phototransduktion stattfindet, detektiert. Die Signale der Sehzellen werden dann über die Nervenzellen der Netzhaut und über den Sehnerv an den visuellen Cortex des Gehirns weitergeleitet. (zur Übersicht: Hubel, 1988)

1.1.1 Stäbchensehzellen und Zapfensehzellen

Zwei Arten von Sehzellen nehmen Licht in der Netzhaut wahr: die Stäbchensehzellen und die Zapfensehzellen. Die Stäbchensehzellen sind auf das farblose Sehen bei niedrigen Lichtintensitäten spezialisiert (skotopisches System) und die Zapfensehzellen auf das farbige Sehen bei hohen Lichtintensitäten (photopisches System). Trotz dieser unterschiedlichen Aufgaben sind die Stäbchen- und die Zapfensehzelle ähnlich aufgebaut (siehe Abb. 1.1). Sie gliedern sich in Außensegment, Innensegment und Axon. Das Außensegment einer Rinderstäbchensehzelle, welches bis 1 μm dick und ca. 20 μm lang ist, enthält bis zu 1000 dichtgepackte Membranstapel, die Disks. Die Außenregionen der Disks sind über das Zytoskelett mit der Plasmamembran verbunden. In den Diskmembranen befindet sich der Sehfärbstoff Rhodopsin, weshalb das Außensegment der Lichtsensor der Sehzelle ist. Das Außensegment einer Zapfensehzelle ist kürzer und dicker. Die Disks der Zapfensehzelle werden durch Einstülpungen der Plasmamembran gebildet. Proteine, die in der Stäbchensehzelle in den Diskmembranen lokalisiert sind, befinden sich in der Zapfensehzelle in der Plasmamembran. Am Übergang vom Außen- zum Innensegment ist die Sehzelle verjüngt und durch Cilien stabilisiert. Das Innensegment der Sehzelle dient allgemeinen

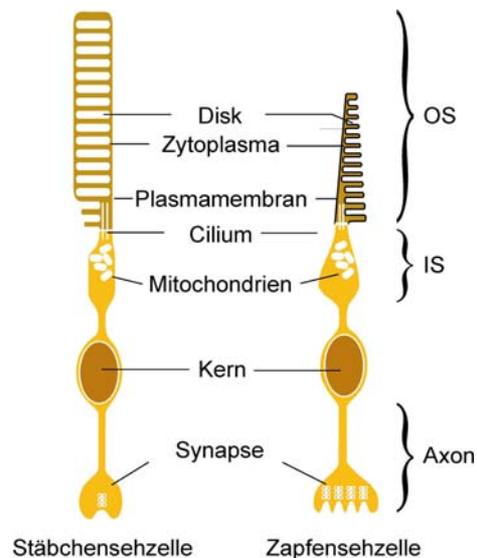


Abbildung 1.1: Aufbau einer Stäbchen- und einer Zapfenzelle. OS: Außensegment, IS: Innensegment.

Zellfunktionen und wird hauptsächlich von Mitochondrien ausgefüllt. Der Zellkern und das Axon bilden die äußere nukleäre Schicht der Retina. Die Synapse der Sehzelle ist in der äußeren plexiformen Schicht mit Neuronen zweiter Ordnung, den Bipolarzellen und Horizontalzellen, verschaltet.

1.1.2 Die Phototransduktion in der Stäbchenzelle

Die Prozesse der Phototransduktion in Stäbchenzellen und in Zapfenzellen unterscheiden sich leicht. Da die Rinderretina nur wenige Zapfenzellen besitzt, beschränke ich mich in diesem Abschnitt auf die Phototransduktion in Stäbchenzellen.

Die Synapse einer dunkeladaptierten Sehzelle schüttet ständig den Neurotransmitter Glutamat aus, den postsynaptisch glutamaterge Nervenzellen detektieren. Wird das Außensegment der Sehzelle belichtet, sinkt das Spannungspotential der Plasmamembran von -35 mV auf -70 mV. Aufgrund dieser Hyperpolarisation wird kein Glutamat mehr ausgeschüttet. Die glutamatergen Nervenzellen reagieren darauf mit Aktionspotentialen und man nimmt einen optischen Reiz wahr.

In Abbildung 1.2 sind die Prozesse der Phototransduktion schematisch dargestellt. Der intrazelluläre Botenstoff, der indirekt das Spannungspotential der Plasmamembran steuert, ist zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Im Außensegment einer dunkeladaptierten Sehzelle beträgt die cGMP-Konzentration etwa $5 \mu\text{M}$. Dadurch ist die Öffnungswahrscheinlichkeit eines cGMP-kontrollierten Kationenkanals, des CNG-Kanals (*cyclic nucleotide gated channel*; Cook et al., 1987), hoch. Der CNG-Kanal ist für Kalium-Ionen, die

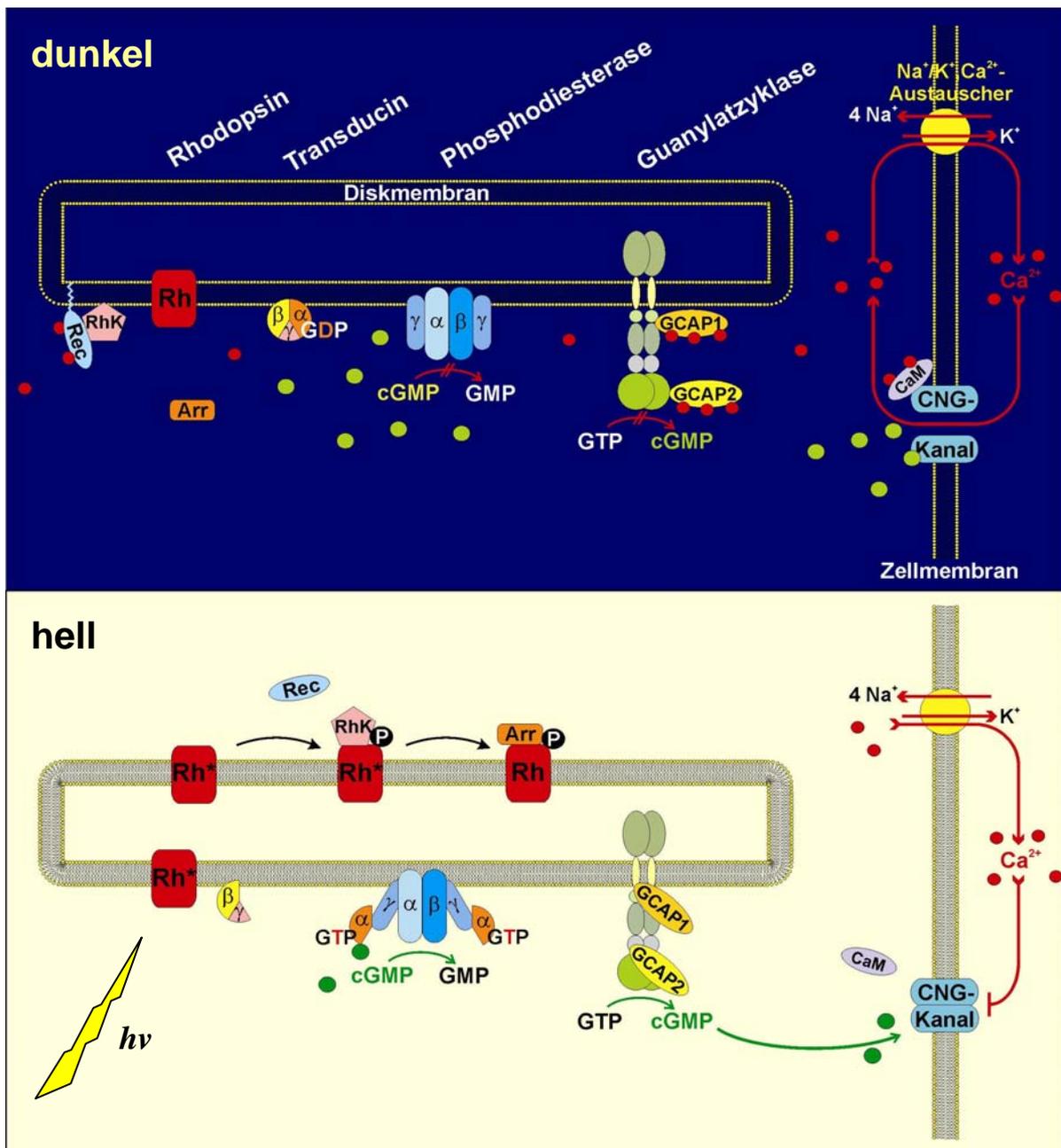


Abbildung 1.2: Die Phototransduktion im Außensegment einer Stäbchensehzele. Der obere Ausschnitt zeigt das Außensegment einer dunkeladaptierten Stäbchensehzele und der untere Ausschnitt das Außensegment einer belichteten Stäbchensehzele. Arr: Arrestin, CaM: Calmodulin, Rec: Recoverin, Rh: Rhodopsin, RhK: Rhodopsinkinase, grüne Kreise symbolisieren cGMP, rote Kreise symbolisieren Kalzium-Ionen, der gelbe Blitz symbolisiert die Belichtung der Sehzele.

aus der Sehzele herausfließen, sowie für Natrium- und Kalzium-Ionen, die in die Sehzele hineinfließen, permeabel. Die Natrium- und Kalium-Ionen verlassen die Sehzele über im Innensegment liegende Ionenkanäle und Ionentransporter. Die Kalzium-Ionen werden durch einen ständig aktiven $\text{Na}^+/\text{K}^+,\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus dem Außensegment transportiert. Dieser Fluß von Ionen über die Plasmamembran wird als Dunkelstrom bezeichnet.

Die zytosolische Kalzium-Konzentration einer dunkeladaptierten Stäbchensehzele ist von der Spezies abhängig. So beträgt sie beispielsweise in der Maus 250 nM (Woodruff et al., 2002),

im Gecko 550 nM (Gray-Keller und Detwiler, 1994) und im Salamander 670 nM (Sampath et al., 1998). Bei diesen Kalzium-Konzentrationen sind verschiedene Kalziumbindeproteine an ihre Zielproteine gebunden: Calmodulin an den CNG-Kanal, Recoverin an die Rhodopsinkinase und zwei Isoformen des Guanylatzyklase aktivierenden Proteins (GCAP1 und GCAP2) an die membrangebundene Guanylatzyklase (GC). Die Aktivität dieser GC und die Aktivität einer cGMP-spezifischen Phosphodiesterase sind niedrig. Der G-Protein gekoppelte Rezeptor Rhodopsin (Rh), welcher den Chromophor 11-*cis*-Retinal gebunden hat, ist inaktiv und sein G-Protein Transducin (G_T , bestehend aus einer $G_T\alpha$ - und einer $G_T\beta\gamma$ -Untereinheit) hat ein Molekül GDP gebunden.

Wird das Außensegment belichtet, absorbiert der Chromophor des Rh, das 11-*cis*-Retinal, ein Photon und isomerisiert zu *all-trans*-Retinal (Wald, 1968). Dadurch wird Rh aktiviert (Rh^*). Rh^* katalysiert nun an $G_T\alpha$ den Austausch von GDP gegen GTP. Das so aktivierte G_T dissoziiert in seine Untereinheiten $G_T\alpha$ -GTP und $G_T\beta\gamma$. Das $G_T\alpha$ -GTP bindet an die inhibitorischen γ -Untereinheiten der Phosphodiesterase (PDE), wodurch diese aktiviert wird (Fung et al., 1981). Die PDE hydrolysiert cGMP und die cGMP-Konzentration im Außensegment nimmt ab. Dadurch sinkt die Öffnungswahrscheinlichkeit des CNG-Kanals, wodurch der Fluß von Kationen in das Außensegment, und damit der Dunkelstrom, unterbunden wird. Die Plasmamembran hyperpolarisiert. Da der $Na^+/K^+,Ca^{2+}$ -Austauscher ständig Kalzium aus der Sehzelle transportiert, Kalzium aber nicht durch den geschlossenen CNG-Kanal in die Sehzelle zurückfließen kann, sinkt die Kalzium-Konzentration auf Werte unter 100 nM.

Damit die Sehzelle erneut angeregt werden kann, wird der Dunkelzustand wiederhergestellt. Die wichtigsten Prozesse, welche die Signalkaskade abschalten, sind nachfolgend aufgeführt:

Der Fluß des Dunkelstroms wird wiederhergestellt. Kalzium-freie GCAPs aktivieren die GC (Koch und Stryer, 1988). Dadurch steigt die cGMP-Konzentration und die Öffnungswahrscheinlichkeit des CNG-Kanals nimmt zu. Kationen, unter anderem Kalzium, können wieder in die Sehzelle fließen. Dadurch depolarisiert die Plasmamembran wieder auf einen Wert von -35 mV und die Kalzium-Konzentration steigt wieder.

Rh^* wird deaktiviert. Kalzium-freies Recoverin verläßt die Diskmembran. Dadurch sinkt die Recoverin-Konzentration im Bereich der Diskmembran und Recoverin kann die Rhodopsinkinase nicht mehr inhibieren. Das Rh^* wird durch die Rhodopsinkinase phosphoryliert (zur Übersicht: Senin et al., 2002). Danach bindet Arrestin an das phosphorylierte Rh^* und deaktiviert es (Kühn und Wilden, 1987).

Die PDE wird abgeschaltet. $G_T\alpha$ -GTP besitzt eine endogene GTPase-Aktivität, die durch die Bindung an die inhibitorische γ -Untereinheit der PDE und an den Proteinkomplex RGS9/G β 5L erhöht wird (Lishko et al., 2002). Das $G_T\alpha$ -GTP hydrolysiert zu $G_T\alpha$ -GDP, dissoziiert von der γ -Untereinheit der PDE und reassoziert mit $G_T\beta\gamma$. Die γ -Untereinheit der PDE bindet wieder an die α - und β -Untereinheit, wodurch die PDE-Aktivität abgeschaltet wird.

1.1.3 Lichtadaptation

Der Mensch nimmt Licht, dessen Intensität über zehn Größenordnungen variieren kann, wahr. Dies ermöglichen, unter anderem, die unterschiedlich sensitiven Sehzellarten. Dunkeladaptierte Stäbchensehzellen können einzelne Photonen detektieren, während die Zapfensehzellen etwa hundertfach unempfindlicher sind. Damit auch belichtete Sehzellen Reize wahrnehmen können, müssen sie sich der Hintergrundbelichtung anpassen. Dies wird Lichtadaptation genannt. Die Zapfensehzellen werden bei hohen Lichtintensitäten unempfindlicher, indem sich die Menge aktivierbaren Rhodopsins reduziert. Deaktiviertes Rh dissoziiert in Opsin und *all-trans*-Retinal. Das Opsin alleine kann, im Vergleich zum Rh^* , das G_T nur in sehr viel geringerem Maße aktivieren. Das *all-trans*-Retinal wird enzymatisch zu *11-cis*-retinal isomerisiert und wieder an das Opsin gebunden. In der Stäbchensehzelle dauert die Regeneration von Rh Minuten, in der Zapfensehzelle etwa eine Stunde. Die Belichtung vermindert folglich die Menge von Rh, die angeregt werden kann (Lamb und Pugh, 2004). Bei niedrigen Belichtungsintensitäten adaptieren Sehzellen durch Kalzium-gesteuerte Prozesse.

Bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen wird die GC aktiviert. Sinkt die Kalzium-Konzentration aufgrund der Belichtung der Sehzelle, aktivieren die GCAPs die GC. Wird die Sehzelle ständig belichtet, wird durch das GC/GCAP-System genügend cGMP synthetisiert, um die Öffnungswahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle hoch zu halten. Dadurch kann die Sehzelle Lichtreize, deren Intensität über der Hintergrundbeleuchtung liegt, detektieren. Das GC/GCAP-System dient nicht nur der Wiederherstellung des Dunkelzustandes der Sehzelle (siehe oben), sondern ist auch für die Lichtadaptation wichtig.

Das Kalzium-bindende Protein Calmodulin reguliert die cGMP-Affinität des CNG-Kanals. Hat Calmodulin Kalzium gebunden, wie es in der dunkeladaptierten Sehzelle der Fall ist, bindet es an den CNG-Kanal und senkt dessen cGMP-Affinität. Dadurch sinkt die Öffnungswahrscheinlichkeit des CNG-Kanals bereits bei einem geringen Abfall der

cGMP-Konzentration. Die Sehzelle wird sensitiver. Nach Belichtung dissoziiert das Kalziumfreie Calmodulin vom CNG-Kanal und erhöht so dessen cGMP-Affinität. Dadurch nimmt die Öffnungswahrscheinlichkeit des CNG-Kanals zu, wodurch der Dunkelstrom wieder fließen kann (Hsu und Molday, 1994; Weitz et al., 1998).

Das Kalzium-bindende Protein Recoverin bestimmt die Lebensdauer von Rh* und damit die Aktivität der PDE. Bei hohen Kalzium-Konzentrationen ist Recoverin an die Rhodopsinkinase gebunden und inhibiert diese. Sinkt die Kalzium-Konzentration in der Sehzelle, dissoziiert Recoverin von der Rhodopsinkinase. Die Rhodopsinkinase phosphoryliert Rh* und Arrestin deaktiviert das phosphorylierte Rh*. Die Lebensdauer von Rh* sinkt, wodurch weniger G_T und folglich weniger PDE aktiviert werden kann. (zur Übersicht: Pugh et al., 1999; Burns und Baylor, 2001; Fain et al., 2001)

1.2 Partikuläre Guanylatzyklen

Zwei Klassen von Guanylatzyklen (GCs) synthetisieren den intrazellulären Botenstoff cGMP. Die erste Klasse bilden die löslichen GCs (sGCs). Die heterodimeren sGCs bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche jeweils eine Häm-bindende, eine Dimerisierungsdomäne und eine katalytische Domäne besitzen. Ein Häm-Molekül dient als prosthetische Gruppe und kann den Aktivator Stickstoffmonoxid binden. Nur das Heterodimer einer sGC kann cGMP synthetisieren. Die Untereinheiten alleine sind enzymatisch inaktiv. Die Dimerisierungsdomänen und katalytischen Domänen der sGCs zeigen Sequenzhomologien zu den Mitgliedern der zweiten Klasse von GCs, den partikulären GCs (pGCs). Die pGCs durchspannen Zellmembranen und können so extrazelluläre Signale in ein intrazelluläres cGMP-Signal übersetzen. In Abbildung 1.3 ist die, zwischen den

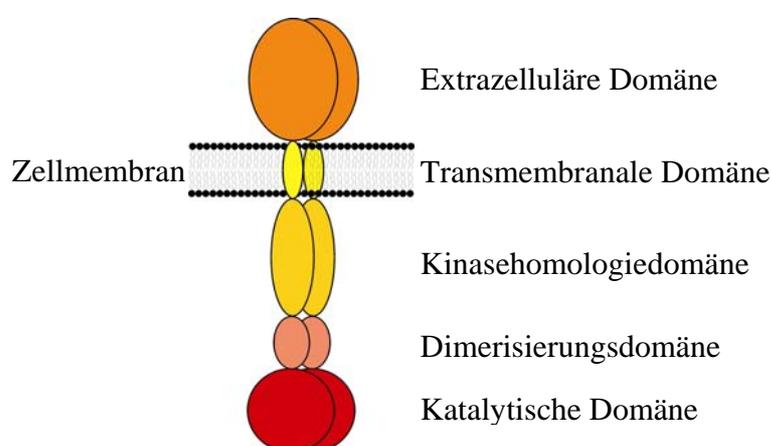


Abbildung 1.3: Die konservierte Domänenstruktur partikulärer Guanylatzyklen aus Vertebraten.

Mitgliedern der Klasse konservierte, Domänenstruktur dargestellt. An die N-terminal gelegene Extrazelluläre Domäne (ECD, 500 AS) können bei bestimmten pGCs (siehe unten) Peptidhormone binden und so die Aktivität dieser pGCs regulieren. Die Transmembranale Domäne (TMD, 25 AS) durchspannt die Zellmembran. An sie schließt sich intrazellulär die Kinasehomologiedomäne (KHD, 300 AS) an, welche Homologien zu Rezeptortyrosinkinasen besitzt. Es folgen die Dimerisierungsdomäne (DD, 50 AS) und die Katalytische Domäne (CCD, 200 AS), an der die cGMP-Synthese stattfindet.



Abbildung 1.4: Primärstrukturvergleich der partikulären Guanylatzyklen aus Vertebraten. Der Punkt, an dem sich Linien verzweigen, gibt relativ die Zeit an, an der aus einer GC-Form zwei neue GC-Formen entstanden.

Bisher sind aus Säugetieren sieben Mitglieder der Klasse der pGCs bekannt (siehe Abb. 1.4). Sie wurden, in der Reihenfolge ihrer Entdeckung, GC-A bis GC-G genannt. Die eng miteinander verwandten GC-A und GC-B bilden die Gruppe der Natriuretischen Peptid Rezeptoren. Die natriuretischen Peptide ANP und BNP (\rightarrow GC-A) sowie CNP (\rightarrow GC-B) können an die ECD binden und so die cGMP-Synthese aktivieren. Die GC-A und GC-B sind an der Regulation des Blutdrucks und des Wasserhaushalts im Körper beteiligt. Die GC-C ist ebenfalls ein Peptid Rezeptor und kommt in der Darmschleimhaut vor. Ihre Aktivatoren sind die endogenen Peptide Guanylin und Uroguanylin sowie die exogenen bakteriellen, hitzestabilen Enterotoxine, wie beispielsweise STa von *Escherichia Coli*. Für die restlichen pGCs (GC-D, GC-E, GC-F und GC-G) sind bislang keine Liganden der ECD bekannt, weshalb sie im Englischen als *orphan receptors* (*orphan* \rightarrow Waisenkind) bezeichnet werden. Die eng mit der GC-F verwandte GC-D wird im Riechepithel exprimiert. Ihre Aktivität wird an der intrazellulären Domäne über das Kalzium-bindende Protein Neurocalcin δ reguliert (Duda et al., 2001). Die GC-G, welche eng mit den Natriuretischen Peptid Rezeptoren verwandt ist, wurde bislang nur in der Ratte und in der Maus nachgewiesen. Wie ihre Aktivität reguliert wird ist unbekannt. Auf die GC-E (GC-1) und die GC-F (GC-2) werde ich im folgenden Abschnitt näher eingehen. (zur Übersicht: Sharma, 2002; Lucas et al., 2000)

1.2.1 GC1 und GC2

Die eng miteinander verwandten Guanylatzyklasen GC1 und die GC2 (auch GC-E / -F oder ROS-GC-1 / -2 genannt, siehe Abb. 1.4) bestimmen, im Wechselspiel mit einer Phosphodiesterase, die cGMP-Konzentration in Sehzellen (siehe Abb. 1.2). Die Gene, die diese GCs kodieren, wurden aus zahlreichen Säugetieren wie Mensch (GC1: Shyjan et al., 1992; GC2: Lowe et al., 1995), Rind (GC1: Goracznia et al., 1994; GC2: Goracznia et al., 1997) oder Ratte (Yang et al., 1995) kloniert. An Rhesus-Affen durchgeführte *in situ* Hybridisierungen wiesen die mRNA der GC1 (Shyjan et al., 1992) und der GC2 (Lowe et al., 1995) in der äußeren nukleären Schicht und in den Innensegmenten von Sehzellen nach. Dies warf die Frage nach einer Sehzell-spezifischen Expression der GC-Isoformen auf. Verschiedene Studien konnten die GC1 mit Hilfe von Antikörpern in den Außensegmenten der Sehzellen von Mensch (Dizhoor et al., 1994), Affe (Liu et al., 1994) und Huhn (Cooper et al., 1996) nachweisen. Dabei markierten die Antikörper die Zapfenaußensegmente stärker als die Stäbchenaußensegmente. Wurden Stäbchen-reiche Ratten- oder Rinderretinen untersucht, markierten die GC1-Antikörper die Stäbchenaußensegmente (Hallett et al., 1996; Yang und Garbers, 1997). Yang und Garbers konnten beide GC-Isoformen im selben Stäbchenaußensegment nachweisen. Venkataraman et al. (2003) nutzten einen GC1-Antikörper der sowohl Zapfenaußensegmente, als auch Stäbchenaußensegmente, markierte. Um die Frage, ob die GC1 und die GC2 Sehzell-spezifisch verteilt sind, zu beantworten, hilft das Ergebnis der genetischen Inaktivierung der GC1 (Yang et al., 1999). Die Zapfensehzellen fünf Wochen alter Mäuse, deren GC1 genetisch inaktiviert worden war, zeigen im Elektoretinogramm keine Lichtantwort. Die Zapfenaußensegmente sind degeneriert. Die fehlende GC1 beeinflusst auch die Lichtantwort der Stäbchensehzellen. Sie antworten, verglichen mit den Stäbchensehzellen einer Wildtyp-Maus, sensitiver auf einen Lichtreiz und beenden diese Antwort schneller. Obwohl eine endgültige Klärung der Frage noch aussteht, scheint es, als werden beide GC-Isoformen in Zapfen- und Stäbchensehzellen exprimiert. In Zapfen ist die GC1 die vorherrschende Isoform.

Die AS-Sequenzen der GC1 und der GC2 sind 1110 AS und 1103 AS lang. Darin enthalten ist eine 56 AS (GC1) bzw. 50 AS lange (GC2) *leader*-Sequenz, welche die GCs in die Diskmembran leitet und während der Prozessierung der GCs abgespalten wird. Gebe ich in dieser Arbeit AS-Positionen an, beziehen sich diese auf das Protein mit *leader*-Sequenz. Die prozessierten Proteine besitzen Molekulargewichte von 114 kDa (GC1) und 118 kDa (GC2). Bislang konnte nur die GC1 gereinigt werden (Koch, 1991). Ebenso konnte auch nur die

Konzentration der GC1 im Außensegment von Sehzellen der Rinderretina bestimmt werden: sie beträgt $5,8 \mu\text{M}$ für das GC1-Dimer (Hwang et al., 2003). (zur Übersicht: Koch et al., 2002)

1.3 Die Regulatoren der GC1 und GC2 in Sehzellen: GCAPs

Lolley und Racz beobachteten 1982, daß im Außensegment einer Stäbchensehzelle cGMP nur bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen synthetisiert wird. Später fanden Koch und Stryer (1988), daß die Kalzium-Sensitivität durch einen zytosolischen Faktor vermittelt wird. Dieser zytosolische Faktor wurde gereinigt (Gorczyca et al., 1994), sowie kloniert und charakterisiert (Palczewski et al., 1994; Frins et al., 1996). Der Faktor wurde GCAP1 genannt. Später wurden GCAP2 (Dizhoor et al., 1995), GCAP3 (Haeseleer et al., 1999) und weitere GCAP-Isoformen (Imanishi et al., 2004) gefunden. Da in der Rinderretina, meinem Forschungsobjekt, nur GCAP1 und GCAP2 exprimiert werden, werde ich mich auf diese Isoformen beschränken. GCAP1 wurde in der Rinderretina in den Außensegmenten von Stäbchen- und Zapfensehzellen, manchen Somata von Zapfensehzellen (Gorczyca et al., 1995), sowie in der äußeren plexiformen Schicht (Frins et al., 1996) immunzytochemisch nachgewiesen. GCAP2 wurde in den Außensegmenten und Innensegmenten beider Sehzellarten, sowie in Axonen und Synapsen von Zapfensehzellen immunzytochemisch nachgewiesen (Otto-Bruc et al., 1997). Eine Sehzell-spezifische Expression der GCAP-Isoformen liegt also nicht vor. Hwang et al. (2003) bestimmten die Konzentrationen beider GCAP-Isoformen im Außensegment von Stäbchensehzellen der Rinderretina. Sie beträgt für GCAP1 $3,3 \mu\text{M}$ und für GCAP2 $2,7 \mu\text{M}$.

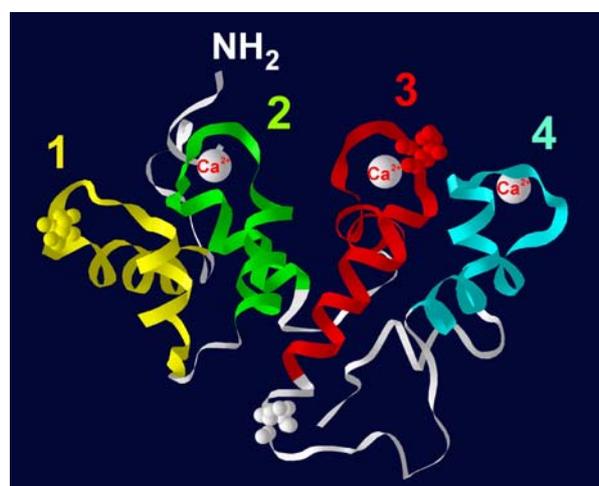


Abbildung 1.5: NMR-Struktur von nichtmyristyliertem GCAP2 aus dem Rind mit drei gebundenen Kalzium-Ionen (Ames et al., 1999). Die EF-Hand Motive sind nummeriert und farblich hervorgehoben (gelb: EF-Hand-Motiv 1; grün: EF-Hand-Motiv 2; rot: EF-Hand-Motiv 3; cyan: EF-Hand-Motiv 4). Die drei Cystein-Reste sind als Kugelmodell dargestellt. Die Abbildung wurde mit RasMol 2.6 erstellt.

Die GCAPs gehören zur Familie der EF-Hand Kalzium-Bindungsproteine und darin zur Unterfamilie der NCS-Proteine (*neuronal calcium sensor proteins*; zur Übersicht: Burgoyne, 2004). Die Mitglieder dieser Familie besitzen Kalzium-bindende Helix-Schleife-Helix Motive, die sogenannten EF-Hand-Motive. Die GCAPs besitzen vier EF-Hand-Motive (siehe Abb. 1.5), von denen das N-terminal gelegene, zumindest im physiologischen Konzentrationsbereich der Sehzellen (bis 670 nM), kein Kalzium binden kann. Neben den EF-Hand-Motiven ist die N-terminale Acylierung charakteristisch für GCAPs (Palczewski et al., 1994; Olshevskaya et al., 1997). Die GCAPs sind meist myristyliert. Jedoch dient die Myristin-Gruppe nicht, wie beispielsweise im verwandten NCS-Protein Recoverin (Zozula und Stryer, 1992), als Kalzium-abhängiger Membrananker. So binden sowohl myristylierte, als auch nichtmyristylierte GCAPs, an Liposomen, deren Zusammensetzung den Membranen des Stäbchenaußensegments entspricht (Hwang und Koch, 2002). In Gegenwart von EGTA bindet myristyliertes GCAP2 besser an solche Liposomen als in Gegenwart von Kalzium. Dies wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet, die Bindungsstudien zwischen GCAP2 und Membranen des Stäbchenaußensegments durchführte (Olshevskaya et al., 1997). Die aus dem Rind stammenden GCAP1 und GCAP2 sind 205 bzw. 204 AS lang und besitzen Molekulargewichte von 23,6 kDa bzw. 23,8 kDa. Die AS-Sequenzen sind zu 39 % identisch. Die GCAPs sind hydrophobe Proteine mit niedrigen pKa-Werten von etwa 4,5. Die Konformation der GCAPs ändert sich Kalzium-abhängig. Dies wurde durch Fluoreszenzspektroskopie (Palczewski et al., 1994; Sokal et al., 2001), NMR und Circular-Dichroismusmessungen (Hughes et al., 1998), chemische Modifizierungen (Hwang et al., 2001) und limitierte Proteolyse (Hwang et al., 2004) gezeigt. Jedoch sind keine Tertiärstrukturen bekannt, die das myristylierte GCAP in Gegenwart und in Abwesenheit von Kalzium darstellen. Dadurch könnten die Kalzium-abhängigen Konformationsänderungen, die zur GC-Aktivierung führen, im Detail aufgeklärt werden. Bislang konnte nur die NMR-Struktur von nichtmyristyliertem GCAP2, welches drei Kalzium-Ionen gebunden hat, aufgeklärt werden (Ames et al., 1999; siehe Abb. 1.5). (zur Übersicht: Palczewski et al., 2004)

1.4 Die Regulation der GC1-Aktivität durch GCAPs

Die GC1 ist die vorherrschende GC-Isoform in den Sebstäbchen der Rinderretina (persönliche Information von Prof. Dr. K.-W. Koch). Da sich der größte Teil der Literatur mit dieser Isoform beschäftigt, beschränke ich mich in diesem Abschnitt hauptsächlich auf die Regulation der GC1 durch GCAPs.

Ist die Kalzium-Konzentration im Außensegment einer Sehzelle niedrig, also nach Belichtung, aktivieren die GCAPs die GC. Dies konnte *in vitro* mit heterolog exprimierten GCAPs und ROS-Membranen (*rod outer segment*, Stäbchenaußensegment), welche die GC enthalten, gezeigt werden (für GCAP1: Frins et al., 1996; für GCAP2: Dizhoor et al., 1995). Ebenso konnte die heterolog exprimierte GC1 mit heterolog exprimierten GCAPs aktiviert werden (für GCAP1: Duda et al., 1996; für GCAP2: Krishnan et al., 1998). Dagegen wird die Frage, welche GCAP-Isoformen die heterolog exprimierte GC2 aktivieren, in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten beschreiben, daß die GC2 nur von GCAP2 aktiviert wird (Goracznik et al., 1998; Haeseleer et al., 1999). Eine andere Arbeit zeigt jedoch die Aktivierung durch GCAP1 und GCAP2 (Krylov et al., 1999). Somit kann keiner GC-Isoform eine spezifische GCAP-Isoform zugeordnet werden.

Bei hohen Kalzium-Konzentrationen, wie sie in einer dunkeladaptierten Sehzelle vorliegen, inhibieren beide GCAPs die GC unter ihre basale Aktivität (Hwang und Koch, 2002). Dies zeigt, daß die GCAPs auch bei hohen Kalzium-Konzentrationen an die GC gebunden sind (siehe auch: Rudnicka-Nawrot et al., 1998; Peshenko et al., 2004). Die GCAPs werden vom Inhibitor zum Aktivator der GC, wenn die Kalzium-Konzentration nach Belichtung der Sehzelle sinkt. Dabei zeigen die GCAPs unterschiedliche Kalzium-Sensitivitäten. GCAP1 aktiviert die GC bei höheren Kalzium-Konzentrationen als GCAP2. Aktivierungsstudien mit ROS-Membranen ergaben IC_{50} -Werte für GCAP1 und GCAP2 von 627 nM bzw. 123 nM Kalzium. Dieser Unterschied wurde auch bei Aktivierungsstudien mit heterolog exprimierter GC1 gemessen, GCAP1 zeigte einen IC_{50} -Wert von 609 nM und GCAP2 einen von 47 nM Kalzium (Hwang et al., 2003). Hwang et al. interpretierten die Daten dahingehend, daß am Beginn der Lichtantwort, wenn die Kalzium-Konzentration nur leicht gefallen ist, die GC1 nur durch GCAP1 aktiviert wird. Im weiteren Verlauf der Lichtantwort, wenn die Kalzium-Konzentration weiter fällt, aktivieren GCAP1 und GCAP2 die GC1. Ob die GCAPs die GC2 ebenfalls bei unterschiedlichen Kalzium-Konzentrationen aktivieren, ist bislang ungeklärt.

Wie sensitiv die GCAPs auf geänderte Kalzium-Konzentrationen reagieren, wird von den Kalzium-Affinitäten ihrer EF-Hand-Motive bestimmt. Hwang et al. (2001) bestimmten die Kalzium-Affinitäten des ersten ($K_D = 100 \mu\text{M}$ Kalzium) und dritten EF-Hand-Motivs ($K_D = 2,9 \mu\text{M}$ Kalzium) von GCAP1. Die Autoren interpretierten diese Werte dahingehend, daß Kalzium vom dritten EF-Hand-Motiv mit einer Zeitkonstante von 2 msec dissoziiert und die damit einhergehende Konformationsänderung der erste Schritt der GCAP1-vermittelten GC-Aktivierung ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Sokal et al. (1999) überein, die feststellten, daß im Bereich des dritten EF-Hand-Motivs eine Kalzium-abhängige

Konformationsänderung stattfindet. Bislang wurde nur die apparente Kalzium-Affinität von nichtmyristyliertem GCAP2 bestimmt, die bei 300 nM liegt (Ames et al., 1999). Die Kalzium-Affinitäten einzelner EF-Hand-Motive sind nicht bestimmt worden.

Nicht nur Kalzium beeinflusst die GC-Aktivierung durch GCAPs, sondern auch Magnesium. Peshenko und Dizhoor (2004) zeigten, daß Magnesium die IC_{50} -Werte beider GCAPs zu höheren Werten verschiebt. So zeigte beispielsweise GCAP1 in Gegenwart von Magnesium einen IC_{50} -Wert von 1300 nM Kalzium und in Abwesenheit von Magnesium einen IC_{50} -Wert von 160 nM Kalzium. Ob Magnesium die Kalzium-Affinitäten der EF-Hände beeinflusst, und falls ja, welcher EF-Hände, wurde bislang nicht untersucht.

Um die Funktion der GCAPs *in vivo* messen zu können, wurden Mäuse generiert, deren Gene für GCAP1 und GCAP2 inaktiviert waren (Mendez et al., 2001). Die Lichtantworten dieser GCAP^{-/-}-Mäuse unterscheiden sich von den Lichtantworten von Wildtyp-Mäusen. Das Maximum der Lichtantwort wird später erreicht, die Amplitude des Maximums ist größer und die Erholungsphase dauert länger. Wurde das GCAP1-Gen der GCAP^{-/-}-Mäuse wieder aktiviert, bei bleibender Inaktivierung des GCAP2-Gens, zeigen sie normale Lichtantworten (Howes et al., 2002). Wurde hingegen das GCAP2-Gen reaktiviert, bei bleibender Inaktivierung des GCAP1-Gens, zeigen die Mäuse abnormale Lichtantworten. Die schnelle Erholungsphase nach dem Maximum der Lichtantwort, die Wildtyp-Mäuse zeigen, stellt sich langsamer ein und unterschreitet manchmal das Ausgangsniveau (Mendez et al., 2001). Diese Beobachtungen lassen sich mit den unterschiedlichen Kalzium-Sensitivitäten von GCAP1 und GCAP2 (siehe oben) erklären. GCAP1, das am Beginn der Lichtantwort die GC aktiviert, ist für die schnelle Erholung nach dem Maximum der Lichtantwort verantwortlich. Deshalb konnte die Reaktivierung des GCAP1-Gens die Lichtantwort des Wildtyps wiederherstellen. War hingegen GCAP2 genetisch reaktiviert, verlangsamte sich die Erholungsphase, bis die Kalzium-Konzentration so weit gesunken war, daß GCAP2 die GC aktivieren konnte.

1.4.1 Interaktionsstellen zwischen GC1 und GCAPs

Beide GCAPs regulieren die GC1 an ihrer intrazellulären Domäne. Laura et al. (1996) exprimierten heterolog die intrazelluläre Domäne der GC1 (ICD), deletierten also die ECD und die TMD, und konnten diese Mutante Kalzium-abhängig mit GCAPs aktivieren. An der ICD wurden sechs Interaktionsstellen für GCAPs gefunden (siehe Abb. 1.6; #1 bis #6). Lange et al. (1999) untersuchten Peptide der GC1 dahingehend, ob sie die GCAP1-vermittelte GC-Aktivierung inhibierten. Zusätzlich untersuchten sie heterolog exprimierte Deletionsmutanten der GC1. Auf diese Weise identifizierten sie zwei Interaktionsstellen in

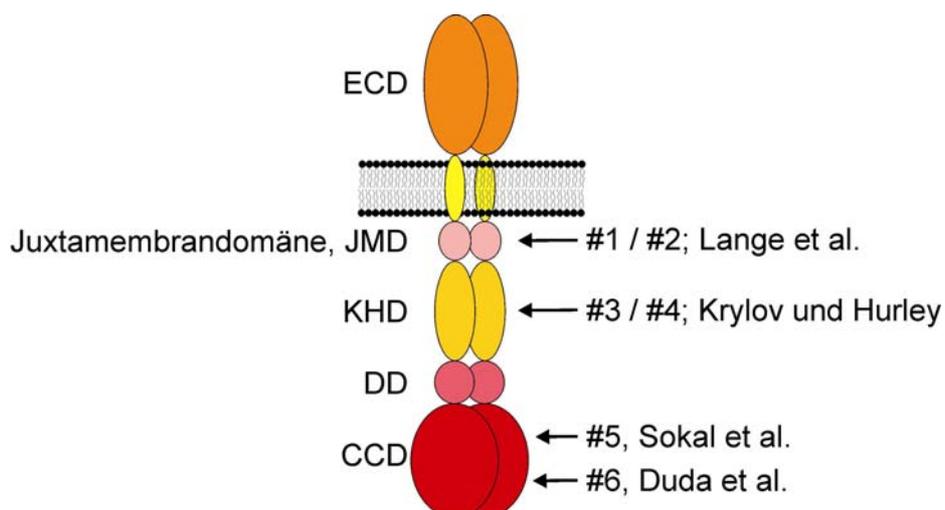


Abbildung 1.6: Regionen der GC1, die mit GCAPs wechselwirken.

der Juxtamembrandomäne (JMD; #1 und #2; siehe Abb. 1.6). Die JMD stellt eine Domäne der GC1 und der GC2 dar, die keine Homologien zu Peptidrezeptor GCs besitzt. Krylov und Hurley (2001) identifizierten mittels chemischer Vernetzung von GCAP1 und GC1, Proteolyse und anschließender Massenspektroskopie zwei Interaktionsstellen für GCAP1 in der KHD (#3 und #4). In der CCD wurden zwei Interaktionsstellen für GCAP2 identifiziert. Sokal et al. (1999) fanden eine Interaktionsstelle mit Hilfe von Peptidinhibierungs-Experimenten (#5). Dabei inhibierte das Peptid, welches der Interaktionsstelle entsprach, die GCAP2-vermittelte GC1-Aktivierung stärker als die GCAP1-vermittelte. Jedoch interpretierten die Autoren diese Beobachtung nicht dahingehend, daß es sich bei diesem Peptid um eine GCAP2-Interaktionsstelle handelte. Später identifizierten Duda et al. (2005) eine weitere GCAP2-Interaktionsstelle in der CCD (#6). Dazu nutzten sie die Technik der Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektroskopie, mit der es möglich ist, Protein-Protein Wechselwirkungen direkt zu messen. In Tabelle 1.1 sind die Affinitäten der Interaktionsstellen zusammengefaßt. Die Affinitäten der isolierten Interaktionsstellen und GCAPs (2,9 μM bis 260 μM , siehe Tab. 1.1) liegen deutlich über den EC_{50} -Werten der gesamten GC1 und GCAPs (unter 1 μM). Diese Diskrepanz könnte erklärt werden, wenn man annimmt, daß mehrere Interaktionsstellen der GC1 an der GCAP-Bindung beteiligt sind und dadurch eine stärkere Bindung entsteht. Dies konnte bisher nicht gezeigt werden.

Tabelle 1.1: Affinitäten von Peptiden, die Interaktionsstellen zwischen der GC1 und GCAPs darstellen. IC₅₀-Werte und K_D-Werte sind in (μM) angegeben. n.b.: nicht bestimmt; SPR-Spektroskopie: *surface plasmon resonance spectroscopy*.

	Sequenz	für GCAP	IC ₅₀ (Ca ²⁺)	IC ₅₀ (EGTA)	Methode
#1	M ⁵⁰¹ -L ⁵¹²	1	260	100	Peptidscreening und Mutagenese
#2	L ⁵⁵⁹ -I ⁵⁷⁸	1	150	100	
#3	S ⁷³⁶ -E ⁷⁵⁵	1	40	30	chemische Vernetzung, Proteolyse, Massenspektroskopie
#4	Q ⁷⁸⁰ -A ⁷⁹⁴	1	80	75	
#5	G ⁹⁶⁶ -G ⁹⁸⁵	1 / 2	n.b.	290 (GCAP1) 120 (GCAP2)	Peptidscreening
#6	Y ¹⁰²¹ -N ¹⁰³⁷	2	K _D = 3,1	K _D = 2,9	SPR-Spektroskopie

In GCAP1 wurden zahlreiche Regionen identifiziert, die mit der GC interagieren. Mit Hilfe synthetischer Peptide wurden die Regionen myrG²-E²⁸ (G² ist myristyliert; Palczewski et al., 1994; siehe auch: Li et al., 2001), E⁵⁷-G⁸⁶ und D¹³⁷-D¹⁶³ (Otto-Bruc et al., 1997) gefunden. Peptide, die diese Regionen repräsentieren, vermindern die GC-Aktivierung durch GCAP1 um mindestens 60 %. Schrem et al. (1999) identifizierten, ebenfalls durch Peptidinhibierungs-Experimente, die Region F⁷³-K⁸⁷ (C-terminal flankierende Helix des EF-Hand-Motivs 2). In einer weiteren Studie, die genetisch veränderte GCAP1-Formen nutzte, wurden Regionen zwischen dem ersten und dritten EF-Hand-Motiv identifiziert, die wichtig für die Aktivierung der GC sind (Krylov et al., 1999). In dieser Arbeit fand man ebenfalls, daß die N-terminalen neun AS wichtig für die Inhibierung der GC1 bei hohen Kalzium-Konzentrationen sind. Auch in GCAP2 wurden Regionen identifiziert, die mit der GC1 wechselwirken. Mit Hilfe genetisch veränderter GCAP2-Formen fanden Olshevskaya et al. (1999) zwei für die GC1-Regulierung wichtige Regionen. Die Region K²⁹-F⁴⁸ (EF-Hand-Motiv 1) ist sowohl für die Aktivierung, als auch für die Inhibierung, der GC1 essentiell. Dagegen ist die Region V¹⁷¹-N¹⁸⁹ (EF-Hand-Motiv 4) nur für die Aktivierung wichtig. Ermilov et al. (2001) mutierten einzelne AS des ersten EF-Hand-Motivs und identifizierten so für die GC1-Aktivierung wichtige AS, unter anderem C³⁵. In GCAPs wurden keine Regionen identifiziert, die mit der GC2 wechselwirken.

1.4.2 Modelle der GC1-Aktivierung durch GCAPs

Wird die GC1 aktiviert, bilden die CCDs zweier GC1-Moleküle ein Reaktionszentrum für die cGMP-Synthese (Hurley, 1998). Wie dieses Reaktionszentrum entsteht, wird kontrovers in zwei Modellen diskutiert. In beiden Modellen bildet ein GC1-Dimer mit einer unbekanntenen Zahl von GCAPs einen Proteinkomplex. Im ersten Modell (siehe Abb. 1.7) ändert sich die Konformation des Proteinkomplexes Kalzium-abhängig. Bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen bringen die GCAPs den Proteinkomplex in die aktive Konformation, bei hohen Kalzium-Konzentrationen in die inaktive Konformation. Die GC1-Moleküle liegen folglich unabhängig von der Kalzium-Konzentration als Dimer vor. Dieses Modell wird durch *cross-linking* Experimente untermauert, bei denen GC1-Dimere bei hohen und niedrigen Kalzium-Konzentrationen nachgewiesen wurden (Duda et al., 1996). Das hier gezeigte Modell (siehe Abb. 1.7) verarbeitet zusätzlich die Erkenntnisse, daß die GCAPs unterschiedliche Kalzium-Sensitivitäten zeigen (siehe 1.4) und mit unterschiedlichen Regionen der GC1 wechselwirken (siehe 1.4.1).

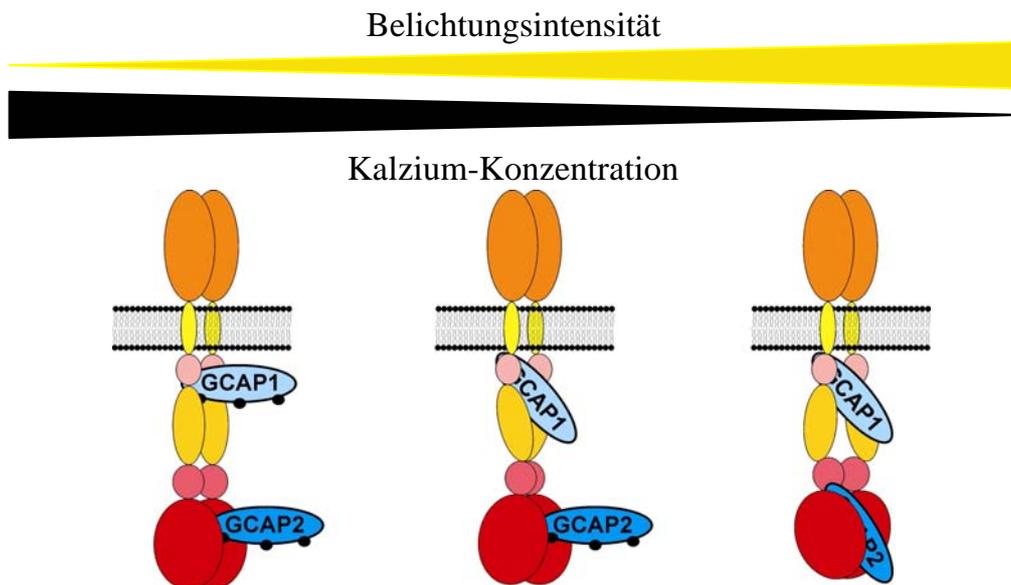


Abbildung 1.7: Modell 1 der GC1-Aktivierung durch GCAPs. GCAP1 und GCAP2 (schwarze Punkte symbolisieren Kalzium-Ionen) binden in der dunkeladaptierten Sehzelle an ein GC1-Dimer. Wird die Sehzelle belichtet (die Belichtungsintensität wird durch das gelbe Dreieck symbolisiert) und fällt dadurch die Kalzium-Konzentration (symbolisiert durch das schwarze Dreieck), aktiviert zunächst GCAP1 die GC1. Sinkt die Kalzium-Konzentration aufgrund stärkerer Belichtung weiter, aktivieren beide GCAPs die GC1.

Im zweiten Modell (siehe Abb. 1.8) existiert der enzymatisch aktive Proteinkomplex nur bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen. Bei hohen Kalzium-Konzentrationen dissoziiert das GC1-Dimer, während die GCAPs an den GC1-Molekülen gebunden bleiben und die GC-Moleküle inaktiv sind. Dieses Modell wird durch zwei Arbeiten gestützt: Yu et al. (1999)

zeigten, daß die aktivierte GC1 als Dimer und die nicht aktivierte GC1 als Monomer vorliegt. Olshevskaya et al. (1999) zeigten, daß GCAP2 bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen dimerisiert, was im Modell der Autoren zur GC1-Dimerisierung und damit zum enzymatisch aktiven Proteinkomplex führt. Im hier gezeigten Modell (siehe Abb. 1.8) ist, neben GCAP2, auch GCAP1 involviert. Da GCAP1-Dimere die GC1 nicht aktivieren, induziert GCAP1 die GC1-Dimerisierung durch einen anderen Mechanismus (Sokal et al., 2001; Hwang et al., 2004).

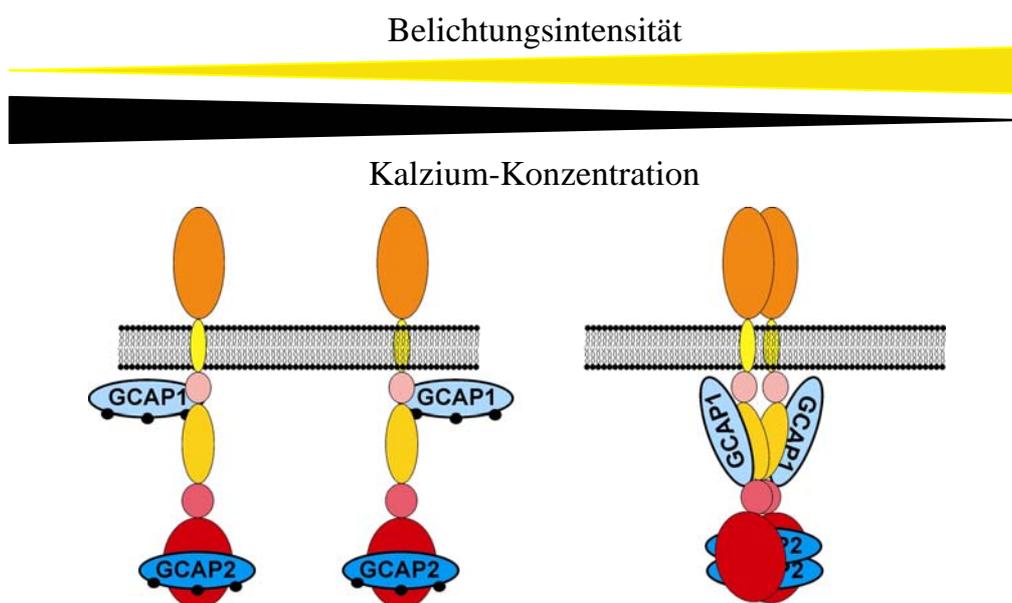


Abbildung 1.8: Modell 2 der GC1-Aktivierung durch GCAPs. GCAP1 und GCAP2 (schwarze Punkte symbolisieren Kalzium-Ionen) binden in der dunkeladaptierten Sehzelle an ein GC1-Molekül. Wird die Sehzelle belichtet (die Belichtungsintensität wird durch das gelbe Dreieck symbolisiert) und fällt dadurch die Kalzium-Konzentration (symbolisiert durch das schwarze Dreieck), induzieren die Kalzium-freien GCAPs die Dimerisierung der GC1 und bringen sie dadurch in die aktive Konformation.

1.5 Die GC1 außerhalb des Außensegments von Sehzellen

Die GC1 übersetzt ein intrazelluläres Kalzium-Signal in ein intrazelluläres cGMP-Signal. Dies tut sie nicht nur im Außensegment von Sehzellen, sondern auch in anderen sensorischen Neuronen, die für das Sehen, den Geruch und den Geschmack verantwortlich sind. So wurde die GC1 in der synaptischen Region von Sehzellen und Bipolarzellen, in der Synapse von Zapfensehzellen, in tieferliegenden Neuronen der Retina, im Riechkolben (*Bulbus olfactorius*), im Geschmacksepithel und im Pinealorgan (Epiphyse) nachgewiesen. Als regulatorisches Kalzium-Sensor Protein konnte in der Synapse von Zapfensehzellen (Venkataraman et al., 2003), im Riechkolben (Duda et al., 2001) und in bestimmten Pinealozyten (Venkataraman et al., 2000) GCAP1 identifiziert werden. In diesen Neuronen

wird folglich, wie in der Phototransduktion, die cGMP-Synthese bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen aktiviert. In der synaptischen Region von Sehzellen und Bipolarzellen (Duda et al., 2002), im Geschmacksepithel (Duda und Sharma, 2004) und in Pinealozysten, die kein GCAP1 exprimieren (Venkataraman et al., 2000), wurde S100 β als regulatorisches Kalzium-Sensor Protein identifiziert. Im Gegensatz zu GCAP1 aktiviert S100 β die GC1 bei hohen Kalzium-Konzentrationen ($EC_{50} = 2 \mu\text{M}$ bis $5 \mu\text{M}$ Kalzium). Als Interaktionsstelle konnte eine Region der CCD, die mit der GCAP2-Interaktionsstelle überlappt, identifiziert werden (Duda et al., 2002). In der inneren plexiformen Schicht der Retina, in der Bipolarzellen mit Amakrinzellen und Ganglienzellen vernetzt sind, wurde Neurocalcin δ als regulatorisches Kalzium-Sensor Protein gefunden (Krishnan et al., 2004). Wie S100 β , aktiviert Neurocalcin δ die GC1 bei hohen Kalzium-Konzentrationen ($EC_{50} = 1 \mu\text{M}$) am C-terminalen Bereich der GC1. Die Neurocalcin δ -Interaktionsstelle überlappt nicht mit der S100 β -Interaktionsstelle. Je nachdem, welche regulatorischen Kalzium-Sensor Proteine in einer Nervenzelle mit der GC1 koexprimiert werden, erfolgt die Aktivierung bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen (\rightarrow GCAP1 und GCAP2) oder bei hohen Kalzium-Konzentrationen (\rightarrow S100 β und Neurocalcin δ). Diese Eigenschaft macht die GC1 mit ihren Regulatoren zu einer universellen Maschinerie für Nervenzellen, in denen Signalkaskaden mit Kalzium und cGMP ablaufen. Deshalb ist es wichtig, die Kalzium-abhängige Regulierung der GC1 auf molekularer Ebene zu verstehen. (zur Übersicht: Sharma et al., 2004)

1.6 Fragestellung und experimenteller Ansatz

Die membranständigen Guanylatzyklasen GC1 und GC2 regulieren, im Wechselspiel mit einer Phosphodiesterase, die Konzentration des Botenstoffes cGMP. Bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen stimulieren Guanylatzyklase-aktivierende Proteine (GCAP1 und GCAP2) die GCs, indem eine unbekannte Zahl von GCAPs mit einem GC-Dimer einen Proteinkomplex bildet. Da das GC/GCAP-System eine zentrale Rolle während der Adaptation der Sehzelle einnimmt ist es wichtig, die Kalzium-abhängige Dynamik des GC/GCAP-Systems auf molekularer Ebene zu verstehen.

Eine häufig verwandte Methode, um Struktur-Funktions-Beziehungen von Proteinen aufzuklären, ist der Austausch oder der Einbau von Cystein-Resten. Mit Hilfe thiolreaktiver Substanzen läßt sich untersuchen, ob Cystein-Reste für diese Substanzen zugänglich sind oder ob Konformationsänderungen die Zugänglichkeit beeinflussen. Ebenso können solche Cystein-Mutanten ortsspezifisch, beispielsweise mit Fluophoren, modifiziert werden. Die Grundlage meiner Doktorarbeit sollten Cystein-Mutanten von GCAP2 bilden, deren Cystein-Reste in allen möglichen Kombinationen gegen Alanin-Reste ausgetauscht sind. Diese Cystein-Mutanten sollte ich zuerst genetisch herstellen, heterolog exprimieren und reinigen, um mit ihnen folgende Fragen beantworten zu können:

(1) **Beeinflussen die Mutationen die GC-Aktivierung?**

Der erste und der zweite Cystein-Rest von GCAP2 liegen in Regionen, die für die GC1-Regulation wichtig sind (siehe 1.4.1). Wäre die GC1-Aktivierung durch die Mutationen gestört, würde dies bereits bekannte Ergebnisse bestätigen. Wäre auch die GC2-Aktivierung gestört, ließe dies Rückschlüsse auf die GC2/GCAP2-Interaktion zu.

(2) **Welche Cystein-Reste sind für DTNB zugänglich?**

Hwang et al. (2001) konnten diese Frage für GCAP1 beantworten. Mit dem gleichem experimentellen Ansatz sollte ich untersuchen, ob die Cystein-Reste von GCAP2 Kalzium-abhängig für die thiolreaktive Substanz DTNB zugänglich sind oder nicht. Sollte dies für den ersten und den zweiten Cystein-Rest, der jeweils im ersten und dritten EF-Hand-Motiv liegt, der Fall sein, ließen sich die Kalzium-Affinitäten dieser EF-Hand-Motive bestimmen. Dies würde Rückschlüsse auf den Mechanismus der GCAP2-vermittelten GC1-Aktivierung zulassen.

(3) Lassen sich Konformationsänderungen durch Fluophore detektieren?

Die Mutanten von GCAP2, die nur noch einen Cystein-Rest besitzen, sollten sich ortsspezifisch mit thiolreaktiven Fluophoren koppeln lassen. Sollte sich die Fluoreszenz einer fluoreszenzmarkierten Mutante Kalzium-abhängig ändern, so ist der Bereich um den Fluophor an einer Konformationsänderung beteiligt. Ebenso sollte die Fluoreszenz dieser Mutanten in Gegenwart der GC1 gemessen werden. Sollte sich die Fluoreszenz Kalzium-abhängig ändern, so ist hier der Bereich um den Fluophor an der GC1/GCAP2-Interaktion beteiligt.

(4) Läßt sich ein Modell der GC1-Aktivierung bestätigen, teilweise bestätigen oder ausschließen?

Es sollte FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) zwischen unterschiedlich fluoreszenzmarkierten GCAP1- und GCAP2-Mutanten in Gegenwart der GC1 gemessen werden. Sollte FRET auftreten, würde dies für die gleichzeitige Bindung beider GCAP-Isoformen an die GC1 sprechen. Ebenso sollte FRET zwischen fluoreszenzmarkierten GCAP-Mutanten und einer fluoreszenzmarkierten GC1-Form gemessen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien in p.A. Qualität stammten von AppliChem (Darmstadt), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biozym (Hess, Oldendorf), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Pierce (Rockford, USA), Serva (Heidelberg) und USB (Bad Homburg). Enzyme und dazugehörige Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), GIBCO BRL (Eggenstein), NEB (Schwalbach) und Roche (Mannheim) bezogen. Alle Lösungen wurden mit ddH₂O hergestellt. Soweit erforderlich wurden die Lösungen filtriert (0,22 µm Filter) oder autoklaviert (121°C; 20 min).

2.1.2 Geräte und Materialien

Extinktionen von Lösungen wurden an einem Ultraspec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech) bestimmt. Absorptionsspektren wurden an einem UV-Visible Spektrometer (Cary, Australien) aufgezeichnet. Emissionsspektren und Excitationsspektren wurden an einem Fluoreszenzspektrometer (Photon Technology International, Seefeld) aufgezeichnet. Chromatographien bei Proteinreinigungen wurden an einer FPLC-Anlage (Amersham Biosciences) oder an einer HPLC-Anlage (Waters) durchgeführt. Dialysen wurden mit Visking Dialyseschläuchen (Serva) oder Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (Pierce) durchgeführt. Es wurden Ultrazentrifugen der Typen L7-65 und TL100 (Beckmann) sowie Laborzentrifugen der Typen J2-21 (Beckmann), 2K15, 3K15 (Sigma) und 5415C (Eppendorf) benutzt. Um Proteine zu lyophilysieren, kam ein Speedvac Plus SC110 Vakuumkonzentrator (Savant) zum Einsatz.

2.1.3 Bakterienstämme

XL1-blue (*E.coli* K12) *recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 relA1 lac [F⁺:proA⁺B⁺, lacI^q Δ(lacZ)M15 Tn10(*tet^r*)];*

(Bullock et al., 1987; Stratagene)

BL21 (DE3) (*E.coli* B) F⁺ *ompT* [*lon*] *hsdS_B*(r_S⁻m_B⁺) *gal*[*dcm*] (DE3); (Novagen)

2.1.4 Plasmide

pcDNA3.1	wurde für die transiente Expression von ROS-GC1 und ROS-GC2 in tsA-Zellen verwendet
pBB-131	wurde für die Expression der NMT aus <i>S.cerevisiae</i> in <i>E.coli</i> verwendet
pET11a	wurde für die Expression von GCAP2-Formen in <i>E.coli</i> verwendet
pET21a	wurde für die Expression von GCAP1-Formen in <i>E.coli</i> verwendet
pIZT/V5His	wurde für die Expression von GC1cyt in Sf9-Zellen verwendet
pIZ	wurde für die Expression von CitrinGC1cyt in Sf9-Zellen verwendet

2.1.5 Molekulargewichtsstandards

2.1.5.1 Proteinstandards

“Low Molecular weight Calibration Kit” (LMW; Amersham Pharmacia Biotech)

Phosphorylase b	94 kDa	128 µg / ml
Rinderserumalbumin	67 kDa	166 µg / ml
Ovalbumin	43 kDa	294 µg / ml
Carbonatanhydrase	30 kDa	166 µg / ml
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	20,1 kDa	176 µg / ml
α-Lactalbumin	14,4 kDa	242 µg / ml

“High Molecular weight Calibration Kit” (HMW; Amersham Pharmacia Biotech)

Myosin	212 kDa	50 µg / ml
α ₂ -Makroglobulin	170 kDa	200 µg / ml
β-Galaktosidase	116 kDa	32 µg / ml
Transferrin	76 kDa	34 µg / ml
Glutamatdehydrogenase	53 kDa	36 µg / ml

2.1.5.2 DNA-Standards

λ-DNA, EcoRI und HindIII geschnitten (MBI Fermentas)

Fragmentgrößen: 21226 bp, 5148 bp, 4973 bp, 4268 bp, 3530 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp und 125 bp. Die Konzentration betrug 67 ng / µl.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*)

LB-Medium (Luria Bertani Medium)

1 % Baktotrypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl

Für LB-Agar-Platten wurde 1,5 % Agar zugesetzt.

Medium zur GCAP-Expression

1,6 % Baktotrypton; 1,5 Hefeextrakt; 0,5 % NaCl

Das Flüssigmedium wurde in Portionen aufgeteilt, autoklaviert (121°C; 20 min) und bei RT gelagert. Agar enthaltendes Medium wurde autoklaviert und in Petrischalen gegossen. Bei Bedarf wurde Ampicillin (Endkonzentration 100 µg / ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 30 µg / ml) zu dem höchstens 60°C heißen LB-Agar gegeben.

E.coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden mindestens 8 h in LB-Medium bei 37°C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick; Nörtingen) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel; Melsungen) inkubiert. Zur Selektion auf Plasmide wurde das LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotika versetzt.

2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA

CM-Puffer (10 x)

100 mM CaCl₂; 400 mM MgCl₂

2.2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* BL21 codon plus

Einhundert µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Plasmid-DNA (1 µl einer Mini-Plasmid-Präparation, siehe 2.2.5) erfolgte 30 min Inkubation auf Eis. Es folgte ein Hitzeschock für 25 sek bei 42°C und weitere 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 400 µl LB-Medium ließ ich die Zellen bei 37°C für 1 h wachsen. Der Transformationsansatz wurde dann komplett auf vorgewärmte LB-Agar-Platten mit geeignetem Selektionsantibiotika ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 37°C im Warmluftschrank.

2.2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* XL1 blue

Zu einer geeigneten Menge Plasmid-DNA (5 µl bis 10 µl eines Ligationsansatzes oder 100 ng bis 500 ng Plasmid DNA) wurde 10 µl 10 x CM gegeben und der Ansatz mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt. Einhundert µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zu dem Transformationsansatz gegeben. Nach 20 min Inkubation auf Eis folgte ein 1 min Hitzeschock bei 42°C. Nach weiteren 10 min auf Eis gab ich 400 µl LB Medium zu dem Transformationsansatz und ließ die Zellen bei 37°C für 1 h wachsen. Der Transformationsansatz wurde dann auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit geeignetem Selektionsantibiotika ausgestrichen. Die ausgestrichene Menge richtete sich nach der eingesetzten DNA-Menge. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 37°C im Warmluftschrank.

2.2.3 Phenol / Chloroform-Extraktion

Mit der Phenol / Chloroform-Extraktion habe ich Verunreinigungen, wie Proteine oder Lipide, aus Nukleinsäure-Lösungen entfernt. Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen einer 1 : 1 Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (18.300 g; 2 min; RT). Die wäßrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichem Volumen Chloroform versetzt, gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (18.300 g; 1 min; RT). Durch diesen Schritt habe ich Reste von Phenol aus der wäßrigen Phase extrahiert. Anschließend wurden die Nukleinsäuren aus der wäßrigen Phase mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.2.4).

2.2.4 Ethanol-Präzipitation von DNA

TE-Puffer

10 mM Tris / HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA

Um Nukleinsäuren zu präzipitieren, wurde eine NaAc-Konzentration von 0,3 M eingestellt und die Lösung mit dem 3-fachen Volumen Ethanol versetzt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren sedimentiert (18.000 g; 15 min bis 120 min; 4°C). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.5 Mini-Plasmid-Präparation

Lösung I

50 mM Glukose; 25 mM Tris / HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; autoklaviert

Lösung II

0,2 M NaOH; 1 % SDS; autoklaviert

Lösung III

3 M KAc; 11,5 % HAc; pH 4,8 mit HCl eingestellt; autoklaviert

TE_{RNAse}

TE-Puffer mit 5 µl / ml RNAse-Cocktail

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly; 1979). Von einer Bakterienkultur wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien pelletiert (18.300 g; 1 min; RT). Das Bakterienpellet habe ich dann in 100 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II wurden die Zellen lysiert. Proteine, Zelltrümmer, chromosomale DNA und SDS habe ich dann durch Zugabe von 150 µl Lösung III gefällt und in der Sigmazentrifuge pelletiert (18.300 g; 3 min; RT). Die Nukleinsäuren wurden mit Phenol / Chloroform gereinigt (siehe 2.2.3) und mit Ethanol präzipitiert (2.2.4).

Zu sequenzierende DNA habe ich nach der LiCl-Methode gereinigt. Dazu wurden die Bakterien aus 4 ml Kultur durch 2 Zentrifugationsschritte (18.300 g; 1 min; RT) in ein 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Analog zur oben beschriebenen Präparation, wurden 150 µl Lösung I, 180 µl Lösung II und 225 µl Lösung III zugegeben. Aus dem Überstand wurden mit 1,5 ml absolutem Ethanol die Nukleinsäuren präzipitiert und das Pellet in 120 µl 30 mM Tris / HCl pH 7,5 gelöst. Zur Präzipitation von RNA wurden 200 µl 4 M LiCl zugegeben, gemischt und zentrifugiert (18.300 g; 5 min; 4°C). Die DNA und Reste von RNA wurden durch Zugabe von 1000 µl Ethanol zum Überstand präzipitiert und sedimentiert (18.300 g; 5 min; 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl TE_{RNAse} aufgenommen und 10 min bis 20 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde mit Phenol / Chloroform gereinigt (siehe 2.2.3) und mit Ethanol präzipitiert (siehe 2.2.4). Das DNA-Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer gelöst.

2.2.6 Maxi-Plasmid-Präparation

Große DNA-Mengen (50 ml bis 500 ml Kultur) habe ich nach der LiCl-Methode gereinigt. Bakterien einer 500 ml Kultur wurden pelletiert (5.000 g; 15 min; 4°C) und in 20 ml Lösung I

(siehe 2.2.5) resuspendiert. Durch Zugabe von 24 ml Lösung II (2.2.5) wurden die Zellen lysiert. Proteine, Nukleinsäuren und SDS wurden durch Zugabe von 30 ml Lösung III (siehe 2.2.5) gefällt und pelletiert (5.000 g; 10 min; RT). Der Überstand wurde mit einem Faltenfilter filtriert und die Nukleinsäuren durch die Zugabe von 54 ml Isopropanol präzipitiert und sedimentiert (5.000 g; 10 min; 4°C). Das Pellet wurde in 3 ml 100 mM Tris / HCl pH 7,5 gelöst und die RNA durch Zugabe von 5 ml 4 M LiCl präzipitiert und sedimentiert (5.000 g; 5 min; 4°C). Aus dem Überstand wurde die DNA mit 3-fachem Volumen absoluten Ethanol gefällt und pelletiert (5.000 g; 10 min; 4°C). Um RNA-Reste zu entfernen, habe ich das Pellet in 500 µl TE_{RNAse} aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Nach zwei Phenol / Chloroform-Extraktionen (siehe 2.2.3) und einer Ethanol-Präzipitation (siehe 2.2.4) wurde das DNA-Pellet in 100 µl bis 300 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.7.1 Konzentrationsbestimmung von DNA mit Hilfe von Agarosegelen

Die DNA-Lösung wurde 1 : 20 in ddH₂O verdünnt. Auf ein Agarosegel wurden 1 bis 10 µl dieser Verdünnung und 10 µl DNA-Standard (siehe 2.1.5.2) aufgetragen. Durch den Vergleich der Bandenintensitäten konnte ich die DNA-Konzentration bestimmen.

2.2.7.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Oligonukleotiden oder RNA-freier DNA kann photometrisch erfolgen. Dazu wurde die DNA 1 : 100 in TE-Puffer verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg DNA / ml oder 33 µg Oligonukleotide / ml. Die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung konnte durch den Quotienten OD₂₆₀ / OD₂₈₀ bestimmt werden, dessen Wert nicht unter 1,8 liegen sollte.

2.2.8 DNA-Gelelektrophorese

TBE-Puffer (50 x)

2 M Tris / Borat pH 7,5; 50 mM EDTA

Farbmarker (10 x)

10 x TBE; 50 % Glycerin; 0,25 % Xylencyanol

DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe lassen sich durch die DNA-Gelelektrophorese zu analytischen oder präparativen Zwecken trennen. Dabei benutzte ich 0,75 %ige Agarosegele für DNA-Fragmente im Größenbereich von 500 bp bis 10.000 bp und höher konzentrierte Agarosegele 1 %ig bis 2 %ig) für kleinere DNA-Fragmente.

Die Agarose wurde in 1 x TBE aufgekocht und nach Abkühlung unter 60°C mit 1 µg / ml Ethidiumbromid versetzt. Diese Lösung goß ich dann in einen Gelträger mit Formtaschen für die Proben und ließ sie erkalten. Die Proben wurden mit 1 / 10 Volumen Farbmaler versetzt und in die Taschen gegeben. Als Laufpuffer habe ich 1 x TBE verwendet. Die Elektrophorese wurde bei maximal 120 V durchgeführt. Um die DNA-Banden zu sehen, wurde das Gel mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) bestrahlt.

2.2.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA eluierte ich aus Agarosegelen nach der Zentrifugationsmethode. Dabei wurde von einem Eppendorfreaktionsgefäß der Deckel abgetrennt, mit einer heißen Kanüle der Boden durchstoßen und das Reaktionsgefäß mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Dieses modifizierte Reaktionsgefäß wurde dann in ein zweites, intaktes, Reaktionsgefäß gesteckt. Das ausgeschnittene Agarosestück wurde nun auf die Glaswatte gelegt und zentrifugiert (7.000 g; 10 min; RT). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment, welches durch Phenol / Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt wurde.

2.2.10 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen von DNA wurden in den vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffern durchgeführt. Für analytische Restriktionen betrug die Enzymmenge 1 U bis 5 U pro µg DNA, die Inkubationszeit lag bei 1 h und die Inkubationstemperatur lag bei 37°C. Wurde DNA aus einer Mini-Plasmid-Präparation geschnitten (siehe 2.2.5), habe ich zusätzlich 0,3 µl RNase-Cocktail zugegeben. Der Ansatz aus DNA, Restriktionsenzymen, Puffer und eventuell RNase wurde mit ddH₂O auf 15 µl aufgefüllt. Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, sollte der Enzymanteil unter 5 % liegen.

Präparative Restriktionen wurden mit größeren Mengen Restriktionsenzym durchgeführt (bis 10 U / µg DNA) und länger inkubiert (2 h oder ü.N.).

2.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligase-Puffer (10 x)

600 mM Tris / pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 10 mM DTE; 10 mM ATP

Zur Ligation wurden 50 ng geschnittener Vektor und ein 3- bis 5-facher molarer Überschuß an Fragment in 1 x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U / µl; Roche) gemischt. Das Gesamtvolumen betrug 10 µl. Inkubiert wurde mindestens 30 min bei RT oder auch ü.N.

2.2.12 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) (Mullin et al., 1986)

Mit Hilfe der PCR können spezifische Fragmente von einer Matrizen-DNA amplifiziert werden. In mehreren Zyklen denaturiert die Matrizen-DNA und hybridisiert mit geeigneten Oligonukleotiden (Primern), welche dann durch hitzebeständige DNA-Polymerasen verlängert werden.

2.2.12.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden als Lyophilysat geliefert und konnten direkt in TE-Puffer aufgenommen werden.

2.2.12.2 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

Die PCR-Reaktionen wurden in einem „Trio-Thermoblock“ (Biometra) durchgeführt. Vor dem 1. Zyklus wurde die DNA bei 94°C für 2 min denaturiert. Während der Zyklen wurde jeweils für 40 sek denaturiert und hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der niedrigeren Schmelztemperatur T_m der beiden Primer. Sie wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$T_m = \frac{G}{C} \cdot 4^\circ C + \frac{A}{T} \cdot 2^\circ C - (\text{Anzahl Basenfehlpaarungen}) \cdot 4^\circ C - 4^\circ C$$

Zur Strangverlängerung wurde bei 72°C für 1 min inkubiert. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt.

2.2.12.3 Reinigung der PCR-Produkte

Die Analyse von PCR-Reaktionen erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Waren die PCR-Reaktionen positiv, reinigte ich die PCR-Produkte durch eine Phenol / Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.3) und präzipitierte sie mit Ethanol (siehe 2.2.4). Die gereinigten PCR-Produkte konnten nun zur weiteren Klonierung mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, über ein Agarosegel isoliert (siehe 2.2.9) und über eine Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt werden.

2.2.13 DNA-Sequenzierung mittels LICOR-Sequenzierer

Die Sequenzierung erfolgte mit dem LICOR DNA Sequenzer Long ReadIR 4200 (MWG-Biotech, Ebersberg).

Die Sequenzierreaktion erfolgte nach dem Prinzip der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die DNA wurde durch eine PCR mit IRD800-Fluophor markierten Primern fluoreszenzmarkiert. Ich habe das „DYEnamic Direct cycle sequencing Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Von der zu sequenzierenden DNA wurden 200 ng bis 1000 ng pro kbp zu sequenzierender DNA eingesetzt. Zugegeben wurden 0,8 µl Primer (2 pmol / µl) und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 7 µl aufgefüllt. Je 1,5 µl des Ansatzes wurde in 4 PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und 1,5 µl Terminationsmix zugegeben. Die Ansätze wurden mit 20 µl Chill-Out-Wachs überschichtet und zur Sequenzierungs-PCR eingesetzt.

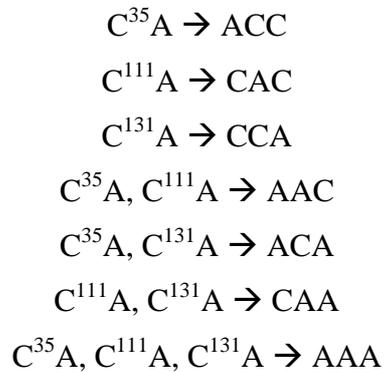
Die Sequenzierungs-PCR wurde in einem Trio-Thermoblock (Biometra) durchgeführt und unterschied sich nur gering von der PCR (2.2.12.2). Die Sequenzierungs-PCR hatte folgende Temperaturen und Zeiten:

Denaturierung	94°C	
Denaturierung	94°C	
Binden der Primer	50°C	
Strangverlängerung	70°C	
Ende	4°C	

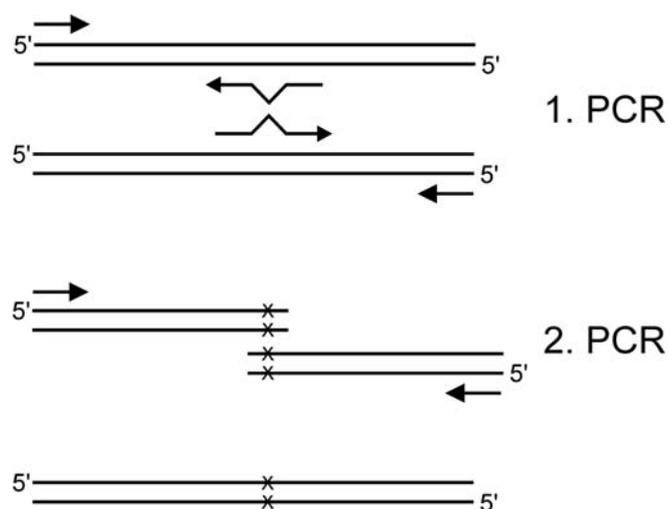
Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl Stoppuffer gestoppt. Auf das Sequenziergel wurden 1 µl bis 1,8 µl des Ansatzes aufgetragen.

2.2.14 Generierung genetisch veränderter GCAPs

Die Grundlage meiner Arbeit bildeten genetisch veränderte GCAP2-Mutanten, deren Cystein-Reste in allen möglichen Kombinationen gegen Alanin Reste ausgetauscht waren. Die Nomenklatur der Mutanten lautete wie folgt:



Um die GCAP2-Mutanten zu generieren, führte ich zwei aufeinander aufbauende PCRs durch. In der ersten PCR wurden Mutagenese-Primer und endständige Primer verwendet. Der 5'-endständige Primer besaß eine NdeI-Erkennungssequenz und der endständige 3'-Primer eine BamHI-Erkennungssequenz. Als Matrize diente pET11a-GCAP2. Die Produkte dieser PCRs besaßen die Mutation und wurden durch die 2. PCR, mit endständigen Primern, verlängert. Das Produkt der 2. PCR wurde mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI behandelt und über diese Schnittstellen in den Vektor pET11a ligiert. Die fertigen Konstrukte wurden sequenziert.



2.2.15 Generierung löslicher GC1-Konstrukte

GC1cyt

Der Teil des GC1-Gens, das die intrazelluläre Domäne der GC1 kodiert (GC1cyt), ist 1,8 kbp groß. Da das Größenlimit während einer DNA-Sequenzierung 1 kbp beträgt, konnte ich diesen Genabschnitt der GC1 nicht in einem Stück amplifizieren. Um dieses Problem zu umgehen, amplifizierte ich GC1cyt in zwei Teilen. Dazu fügte ich mit Hilfe von Primern eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease PstI ein. Die AS-Sequenz wurde dadurch nicht geändert (→ *silent mutation*). Als Matrize diente pcDNA3.1-GC1. Dieser Vektor enthielt das Gen für die GC1 aus dem Rind. Teil A amplifizierte ich mit dem 5'-Primer #3599, der eine optimierte Kozak-Sequenz und eine Erkennungssequenz für Asp718 besaß, und dem 3'-Primer #3596, der die Erkennungssequenz für PstI einfügte. Teil B wurde mit dem 5'-Primer #3595, der die Erkennungssequenz für PstI einfügte, und dem 3'-Primer #3597, der eine Erkennungssequenz für XbaI einfügte, amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und in den Vektor pIZT/V5His ligiert. Dieser Vektor wurde vorher mit den Restriktionsendonukleasen Asp718 und XbaI behandelt.

#3595

5'-CCCCTCCACTCTGCAGGCCCTCCGT

#3596

5'-ACGGAGGGCCTGCAGAGTGGAGGGG

#3597

5'-TGTTCTAGACCCAGCCTCACTTCCCA

#3599

5'-CAAGGTACCGTCATGGGACATTATTGTAGGCACCG

CitrinGC1cyt

Das für Citrin kodierende Gen wurde mit den Primern #4047 und #4048 von der Matrize pB-#4035/36-8 (von Dr. Wolfgang Bönigk erhalten) mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Der 5'-Primer #4047 besaß eine Erkennungssequenz für Asp717 sowie eine optimierte Kozak-Sequenz und kodierte für sechs Histidin-Reste. Dieser sogenannte His-Tag sollte die spätere Reinigung von CitrinGC1cyt erleichtern. Der 3'-Primer #4048 besaß eine Erkennungssequenz für NdeI und kodierte für sechs Glycin-Reste. Diese sollten im CitrinGC1cyt-Konstrukt einen *linker* zwischen den Proteinteilen Citrin und GC1cyt bilden.

#4047:

5'-GCCGGTACCATGCATCAGCATCAGCATCAGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT

#4048:

5'-CCGCATATGTCCACCTCCACCTCCACCCTTGTACAGCTCGTCCATG

Das für GC1cyt kodierende Gen wurde aus dem Konstrukt pET21a-GC1cyt mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und NotI geschnitten. Citrin und GC1cyt wurden in den Vektor pIZ, der mit Asp718 und NotI behandelt war, ligiert.

2.3 Heterologe Genexpression in tsA-Zellen

Die GC1 und die GC2 sind membranständige Proteine. Daher wurden sie nicht in Bakterien, sondern in eukaryotischen tsA-Zellen exprimiert. Bei tsA-Zellen handelt es sich um modifizierte HEK293-Zellen (*human embryonic kidney cells*), die stabil mit dem viralen SV40T-Antigen transfiziert sind. Sie zeigen eine ähnlich hohe Expressionsrate wie HEK293-Zellen, die mit Butyrat gestreßt wurden.

2.3.1 Transiente Expression

2 x BBS

50 mM N,N,-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure; 280 mM CaCl₂;
1,5 mM NaPO₄

Die transiente Expression von ROS-GC1 und ROS-GC2 erfolgte nach der CaPO₄-Methode (Chen & Okayama, 1987). Es wurden die Konstrukte pcDNA3.1-GC1 und pcDNA3.1-GC2 transfiziert. Kontrollzellen wurden analog, aber ohne DNA, behandelt. Dreißig µg DNA wurden mit ddH₂O auf 372 µl aufgefüllt. Dazu habe ich 123 µl 1 M CaCl₂ und 495 µl 2 x BBS gegeben. Die Transfektionsansätze wurden gut gemischt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Transfektionsansätze in Zell-Schalen (Ø 9 cm) pipettiert. Die DNA wurde durch eine 20 h bis 22 h lange Inkubation bei 35°C, 3 % CO₂ und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit präzipitiert. Die DNA-Präzipitate waren im Lichtmikroskop als grauer Schleier zu erkennen. Durch 5 ml PBS, 3 ml PBS / EDTA und 5 ml PBS wurden die DNA-Präzipitate abgewaschen. Danach wurden die Schalen wieder mit 8 ml vorgewärmten M10 Medium befüllt. Es folgte eine 20 h bis 22 h Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.3.2 Präparation von tsA-Zellmembranen

Lysepuffer

10 mM HEPES / KOH pH 7,5; 1 mM DTT

Resuspendierungspuffer

10 mM HEPES / KOH pH 7,5; 250 mM KCl; 10 mM NaCl; 1 mM DTT

Mit diesem Protokoll ist es möglich, Membranproteine nativ zu gewinnen, da keine Detergentien benutzt werden. Die Volumenangaben beziehen sich auf eine 9 cm Schale und können beliebig skaliert werden. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die tsA-Zellen wurden vorsichtig mit einem Gummischaber vom Schalenboden abgeschabt und mit M10 Medium in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden pelletiert (200 g; 5 min; 4°C). Die Zellen habe ich dann in 8 ml PBS aufgenommen, erneut pelletiert und in 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. An diesem Punkt konnten die Zellen schockgefroren und bei -80°C gelagert werden, um die Präparation zu einem späteren Zeitpunkt fortzusetzen. Die Zellen wurden nun sonifiziert (4 x 5 sek; 80 W bis 100 W). Größere Teiltrümmer und Zellkerne wurden durch Zentrifugation entfernt (400 g; 5 min; 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In der Ultrazentrifuge wurden nun die Membranen pelletiert (125000 g; 15 min; 4°C). Das Membranpellet habe ich dann in 100 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen und 30 min bis 60 min lösen lassen. Zur besseren Homogenisierung wurde noch kurz sonifiziert (5 sek; 80 W bis 100 W).

Die Proteinbestimmung habe ich mit der Amido-Schwarz-Methode durchgeführt. Die Ausbeuten betragen 100 µg bis 200 µg Protein pro 9 cm Schale.

2.4 Heterologe Genexpression in Sf9-Zellen

Die Konstrukte der intrazellulären Domäne der GC1 (GC1cyt und CitrinGC1cyt) wurden in Sf9-Zellen exprimiert. Dabei handelte es sich um Insektenzellen aus dem Schmetterling. Diese Zellen konnten sowohl adherent, als auch in einer Suspensionskultur gehalten werden. Sie wuchsen bei einer Temperatur von 27°C in "Grace's Insect Medium" (GIBCO), das mit 1 % (v / v) Antibiotikum / Antimykotikum (GIBCO) und 10 % fötalem Rinderserum (Biochrom AG) angereichert war.

Transfektion

Die Transfektionen von Sf9-Zellen wurden in Flaschen durchgeführt. Den 25 cm² messenden Boden der Flaschen sollten die Sf9-Zellen zu etwa 50 % bedecken. Eine h vor der Transfektion wurden die Zellen in "Grace's Insect Medium" ohne Zusätze (Medium⁻) gebracht. Dreißig µl Cellfectin (Invitrogen) wurden mit 300 µl Medium⁻ in einem Reaktionsgefäß gemischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 5 µg DNA mit Medium⁻ auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt. Bei Ansätze wurden vereinigt und 15 min bei RT inkubiert. Zum Transfektionsansatz gab ich 2,4 ml Medium⁻ und gab diese Lösung auf die Zellen. Vierunzwanzig h später ersetzte ich das Medium⁻ mit Medium, daß Antibiotikum, Antimycotikum und fötales Rinderserum enthielt. Sollte ein stabile Zelllinie generiert werden, erfolgte eine Selektion mit 800 µg / ml Zeocin.

2.5 Allgemeine biochemische Methoden

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (1976)

Die Konzentration von Proteinlösungen habe ich mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Eine Probe der Proteinlösung wurde mit ddH₂O auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Anhand einer BSA-Kalibriergeraden (1 µg bis 10 µg BSA) konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden. Zur Konzentrationsbestimmung von GCAP-Lösungen benutzte ich eine GCAP-Kalibriergerade.

2.5.1.2 Amido-Schwarz Proteinbestimmung

Amido-Schwarz Färbelösung

45 % (v / v) Methanol; 10 % (v / v) HAC; 0,5 % (w / v) Amidoschwarz

Amido-Schwarz Entfärbelösung

90 % (v / v) Methanol; 2 % (v / v) HAC

Elutionslösung

90 % (v / v) Methanol; 2 % (v / v) HAC; 8 % (v / v) H₂O

Weitere verwendete Lösungen

10 % (w / v) SDS

104 % (w / v) und 6 % (w / v) TCA

1 M Tris / HCl pH 7,5; 1 % (w / v) SDS

Enthielt eine Proteinlösung Lipide oder Detergentien, habe ich die Amidoschwarz-Methode angewandt. Bei dieser Methode wird die an Protein gebundene Menge von Amido-Schwarz photometrisch bestimmt.

Die Proteinprobe wurde mit ddH₂O auf 200 µl aufgefüllt. Zu diesem Ansatz gab ich dann 20 µl 10 % (w / v) SDS um Proteine zu solubilisieren, 30 µl 1 M Tris / HCl pH 7,5 / 1 % (w / v) SDS und 60 µl 104 %ige TCA um Proteine zu fällen. Dann erfolgte eine 5 bis 10 minütige Inkubation bei RT. Anschließend pipettierte ich die Lösungen punktförmig auf eine Filtermembran (0,45 µm Porendurchmesser; Whatman), welche auf einer Saugglasfritte lag und mit 6 %iger (w / v) TCA angefeuchtet war. Dann wurde die Filtermembran 10 min bei RT in Amido-Schwarz Färbelösung inkubiert, die Membran mit ddH₂O abgespült und mehrmals in Amido-Schwarz Entfärbelösung gewaschen. Die gefärbten Bereiche habe ich ausgeschnitten und mit 1 ml Lösungsmittel in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurde die OD₆₃₀ gemessen. Anhand einer parallel erstellten BSA-Kalibriergeraden konnte ich dann die Proteinkonzentration bestimmen.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Elektrodenpuffer

25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS (w / v)

Probenpuffer, 4 x konzentriert

200 mM Tris / pH 7,2; 50 % Glycerin (v / v); 4 % β-Mercaptoethanol (w / v);

6,4 % SDS (w / v); 0,52 % Bromphenolblau (w / v)

Coomassie-Färbelösung

25 % Ethanol; 5 % Essigsäure; 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva Blue R)

Coomassie-Entfärbelösung

25 % Ethanol; 5 % Essigsäure

Sammelgel

500 µl 0,5 M Tris / pH 6,8; 20 µl 10 % (w / v) SDS; 340 µl 30 % Acrylamid; 40 µl 10 % APS; 2 µl TEMED; mit ddH₂O auf 2 ml auffüllen

Trenngel

	<u>Prozentigkeit des Gels</u>			
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Tris 1,5 M pH 8,8	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
SDS 10 %	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
Acrylamid 30 %	1,5 ml	2 ml	2,5 ml	3 ml
APS 10 %	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
ddH ₂ O	2,9 µl	2,4 ml	1,9 ml	1,4 ml

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Modifikationen nach Laemmli (1970) getrennt. Dazu wurden die Proteinproben mit 1 / 3 Volumen 4 x Probenpuffer versetzt. Der Strom betrug im Sammelgel 15 mA und im Trenngel 20 mA. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung gefärbt und in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt.

2.5.3 Western Blot

PBS (phosphate buffered saline)

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4

Milchlösung

PBS; 0,05 % Tween 20; 1 % (w / v) Milchpulver (Glücksklee)

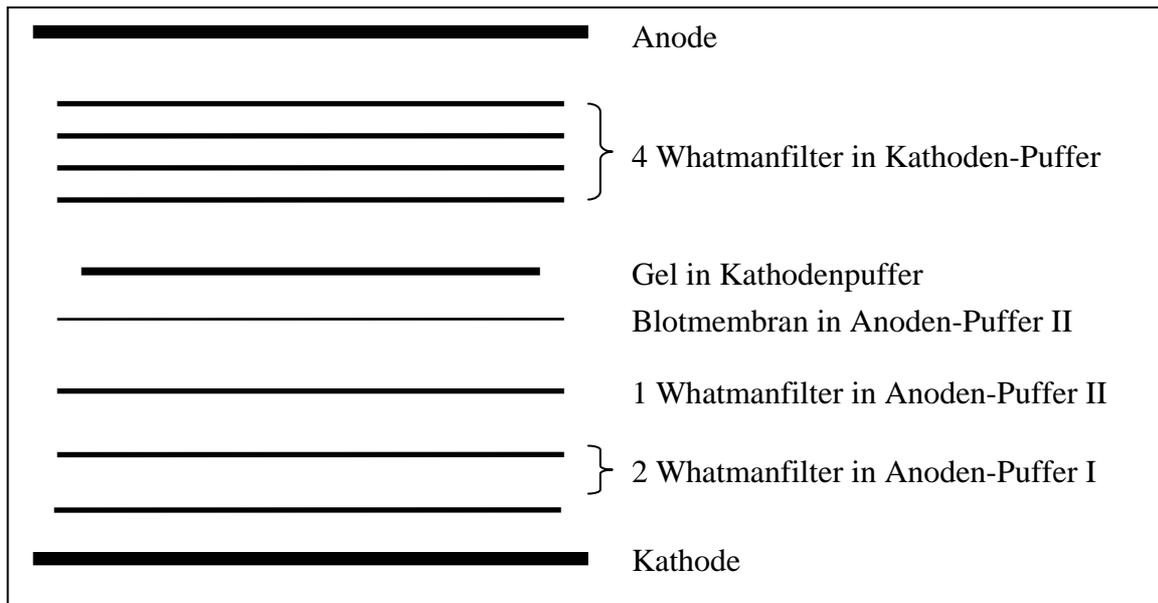
Primärer Antikörper

verdünnt in: PBS; 0,05 % Tween 20

Sekundärer Antikörper (Amersham Biosciences)

1 : 5000 verdünnt in: PBS; 0,05 % Tween 20; 0,1 % Milchpulver

Der immunchemische Nachweis von Proteinen wurde nach dem Western Blot Verfahren durchgeführt. Dazu wurden die Proteine eines SDS-PAGE-Gels auf eine ImmobilonP Blotmembran (Millipore) übertragen. Dies geschah nach dem Halbtrockenverfahren (Towbin et al., 1979) in einer Milliblot-Kammer (Millipore). Die Stromstärke betrug 2,5 mA / cm² und die Blotdauer betrug 35 min.



Der Western Blot wurde in drei Schritten entwickelt. Im ersten Schritt wurden Protein-freie Stellen der Membran mit Proteinen der Milchlösung gesättigt. Im zweiten Schritt wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert und im dritten Schritt mit dem sekundären Antikörper, an den Meerrettichoxidase gekoppelt war. Die anschließende Chemilumineszenz-Reaktion wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten entweder für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Blotmembran mit PBS / 0,05 % Tween 20 für 3 x 10 min bei RT gewaschen. Alle Schritte erfolgten unter Schütteln.

In dieser Arbeit wurden folgende primären Antikörper verwendet:

Antikörper	aus	Verdünnung	Epitop
PAK115#4 [†]	Kaninchen	1 : 500	A ²¹⁸ -Q ³⁴⁶
PAK106#4 [†]	Kaninchen	1 : 2000	G ²¹⁷ -D ³⁴³
PAK α -GCAP2	Kaninchen	1 : 5000	GCAP2

2.5.4 *reversed phase* HPLC

Um Proteine oder Nukleotide zu trennen, habe ich die *reversed phase* HPLC (*high performance liquid chromatography*) angewandt. Bei dieser Chromatographiemethode werden Moleküle aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften getrennt. Die Komponenten des HPLC-Systems stammten von Waters (Milford, USA). Es bestand aus Pumpen des Typs 501,

einem Autosampler des Typs 712WISP und einem UV-Detektor des Typs 484. Die Geräte wurden durch das Programm "Waters Millennium³²" über ein "Waters Pump Control"-Modul und ein "Waters busSAT/IN"-Modul gesteuert.

2.5.4.1 Trennung von Proteinen

Um den Myristylierungsgrad von GCAPs zu bestimmen bzw. freien Fluophor von GCAPs zu trennen, wurde eine Säule des Typs GRACE Vydac 238TP C18-Monomeric (5 μ M) der Dimension 0,46 x 15 cm benutzt. Der UV-Detektor konnte auf verschiedene Wellenlängen eingestellt werden (220 nm bis 600 nm). Folgender Gradient wurde bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml / min verwendet.

Zeit (min)	% A (0,1 % TFA in ddH ₂ O)	% B (0,1 % TFA in Methanol)
0	100	0
3	65	35
45	30	70
47	0	100
49	100	0

2.5.4.2 Trennung von Nukleotiden

Durch GC-Assays wurde die Aktivität von GCs bestimmt. Die Menge an synthetisiertem cGMP konnte mit Hilfe der HPLC quantifiziert werden. Dabei wurde eine LiChroCART 250-4 Säule, die mit LiChrisper 100 RP18 (5 μ m) (Merck, Darmstadt) gefüllt war, benutzt. Der UV-Detektor maß die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm. Folgender Gradient wurde bei einer Flußgeschwindigkeit von 1,2 ml / min verwendet:

Zeit (min)	% A (5 mM KH ₂ PO ₄)	% B (Methanol)
0	100	0
4	85	15
9	30	70
10	100	0
14	100	0

2.6 Expression und Reinigung von GCAPs

2.6.1 Expression von GCAPs

dYT-Medium

1,6 % Baktotrypton (w / v); 1 % Hefeextrakt (w / v); 0,5 % NaCl; autoklaviert

Myristinsäure

50 mg / ml (w / v) in Ethanol

GCAPs wurden in den *E. coli*-Stämmen BL21 codon plus oder LysS exprimiert. Da GCAPs nativ myristyliert sind, *E. coli* aber keine Myristyltransferase besitzt, habe ich zu den GCAP-Expressionsvektoren das Plasmid pBB131 (bereitgestellt von Dr. J. I. Gordon) kotransformiert. Das Plasmid pBB131 enthält das Gen für die N-terminale Myristyltransferase aus Hefe, sodaß die Expression myristylierter GCAPs möglich war.

Mit 2 ml einer ü.N.-Kultur wurden 500 ml dYT-Medium, das 100 µg / ml Ampicilin und 25 µg / ml Kanamycin enthielt, inokuliert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 habe ich Myristinsäure zugegeben (Endkonzentration 100 µg / ml) und bei einer OD₆₀₀ von 0,6 die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert. Nach 4 h wurden die Zellen pelletiert (5000 g; 10 min; 4°C) und das Pellet von 1 l Bakterienkultur in 40 ml 50 mM Tris / HCl pH 8,0 aufgenommen.

2.6.2 Bakterien-Aufschluß und Solubilisierung von *inclusion bodies*

Solubilisierungspuffer

6 M Guanidinium-Hydrochlorid, 1mM DTT

Dialysepuffer

150 mM NaCl; 20 mM Tris / pH 8,0; 1 mM DTT

Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen, wurden die GCAPs von mir aus *inclusion bodies* gereinigt.

Zu der Bakteriensuspension (siehe 2.5.1) habe ich 100 µg / ml Lysozym und 5 u / ml DNase gegeben. Diesen Ansatz inkubierte ich für 30 min im 30°C warmen Wasserschüttler und gab dann 1 mM DTT (final) und 0,1 mM PMSF (final) zu. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden pelletiert (360.000 g, 30 min, 4°C), das Pellet in Solubilisierungspuffer aufgenommen (40 ml bis 60 ml pro Liter Bakterienkultur) und bei RT durch Rühren gelöst. Es folgten zwei

Dialyseschritte gegen 5 l Dialysepuffer für jeweils 5 h (alternativ ü.N.). Unlösliche Proteine wurden pelletiert (360.000 g, 30', 4°C) und die löslichen Proteine mit 67 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aus dem Überstand gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden sedimentiert (60.000 g; 30 min; 4°C) und das Proteinpellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.6.3 Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie

Gelfiltrations-Puffer

20 mM Tris / pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; bei Reinigung von GCAP1 2 mM EGTA; bei Reinigung von GCAP2 2 mM CaCl_2

(NaCl)-Puffer

20 mM Tris / pH 7,5; 1 mM DTT; bei Reinigung von GCAP1 2 mM EGTA; bei Reinigung von GCAP2 2 mM CaCl_2

Puffer A

20 mM Tris / pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; bei Reinigung von GCAP1 2 mM EGTA; bei Reinigung von GCAP2 2 mM CaCl_2

Puffer B

Puffer A mit 1 M NaCl

Nach Information von Dr. Ji-Young Hwang ist die Reinigung von myr-D⁶S-GCAP1 in Gegenwart von 2 mM EGTA und die Reinigung von myr-wt-GCAP2 in Gegenwart von 2 mM CaCl_2 am effektivsten. Die Gelfiltration und die Ionenaustausch-Chromatographie führe ich an einer ÄKTA-FPLC (Amersham Pharmacia) durch.

Gelfiltration

Zur Reinigung von GCAPs benutzte ich eine "HiLoad 16 / 60 Superdex 75 prep grade" Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia), welche nach Herstellerangaben äquilibriert war. Ein $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pellet (siehe 2.5.2) wurde in 2 ml bis 3 ml ddH₂O aufgenommen und zentrifugiert (30.000 upm; TLA100.3; 15 min; 4°C). Der Überstand wurde bei einer Flußrate von 1 ml / min auf die Gelfiltrationssäule appliziert und das Eluat in Fraktionen von 2 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen mit viel GCAP und wenig *E. coli*-Protein wurden in die Ionenaustausch-Chromatographie eingesetzt.

Ionenaustausch-Chromatographie

Zur weiteren Reinigung von GCAPs benutzte ich eine "UnoQ6" Anionenaustausch-Säule (Biorad), welche nach Herstellerangaben regeneriert und äquilibriert war. Die Fraktionen der Gelfiltration wurden 1 : 3 in (NaCl)⁻-Puffer verdünnt und bei einer Flußrate von 0,5 ml / min auf die Säule appliziert. Nachdem ungebundene Proteine von der Säule gewaschen wurden (10 SV Puffer A), wurden die gebundenen Proteine in einem kontinuierlichen Gradienten (0 % Puffer B nach 55 % Puffer; 13 SV) bei einer Flußrate von 3 ml / min eluiert. Die 2 ml großen Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE analysiert.

2.6.4 Lyophilysieren und Lagerung von GCAPs

Die GCAP-enthaltenden Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie wurden vereinigt und für 2 x 5 h (alternativ ü.N.) gegen 5 l 50 mM Ammoniumbicarbonat bei 4°C dialysiert. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in einem Speedvac Konzentrator lyophilysiert und bei -80°C gelagert.

2.7 Fluoreszenzmarkierung von GCAPs

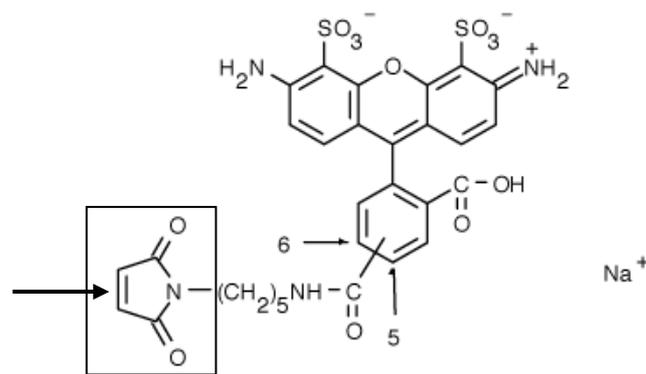
Kopplungspuffer

10 mM NaAc; 1 mM EGTA

Dialysepuffer

25 mM Tris pH 7,5; 125 mM NaCl

Die Fragestellung meiner Doktorarbeit erforderte es, GCAPs ortsspezifisch mit Fluophoren zu koppeln. Dazu nutzte ich Cystein-Mutanten von GCAPs, die nur noch einen Cystein-Rest besaßen. Damit war die Bindung thiolreaktive Fluophore auf diesen Cystein-Rest beschränkt. Ich verwendete die Fluophore Alexa-488, Alexa-647 (beide von Molecular Probes, Eugene, USA) und Atto-590 (Atto-Tec, Frankfurt). Diese waren mit einer thiolreaktiven Maleimid-Gruppe modifiziert. Nachfolgend ist die Struktur von Alexa-488-Maleimid gezeigt. Die Maleimid-Gruppe ist grau hervorgehoben. Thiole reagieren mit der Doppelbindung der Maleimid-Gruppe (Pfeil) und bilden einen Thioether, wodurch der Fluophor an das Protein gekoppelt wird.



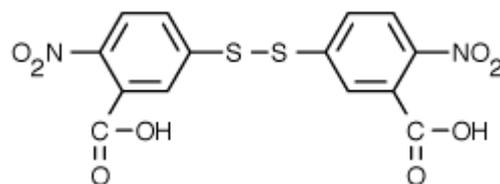
Lyophilisiertes GCAP wurde in Kopplungspuffer aufgenommen. Dazu gab ich einen 5fachen molaren Überschuss von Fluophor und ließ den Ansatz 150 min "end over end" in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen inkubieren. Dann stoppte ich die Reaktion durch die Zugabe von 2 mM DTT (finale Konzentration). Das DTT reagierte mit reaktiven Maleimid-Gruppen und deaktivierte sie so. Um freien, nicht an GCAP gekoppelten, Fluophor zu entfernen, führte ich 8 Dialyseschritte gegen Dialysepuffer durch. Mit weniger Dialyseschritten konnte der freie Fluophor nicht entfernt werden. Fluoreszenzmarkierte GCAPs wurden in lichtundurchlässigen Reaktionsgefäßen gelagert.

2.8 DTNB-Reaktion von GCAPs

DTNB-Lösung

10,8 mM DTNB in 100 mM Tris pH 8,0; Lösung mehrere sek sonifiziert (80 W – 100 W)

Die Zugänglichkeit von Cystein-Resten bestimmte ich durch die Reaktion mit dem thiolreaktiven 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Die Strukturformel des DTNB, welches auch als "Ellman's Reagenz" bekannt ist, ist nachfolgend gezeigt. Das DTNB besteht



aus zwei Molekülen TNB, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Diese Disulfidbrücke kann durch Thiole gespalten werden, wodurch ein Molekül TNB frei wird. Dieses absorbiert bei einer Wellenlänge von $\lambda = 412$ nm. Da die Stöchiometrie der Reaktion DTNB/Thiol eins

zu eins ist, kann man mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für TNB ($\epsilon = 13.600 \text{ cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$) die Menge reaktiver Thiole berechnen.

Lyophilisierte GCAPs wurden in PBS aufgenommen. Von dieser Lösung wurde eine Verdünnung (2 μM bis 3 μM GCAP) erstellt, die entweder 10 μM EGTA oder 10 μM CaCl_2 enthielt. Davon wurden 1,8 ml in eine Küvette überführt. In dieser Küvette befand sich ein Rührfisch, der durch einen im Cary-Photometer integrierten Magnetrührer angetrieben wurde. Um Blasenbildung während der Messung zu vermeiden, entgaste ich die GCAP-Lösung vorher. Dazu setzte ich die Lösung einem Unterdruck aus. Dafür nutzte ich einen Speedvac-Konzentrator. Der Rührfisch vermied dabei Siedeverzüge. Während der Messung konnte ich durch ein Spritzensystem verschiedene Lösungen in die Küvette geben. Um die DTNB-Reaktion zu starten, injizierte ich 10 μl der DTNB-Lösung (finale Konzentration: 60 μM). Nach 5 min injizierte ich in die EGTA-enthaltende GCAP-Lösung 20 μl 100 mM CaCl_2 (finale Konzentration: 100 μM). Zu der CaCl_2 -enthaltenden Lösung gab ich 20 μl 100 mM EGTA (finale Konzentration: 110 μM). Nach weiteren 5 min wurde die Messung gestoppt. Die Reaktionen fanden bei RT statt.

Um die Kalzium-Sensitivitäten der DTNB-Reaktionen zu bestimmen, paßte ich die Pufferbedingungen an die des GC-Assays (siehe 2.11) an. Dies sollte einen Vergleich der Kalzium-Sensitivitäten der DTNB-Reaktionen mit den aus GC-Assays ermittelten IC_{50} -Werten ermöglichen.

GC-Puffer + Mg^{2+}

75 mM Hepes pH 7,5; 16,67 mM NaCl; 176,67 mM KCl

Lyophilisierte GCAPs wurden in 50 mM Hepes pH 7,5 aufgenommen. Eintausendundachtzig μl GC-Puffer wurden mit 360 μl GCAP-Lösung versetzt. Dazu gab ich 360 μl NTA-Kalzium-Puffer, der entweder Magnesium enthielt oder nicht. Die GCAP-Konzentration dieser Lösung (Volumen: 1,8 ml) sollte etwa 2 μM GCAP betragen. Die Lösung wurde nach der oben beschriebenen Methode entgast. Die Messung wurde durch die Zugabe von 10 μl DTNB-Lösung (finale Konzentration: 60 μM) gestartet und nach 10 min beendet. Alle Messungen fanden bei RT statt.

Alle Kalzium-Puffer wurden mit NTA (Nitrilotriacetat) hergestellt und mit dem Programm WEBMAXC STANDARD (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm>) berechnet. Die NTA-Konzentration betrug 50 mM.

2.9 Reinigung von CitrinGC1cyt

Lysepuffer

20 mM Hepes pH 7,4; 0,1 mM PMSF; Proteinase-Inhibitor-Cocktail (EDTA-frei; Roche)

TsA-Zellen wurden inklusive Medium geerntet, zentrifugiert (400 g; 10 min; 4°C) und zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 40 ml Lysepuffer / 1 Zellen aufgenommen und auf Eis 6 x 15 sek sonifiziert. Danach gab ich 150 mM NaCl (finale Konzentration) zu und zentrifugierte die lysierten Zellen (100.000 g; 20 min; 4°C). Zum Überstand gab ich 10 mM Imidazol (finale Konzentration). In eine Biorad-Säule füllte ich 0,5 ml Nickel-NTA-Agarose (Qiagen) und äquilibrierte das Säulenmaterial mit 10 ml PBS / 10 mM Imidazol. Dann gab ich die zytosolische Fraktion der Sf9-Zellen auf das Säulenmaterial. Es folgte eine "end over end"-Inkubation ü.N. bei 4°C. Ungebundenes Protein wurde durch 20 ml PBS / 10 mM Imidazol entfernt. Die Elution erfolgte mit PBS / 250 mM Imidazol.

2.10 Präparation von ROS-Membranen

Wasch-Puffer

10 mM HEPES / pH 7,4; 1 mM DTT

ROS-Puffer

50 mM HEPES / pH 7,4; 500 mM KCl; 20 mM NaCl; 1 mM DTT

Die Rinderaugen wurden aus benachbarten Schlachthöfen geliefert und die Retinae am Liefertag präpariert. Aus den Retinae wurden die Stäbchen-Außensegmente (ROS, *rod outer segment*) nach der Methode von Schnetkamp und Daemen (1982) in Modifikation nach Koch et al. präpariert.

Um die ROS von ihren löslichen Bestandteilen, beispielsweise GCAPs, zu trennen, wurde die ROS-Suspension dreimal im 5-fachen Volumen Wasch-Puffer aufgenommen und zentrifugiert (360.000 g; 10 min; 4°C). Nach dem zweiten Waschen wurde das Pellet in dem halben ROS-Ausgangsvolumen ROS-Puffer resuspendiert. Alle Schritte fanden unter schwachem Rotlicht statt.

2.11 Bestimmung der GC-Aktivität

2,5 x Mg²⁺-Puffer

100 mM Hepes / KOH pH 7,5; 140 mM KCl; 20 mM NaCl; 25 mM MgCl₂; 5 mM GTP;
1 mM Zaprinast; 0,25 mM ATP

Die Aktivität von Guanylatzyklasen habe ich nach der Methode von Koch (1991) bestimmt. Dabei wird die Menge des synthetisierten cGMPs mit Hilfe der HPLC quantifiziert. GC-Assays mit ROS-Membranen wurden bei schwachem Rotlicht durchgeführt. GC-Assays mit heterolog exprimierten Guanylatzyklasen konnten bei Tageslicht durchgeführt werden. Der GC-Assay setzte sich wie folgt zusammen:

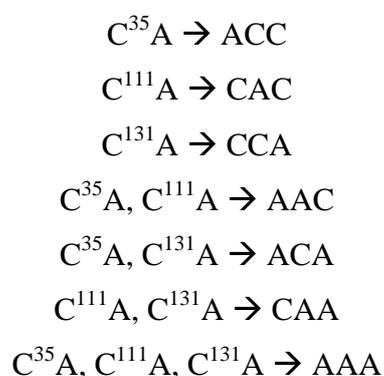
- 10 µl Lösung mit GC-Aktivität (ROS-Membranen oder heterolog exprimierte GCs)
- 20 µl 2,5 x Mg²⁺-Puffer
- 20 µl Zusätze (Ca²⁺-Puffer; GCAPs)

GC-Assays mit ROS-Membranen ließ ich 5 min bei RT präinkubieren, bevor ich die Reaktion durch die Zugabe des Mg²⁺-Puffers startete. Die Inkubationszeit betrug 5 min bei 30°C. Bei GC-Assays mit heterolog exprimierte GCs entfiel der Präinkubationsschritt und die Reaktionsdauer verlängerte sich auf 30 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 100 mM EDTA und durch 5 min Inkubation bei 95°C gestoppt. Unlösliche Bestandteile wurden sedimentiert (15.800 g; 10 min; 4°C) und der Überstand mittels *reversed phase* HPLC (2.4.4) analysiert. Über die Menge des synthetisierten cGMPs konnte ich die Umsatzgeschwindigkeit der GCs errechnen. Die Umsatzgeschwindigkeiten von GC-Assays mit ROS-Membranen normierte ich auf das eingesetzte Rhodopsin (nmol cGMP x min⁻¹ x Rhodopsin⁻¹), von GC-Assays mit heterolog exprimierten GCs normierte ich auf die eingesetzte Proteinmenge (nmol cGMP x min⁻¹ x Protein⁻¹).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von GCAP2-Mutanten

Die Fragestellung meiner Doktorarbeit erforderte es, GCAP2 ortsspezifisch, das heißt nur an bekannten Positionen des Proteins, modifizieren zu können. So sollten beispielsweise GCAPs mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Dazu boten sich die Thiolgruppen von Cystein-Resten an, da sie mit einer Vielzahl thiolreaktiver Substanzen, beispielsweise thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen, modifiziert werden können. In Abbildung 3.1 ist die NMR-Struktur von nichtmyristyliertem GCAP2 mit drei gebundenen Kalzium-Ionen dargestellt. Die drei Cystein-Reste von GCAP2 sind beschriftet und als Kugelmodell dargestellt. Der erste Cystein-Rest, C³⁵, liegt in der Schleife des ersten EF-Hand-Motivs. Dieses EF-Hand-Motiv wird als nicht funktionell beschrieben, da die Aminosäuresequenz nicht der eines kanonischen EF-Hand-Motivs entspricht und daher bei den physiologischen Kalzium-Konzentrationen der Sehzelle kein Kalzium bindet. Jedoch ist dieses EF-Hand-Motiv wichtig für die Aktivierung der GC1 (Ermilov et al., 2001). Der zweite Cystein-Rest, C¹¹¹, liegt in der Schleife des dritten EF-Hand-Motivs, welches funktionell ist und Kalzium binden kann. Der dritte Cystein-Rest, C¹³¹, liegt zwischen dem dritten und vierten EF-Hand-Motiv. Da ich diese Cystein-Reste ortsspezifisch, beispielsweise nur am C¹¹¹, modifizieren wollte, generierte ich genetisch veränderte GCAP2-Mutanten. In diesen GCAP2-Mutanten waren die drei Cystein-Reste in allen möglichen Kombinationen gegen Alanin-Reste ausgetauscht (Durchführung siehe 2.2.14). Dadurch erhielt ich GCAP2-Mutanten, die beispielsweise nur noch einen Cystein-Rest besaßen und folglich auch nur dort durch thiolreaktive Substanzen modifiziert werden konnten. Die GCAP2-Mutanten habe ich folgendermaßen benannt:



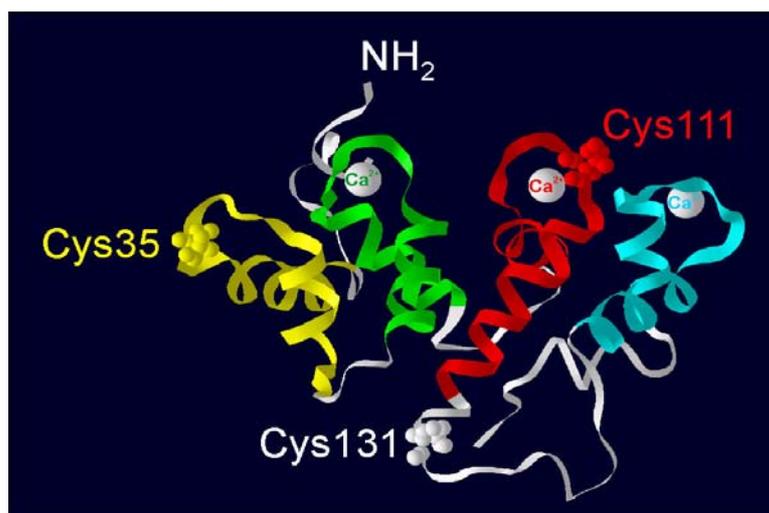


Abbildung 3.1: NMR-Struktur von nichtmyristyliertem GCAP2 aus dem Rind mit drei gebundenen Kalzium-Ionen (Ames et al., 1999). Die EF-Hand Motive sind farblich hervorgehoben (gelb: EF-Hand-Motiv 1; grün: EF-Hand-Motiv 2; rot: EF-Hand-Motiv 3; cyan: EF-Hand-Motiv 4). Die drei Cystein-Reste sind als Kugelmodell dargestellt. Die Abbildung wurde mit RasMol 2.6 erstellt.

Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen ist, liegen die Cystein-Reste C³⁵ und C¹¹¹ in funktionell wichtigen Regionen von GCAP2 (siehe 1.4). Der Cystein-Rest C³⁵ liegt in einer für die Interaktion mit der GC1 wichtigen Region (Ermilov et al., 2001) und der Cystein-Rest C¹¹¹ in der Schleife eines Kalzium-bindenden EF-Hand-Motivs. Deshalb könnten die AS-Austausche die GCAP-Funktion beeinflusst haben. Ebenso könnte der Austausch von C¹³¹, das in keiner für die GC-Aktivierung wichtigen Region liegt, die Funktion beeinflusst haben. Daher führte ich, nachdem ich die Mutanten heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt hatte, verschiedene Kontrollexperimente durch. Ich wies die Mutanten im Western Blot mit einem GCAP2-spezifischen Antikörper nach (siehe 3.1.1), untersuchte den Einfluß von Kalzium auf die elektrophoretische Mobilität der Mutanten (siehe 3.1.2), bestimmte den Myristylierungsgrad der Mutanten (siehe 3.1.3) und führte mit den Mutanten Aktivierungsstudien an verschiedenen GC-Formen durch (siehe 3.1.4).

3.1.1 Expression, Reinigung und Identifizierung von GCAP2-Mutanten

Da ich für die Experimente meiner Doktorarbeit große Mengen von GCAPs benötigte (mehrere mg jeder GCAP-Form), exprimierte ich alle GCAP-Formen (GCAP2-wt (→ Wildtyp), GCAP1-D⁶S und GCAP2-Mutanten) heterolog in *E. coli* (siehe 2.6). Da ich die GCAPs als myristyliertes Protein exprimieren wollte, *E. coli* jedoch keine N-terminale Myristyltransferase (NMT) besitzt, transformierte ich die GCAP-Expressionsvektoren zusammen mit dem Plasmid pBB131, welches das Gen der NMT aus Hefe besaß. Von

GCAP1 wurde die D⁶S-Mutante exprimiert, deren Erkennungssequenz für die NMT durch die Mutation optimiert war und so die Ausbeute der myristylierten GCAP1-Form erhöht werden konnte. Die Mutation beeinflusst die GC-Aktivierung nicht (Krylov et al., 1999). Die GCAP2-Erkennungssequenz für die NMT mußte nicht optimiert werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten GCAPs wurden in der myristylierten Form eingesetzt. Wurde nichtmyristyliertes GCAP eingesetzt, ist dies gekennzeichnet. Die GCAPs fanden sich sowohl in der zytosolischen, als auch in der nichtzytosolischen Fraktion von *E. coli*. Um möglichst viel GCAP zu erhalten, erfolgte die Reinigung aus der nichtzytosolischen Fraktion. Um die Proteine dieser Fraktion zu solubilisieren, wurden sie mit 6 M GHCl denaturiert und durch zwei Dialyseschritte, in denen das GHCl wieder entfernt wurde, renaturiert. Dies war möglich, da sich die GCAPs nach einer Denaturierung wieder funktionell zurückfalten lassen (Olshevskaya et al., 1997). Es folgten eine (NH₄)₂SO₄-Fällung, eine Gelfiltration und abschließend eine Anionenaustausch-Chromatographie. Der typische Verlauf einer GCAP-Reinigung, exemplarisch wurde die von CAA ausgewählt, ist in Abbildung 3.2 anhand eines SDS-PAGE-Gels dokumentiert. In der nichtzytosolischen Fraktion (Spur 3) war ein prominentes Protein zu sehen, dessen apparentes Molekulargewicht 22 kDa betrug. Bevor die Expression von CAA induziert wurde (Spur 2) sowie in der zytosolischen Fraktion nach der Induktion (Spur 4) war dieses Protein nur schwach zu erkennen. Nach den Dialyseschritten (Spur 5) wurde dieses Protein, sowie ein weiteres Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 60 kDa, angereichert. Neben diesen prominenten Proteinen waren schwach gefärbte Proteinbanden, die über die gesamte Spur verteilt waren, zu erkennen.

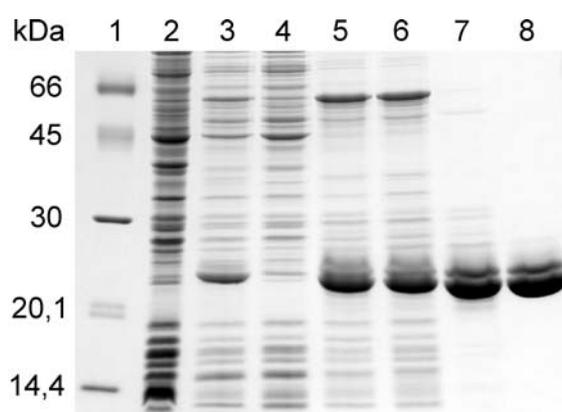


Abbildung 3.2: SDS-PAGE Gel, das den Verlauf einer GCAP-Reinigung dokumentiert. Exemplarisch wurde die Reinigung von CAA ausgewählt. Spuren: **1**, LMW; **2**, Lysat von *E. coli* bevor die Expression durch IPTG induziert wurde; **3**, unlöslicher Teil der Lysats von *E. coli* am Ende der Expression; **4**, löslicher Teil der Lysats von *E. coli* am Ende der Expression; **5**, Protein nach dem Rückfaltungsschritt; **6**, Protein nach der (NH₄)₂SO₄-Fällung; **7**, Protein nach der Gelfiltration; **8**, Protein nach der Anionenaustausch-Chromatographie; 12,5 %iges SDS-PAGE-Gel mit Coomassie gefärbt; Die Proben enthielten 1 mM Kalzium.

Das Bandenmuster nach der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (Spur 6) entsprach dem der Spur 5. Durch die Gelfiltration (Spur 7) konnte das 60 kDa Protein, sowie der Großteil der schwachen Proteinbanden, entfernt werden. Man erkennt, daß das 22 kDa Protein stark, und zusätzlich ein 23 kDa weniger stark, angereichert wurden. Durch die Anionenaustausch-Chromatographie konnten die schwach gefärbten Proteinbanden entfernt werden. Das gereinigte Protein wurde lyophilisiert und bei -80°C gelagert. Die Ausbeute lag zwischen 5 und 15 mg Protein pro Liter Bakterienkultur.

Nach der oben beschriebenen Methode habe ich alle GCAP2-Konstrukte exprimiert und 22 kDa bzw. 23 kDa große Proteine gereinigt. Um diese Proteine zu identifizieren, habe ich mit ihnen einen Western Blot (Durchführung siehe 2.5.3) mit einem GCAP2-spezifischen Antikörper durchgeführt. Das Ergebnis dieses Western Blots ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Der Antikörper markierte sowohl GCAP2-wt (Spur 2) als auch alle anderen Proteine (Spuren 3 bis 9). Somit handelte es sich bei diesen Proteinen um die GCAP2-Mutanten. Das Signal des Antikörpers war in den Spuren 4, 5, 6, 8 und 9 (CAC, ACC, CAA, AAC und AAA) schwächer als in den restlichen Spuren. Dies könnte in den Mutationen begründet sein, welche die Epitope des Antikörpers oder den Proteintransfer vom SDS-PAGE-Gel zur Western Blot Membran beeinflussen haben könnten. Auch könnte ich die Konzentration der GCAPs falsch bestimmt haben, wodurch ich unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt hätte. Bei CCA (Spur 3), ACA (Spur 7) und AAC (Spur 8) markierte der Antikörper eine zweite Proteinbande, deren elektrophoretische Mobilität niedriger war. Bei diesen Banden geringer Intensität handelte es sich um nichtmyristyliertes GCAP2 und bei den Banden hoher Intensität um myristyliertes GCAP2. Obwohl myristyliertes GCAP2 (23,8 kDa) ein um 200 Da höheres Molekulargewicht als nichtmyristyliertes GCAP2 (23,6 kDa) besitzt, liegt das apparente Molekulargewicht während einer SDS-PAGE niedriger (Hwang und Koch, 2002). Ein Grund für dieses Verhalten könnte in der Wechselwirkung zwischen der Myristingruppe und dem SDS liegen. Die Myristingruppe kann leicht SDS binden, wodurch sich die elektrophoretische Mobilität des myristylierten GCAP2 erhöht.

Da die SDS-PAGE in Gegenwart von 1 mM EGTA durchgeführt wurde, entsprachen die Banden der myristylierten GCAPs einem apparenten Molekulargewicht von 27 kDa und die der nichtmyristylierten GCAPs einem apparenten Molekulargewicht von 28 kDa.

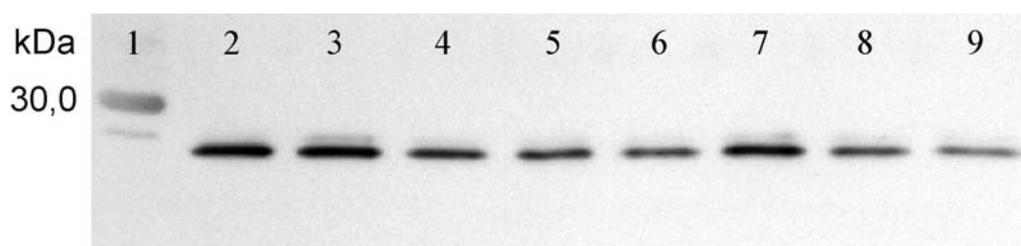


Abbildung 3.3: Immunchemischer Nachweis von GCAPs. Spuren: 1, LMW; 2, GCAP2-wt; 3, CCA; 4, CAC; 5, mACC; 6, CAA; 7, ACA; 8, AAC; 9, AAA; es wurden jeweils 50 ng GCAP auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen; 12,5 %-iges SDS-PAGE-Gel mit 1 mM EGTA.

3.1.2 Die elektrophoretische Mobilität von GCAP2-Mutanten

Die elektrophoretische Mobilität der GCAPs wird von der Kalzium-Konzentration beeinflusst. Bei einer niedrigen Kalzium-Konzentration zeigen sie eine niedrige Mobilität und bei einer hohen Kalzium-Konzentration eine hohe Mobilität (Gorczyca et al., 1995). Diese für GCAPs charakteristische Eigenschaft heißt Kalzium-Shift. Dem Kalzium-Shift liegt eine Kalzium-abhängige Konformationsänderung zugrunde, welche sogar unter den denaturierenden Bedingungen einer SDS-PAGE auftritt. In Abbildung 3.4 sind zwei SDS-PAGE Gele gezeigt, in denen jeweils GCAP2 und alle GCAP2-Mutanten aufgetragen wurden. In Teil A wurde die SDS-PAGE in Gegenwart von 1 mM EGTA und in Teil B in Gegenwart von 1 mM Kalzium durchgeführt. Man erkennt in den Spuren 2 bis 9 jeweils zwei Banden, eine schwach gefärbte Bande und darunter eine stark gefärbte Bande. Der Mobilitätsunterschied dieser Banden betrug etwa 1 kDa. Das apparente Molekulargewicht der Banden entsprach unter EGTA-Bedingungen (Teil A) etwa 27 kDa bis 28 kDa. Unter Kalzium-Bedingungen änderte sich die Mobilität der GCAPs und die Banden zeigten ein apparentes Molekulargewicht von etwa 20 kDa bis 21 kDa. Bei den stark gefärbten Banden handelte es sich um myristyliertes GCAP und bei den schwach gefärbten Banden um nichtmyristyliertes GCAP.

Die Kalzium-Shift Experimente zeigten, daß die Konformationsänderung, die den Kalzium-Shift bewirkt, durch die Mutationen nicht beeinflusst wurde.

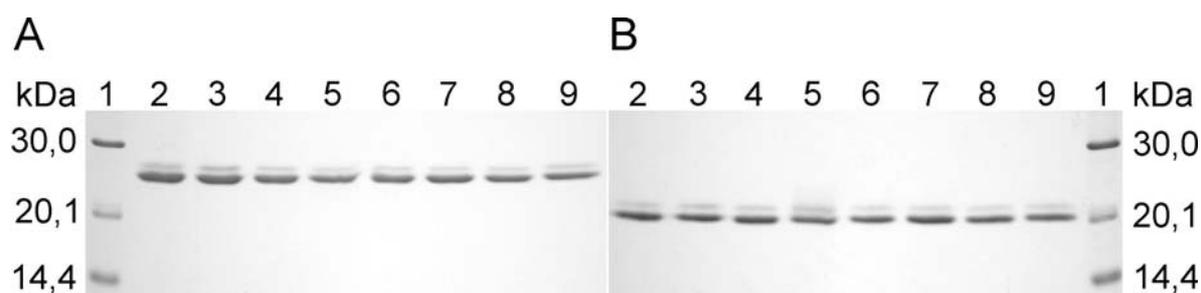


Abbildung 3.4: Kalzium-Shift der GCAP2-Mutanten. Spuren: 1, LMW; 2, GCAP2-wt; 3, CCA; 4, CAC; 5, ACC; 6, CAA; 7, ACA; 8, AAC; 9, AAA; (A) SDS-PAGE in Gegenwart von 1 mM EGTA; (B) SDS-PAGE in Gegenwart von 1 mM Kalzium; jeweils 3 µg GCAP aufgetragen; 12,5 %-iges SDS-PAGE-Gel.

3.1.3 Der Myristylierungsgrad der GCAP2-Mutanten

Wie in den Abbildungen 3.2, 3.3 und 3.4 zu sehen ist, wurden sowohl myristylierte, als auch nichtmyristylierte, GCAP2-Mutanten gereinigt. Anhand der SDS-PAGE-Gele und des Western Blots ließ sich der Anteil des myristylierten Proteins am gesamten GCAP, der Myristylierungsgrad, nur grob abschätzen. Mit Hilfe der analytischen *reversed phase* HPLC konnte ich den genauen Myristylierungsgrad bestimmen (siehe 2.5.4.1). Bei dieser Chromatographie-Technik werden Molekülgemische aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften getrennt. So eluieren hydrophile Moleküle eher als hydrophobe Moleküle. Für die GCAPs bedeutete dies, daß nichtmyristylierte GCAPs eher als myristylierte GCAPs eluieren. In der Abbildung 3.5 sind alle Chromatogramme der GCAP2-Mutanten dargestellt. Um die Peaks von nichtmyristylierten GCAPs identifizieren zu können, habe ich ACC als nichtmyristylierte Form (nmACC) exprimiert, gereinigt und die Retentionszeit dieser Mutante bestimmt (siehe Abb. 3.5 A). Durch den Vergleich der Retentionszeiten (siehe Tab. 3.1) konnte ich die Peaks der myristylierten und nichtmyristylierten GCAPs identifizieren und mit Hilfe der Peakflächen den Myristylierungsgrad bestimmen. Die Chromatogramme B bis H zeigten bei einer Retentionszeit von 27,72 bis 28,67 min einen kleinen Peak und bei einer Retentionszeit von 30,40 bis 31,22 min einen großen Peak. Da die Retentionszeit von nmACC (siehe Abb. 3.5, A) 28,31 min betrug, konnten die kleinen Peaks den nichtmyristylierten GCAPs zugeordnet werden. Demnach handelte es sich bei den späteren Peaks um die myristylierten GCAPs. Um den Myristylierungsgrad zu berechnen, wurden die Peaks der myristylierten und nichtmyristylierten GCAPs verwendet. Weitere Peaks, wie sie bei ACC und AAC bei einer Retentionszeit von 32 min auftraten (siehe Abb. 3.5, E und G), wurden nicht berücksichtigt. Diese zusätzlichen Peaks könnten durch anders gefaltete GCAP-Formen oder Verunreinigungen, die in den SDS-PAGE-Gelen nicht zu sehen waren, hervorgerufen worden sein. Die Myristylierungsgrade (siehe Tab. 3.1) lagen zwischen 86 % (CAC) und 93 % (AAC). Somit entsprach ein Großteil der GCAPs, der nativ vorkommenden, myristylierten Form.

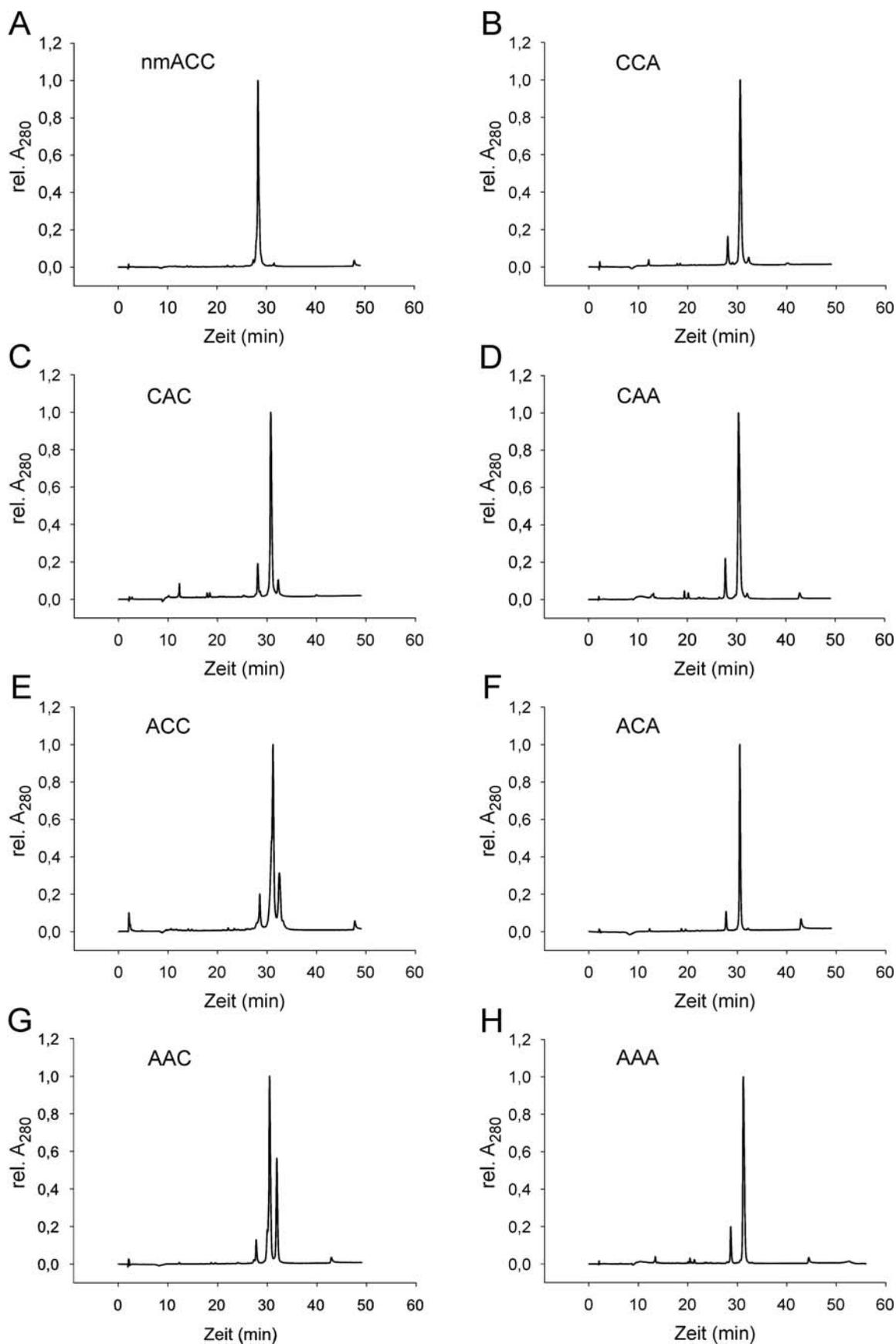


Abbildung 3.5: Chromatogramme der *reversed phase* HPLC-Analyse verschiedener GCAP-Formen. Es wurde die relative Absorption ($\lambda = 280$ nm) gegen die Zeit aufgetragen. (A) nichtmyristylierte (nm) Form von ACC, (B) CCA, (C) CAC, (D) CAA, (E) ACC, (F) ACA, (G) AAC, (H) AAA.

Tab. 3.1: Ergebnisse der *reversed phase* HPLC-Analyse.

GCAP-Form	Chromatogramm in Abb. 3.5	R _t / 1. Peak (min)	R _t / 2. Peak (min)	Myristylierungsgrad
nmACC	A	28,31	---	---
CCA	B	28,07	30,58	91 %
CAC	C	28,13	30,76	86 %
CAA	D	27,71	30,40	89 %
ACC	E	28,54	31,21	89 %
ACA	F	27,72	30,50	92 %
AAC	G	27,78	30,47	93 %
AAA	H	28,67	31,22	89 %

3.1.3 Regulation von GCs durch GCAPs

In vitro habe ich das GC/GCAP-System durch einen GC-Assay simuliert. Dazu wurden ROS-Membranen, welche die GCs enthielten, mit hypotonischem Puffer gewaschen und mit GCAPs sowie einem Kalzium-Puffer substituiert (siehe 2.11). Die Menge synthetisierten cGMPs wurde dann mit Hilfe der *reversed phase* HPLC bestimmt (siehe 2.5.4.2). So ließ sich der zeitliche Verlauf der Kalzium-Abnahme nach Belichtung simulieren.

Mit Hilfe des GC-Assays ließen sich verschiedene Parameter des GC/GCAP-Systems bestimmen. Der erste Parameter war der EC₅₀-Wert (*effective concentration*), der die GCAP-Konzentration angab, bei der die GCs halbmaximal aktiviert wurden. Der EC₅₀-Wert könnte beispielsweise durch eine geänderte Affinität zwischen GCAPs und GCs beeinflusst werden. Man erhielt den EC₅₀-Wert, indem die GCAP-Konzentration bei gleichbleibender Kalzium-Konzentration titriert wurde. Der zweite Parameter war der IC₅₀-Wert (*inhibitory concentration*). Er gab die Kalzium-Konzentration an, bei der die GCs halbmaximal durch die GCAPs inhibiert wurden. Der IC₅₀-Wert könnte durch geänderte Kalzium-Affinitäten der GCAPs oder durch eine Störung der Kalzium-abhängigen Konformationsänderungen des GC/GCAP-Systems beeinflusst werden. Man erhielt den IC₅₀-Wert, indem die Kalzium-Konzentration bei gleichbleibender GCAP-Konzentration titriert wurde. Der dritte Parameter war X_{max}, der die x-fache Aktivierung der GCs angab. Bei einem X_{max} von 1 war die

maximale GC-Aktivität doppelt so hoch wie die minimale. Man berechnete X_{\max} mit den Daten einer GCAP-Titration:

$$X_{\max} = \frac{y_{\max-\min}}{y_{\min}}$$

Dabei war y_{\min} die minimale GC-Aktivität und $y_{\max-\min}$ die Differenz der maximalen und minimalen GC-Aktivität. Für y_{\min} habe ich den Meßwert der basalen, nicht durch GCAPs stimulierten GC-Aktivität eingesetzt. Für $y_{\max-\min}$ habe ich den aus der Kurvenanpassung (siehe unten) stammenden Wert übernommen.

Diese drei Parameter (EC_{50} , IC_{50} und X_{\max}) habe ich für alle GCAP2-Mutanten sowie für GCAP1-D⁶S und GCAP2-wt durch GC-Assays mit ROS-Membranen, in denen sich die GC1 und die GC2 befinden, und mit heterolog exprimierten GCs bestimmt. Zur Auswertung der GC-Assays, habe ich die GC-Aktivität gegen die GCAP-Konzentration bzw. die Kalzium-Konzentration aufgetragen. Dabei wurde die GC-Aktivität von ROS-Membranen auf die Assay-Dauer und die eingesetzte Rhodopsinmenge berechnet. Die GC-Aktivität heterolog exprimierter GCs wurde auf die Assay-Dauer und die eingesetzte Proteinmenge berechnet. Die resultierenden Einheiten der Aktivität waren "nmol cGMP / (min x mg Rhodopsin)" bzw. "nmol cGMP / (min x mg Protein)". Diese Daten habe ich dann an eine modifizierte Hill-Gleichung angepaßt:

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max-\min} \cdot x^h}{c^h + x^h}$$

Dabei war y_{\min} die minimale GC-Aktivität, $y_{\max-\min}$ die Differenz der maximalen und minimalen GC-Aktivität und h der Hill Koeffizient. Der EC_{50} - bzw. IC_{50} -Wert wurde durch c angegeben

3.1.3.1 GC-Assays mit ROS-Membranen

Die in den GC-Assays verwendeten ROS-Membranen wurden in hypotonischen Puffer gewaschen. Dadurch wurden die endogenen GCAPs entfernt. In den ROS-Membranen war sowohl die GC1, als auch die GC2 lokalisiert. Während die Konzentration der GC1 im Rinderstäbchen und ihre Umsatzgeschwindigkeit bekannt sind (Hwang et al., 2003), sind diese beiden Parameter für die GC2 unbekannt. Messungen an ROS-Membranen spiegelten somit die Summe der GC1- und der GC2-Aktivität wieder, ohne den GC-Isoformen spezifische Aktivitäten zuordnen zu können.

GCAP-Titrationsen mit ROS-Membranen

In der Abbildung 3.6 sind die Ergebnisse der GCAP-Titrationsen mit ROS-Membranen dargestellt. Um die GCs maximal zu aktivieren, fanden die GCAP-Titrationsen in Gegenwart von 2 mM EGTA und 0,1 mM ATP statt. Die GCAP-Konzentrationen variierten zwischen 0 μM und 5 μM (GCAP2 und GCAP1-D⁶S) sowie zwischen 0 μM und 12 μM (GCAP2-Mutanten). Dadurch wurden die Abzissen unterschiedlich gestreckt, was bei der Betrachtung der Kurven berücksichtigt werden muß.

Bei allen Messungen nahm die GC-Aktivität mit der GCAP-Konzentration zu, bis die GC-Aktivität einen maximalen Wert erreichte. Die aus den Kurvenanpassungen resultierenden EC_{50} -Werte und die X_{max} -Werte sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt. Die EC_{50} -Werte der GCAPs lagen im Bereich von 0,22 μM (AAC) und 0,77 μM (GCAP1-D⁶S). Bis auf die CCA Mutante ($EC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$) zeigten alle Mutanten niedrigere EC_{50} -Werte als GCAP2 (0,45 μM). Die X_{max} -Werte lagen im Bereich zwischen 1,8 (ACA) und 5,6 (GCAP1-D⁶S). Die höchsten X_{max} -Werte zeigten GCAP2-wt, GCAP1-D⁶S, CCA, CAC und CAA, also die GCAPs, welche an Position 35 einen Cystein-Rest besaßen. War dieser Cystein-Rest durch einen Alanin-Rest substituiert, was bei ACC, ACA, AAC und AAA der Fall war, lagen die X_{max} -Werte um etwa 50 % darunter.

Tabelle 3.2: EC_{50} -Werte und X_{max} -Werte der GCAP-Titrationsen mit ROS-Membranen.

GCAP-Form	EC_{50} (μM)	X_{max}
GCAP2-wt	0,45 +/- 0,17	4,5 +/- 0,5
GCAP1-D ⁶ S	0,77 +/- 0,69	6,8 +/- 2,0
CCA	0,50 +/- 0,16	5,0 +/- 0,5
CAC	0,29 +/- 0,05	5,5 +/- 0,4
CAA	0,31 +/- 0,05	4,4 +/- 0,3
ACC	0,29 +/- 0,05	2,0 +/- 0,2
ACA	0,35 +/- 0,03	1,8 +/- 0,1
AAC	0,22 +/- 0,01	2,3 +/- 0,1
AAA	0,27 +/- 0,02	2,4 +/- 0,1

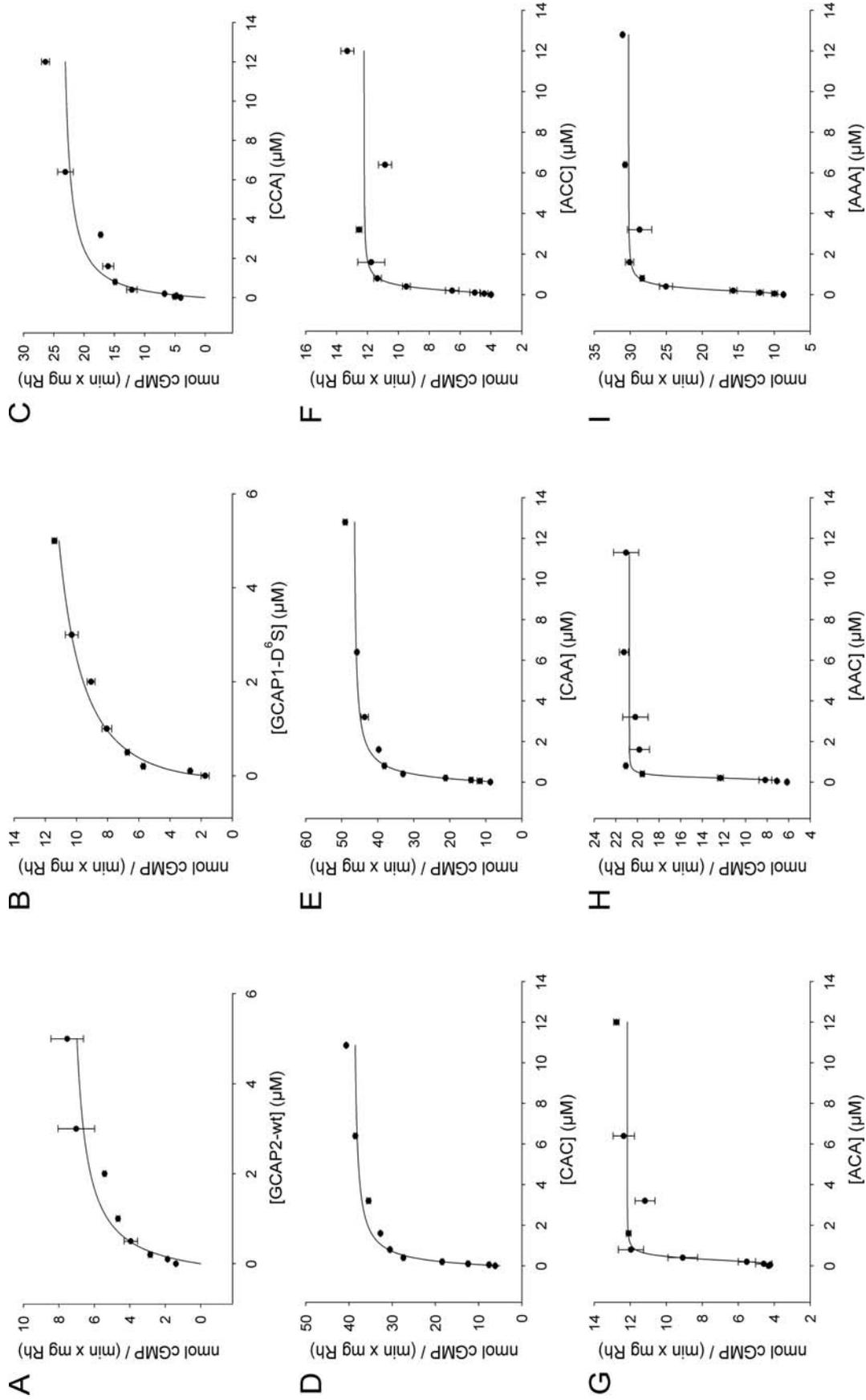


Abbildung.3.6: GCAP-Titrations mit ROS-Membranen. Die Titrations wurden in Gegenwart von 2 mM EGTA und 0,1 mM ATP durchgeführt. Die GC-Aktivität, angegeben in "nmol cGMP / (min x mg Rh)", wurde gegen die GCAP-Konzentration aufgetragen. (A) GCAP2-wt, (B) GCAP1-D⁶S, (C) CCA, (D) CAC, (E) CAA, (F) ACC, (G) ACA, (H) AAC, (I) AAA.

Kalzium-Titrationsen mit ROS-Membranen

Die Kalzium-Titrationsen wurden bei einer GCAP-Konzentration von 3 μM durchgeführt. Diese Konzentration lag mindestens um den Faktor 4 über den EC_{50} -Werten der GCAPs (siehe Tabelle 3.2), wodurch die GCs bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen maximal aktiviert werden sollten. Auch diese Titrationsen wurden in Gegenwart von 0,1 mM ATP durchgeführt. In Abbildung 3.7 sind die Ergebnisse der Kalzium-Titrationsen mit ROS-Membranen dargestellt. Alle GCAPs aktivierten die GCs bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen und inhibierten die GCs bei hohen Kalzium-Konzentrationen. Die IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt. Die IC_{50} -Werte von GCAP2-wt und der Mutanten lagen im Bereich zwischen 67 nM Kalzium (ACA) und 227 nM Kalzium (CAC). Der IC_{50} -Wert von GCAP1-D⁶S betrug 855 nM Kalzium und lag damit deutlich über den IC_{50} -Werten von GCAP2 und der GCAP2-Mutanten. Die Hill Koeffizienten aller GCAPs lagen im Bereich zwischen 1,4 (ACC) und 2,5 (CCA).

Tabelle 3.3: IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten der Kalzium-Titrationsen mit ROS-Membranen.

GCAP-Form	IC_{50} (nM Ca^{2+})	Hill-Koeffizient
GCAP2-wt	78 +/- 2	2,3 +/- 0,1
GCAP1-D ⁶ S	855 +/- 157	1,5 +/- 0,3
CCA	198 +/- 17	2,5 +/- 0,5
CAC	227 +/- 13	2,2 +/- 0,2
CAA	183 +/- 12	2,3 +/- 0,3
ACC	91 +/- 5	1,4 +/- 0,1
ACA	67 +/- 4	1,7 +/- 0,1
AAC	85 +/- 1	2,3 +/- 0,1
AAA	183 +/- 12	2,3 +/- 0,3

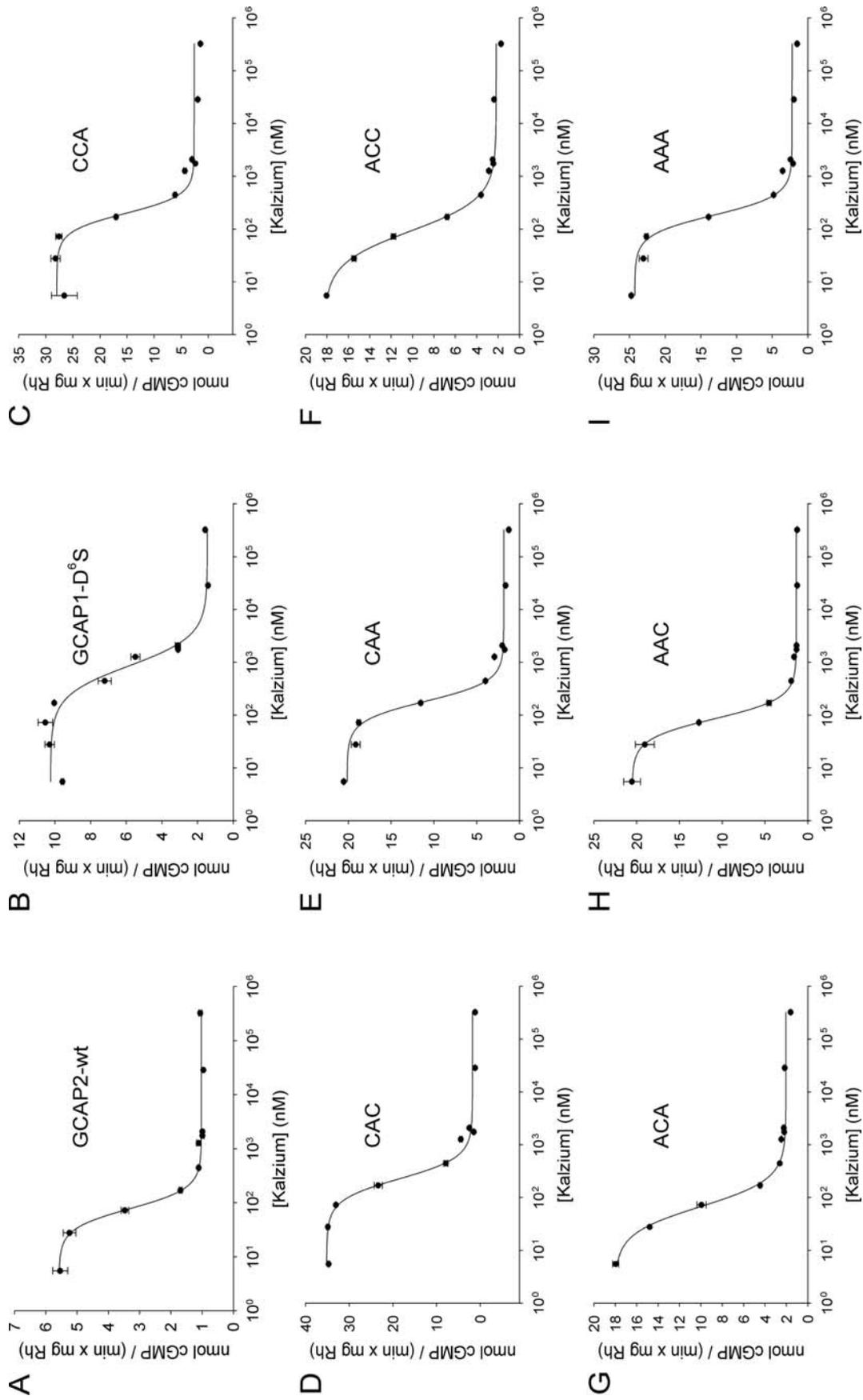


Abbildung 3.7: Kalzium-Titrations mit ROS-Membranen. Die Titrations wurden in Gegenwart von 3 μM GCAP und 0,1 mM ATP durchgeführt. Die GC-Aktivität, angegeben in "nmol cGMP / (min x mg Rh)", wurde gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen. (A) GCAP2-wt, (B) GCAP1-D⁶S, (C) CCA, (D) CAC, (E) CAA, (F) ACC, (G) ACA, (H) AAC, (I) AAA.

3.1.3.2 GC-Assays mit heterolog exprimierten GCs

Da ROS-Membranen sowohl die GC1, als auch die GC2 enthielten, maß man bei GC-Assays deren gemeinsame Aktivität. Würden die GCAPs die GC-Isoformen unterschiedlich regulieren, hätte man dies anhand der GC-Assays mit ROS-Membranen nicht festgestellt. Daher habe ich jeweils eine GC-Isoform heterolog in tsA-Zellen exprimiert (siehe 2.3) und deren Zell-Membranen für die GC-Assays verwendet (siehe 2.3.2). Nur so konnte ich untersuchen, ob die GCAPs die GCs gleichartig oder unterschiedlich regulieren.

Um die Expression der GC-Isoformen in tsA-Zellen zu untersuchen, habe ich die Membranen von GC-exprimierenden tsA-Zellen vom Zytosol getrennt und diese Fraktionen durch einen Western Blot untersucht. In Abbildung 3.8 ist dieser Western Blot gezeigt. Im linken Teil des Western Blots markierte der anti-GC1 Antikörper in den Spuren 1 und 2 jeweils eine prominente Bande unterhalb von 116 kDa, die in den Spuren 3 und 4 nicht auftauchte. Das apparente Molekulargewicht dieser Banden betrug etwa 110 kDa. In den Spuren 1 und 2 wurden die Membranen bzw. das Zytosol von GC1-exprimierenden Zellen aufgetragen und in den Spuren 3 und 4 die Membranen bzw. das Zytosol von GC2-exprimierenden Zellen. Somit handelte es sich bei der prominenten Bande in der Spur 1 um die membranständige, heterolog exprimierte GC1 (hetGC1). Im rechten Teil des Western Blots markierte der anti-GC2 Antikörper eine prominente Bande in Spur 3 und auf derselben Höhe eine schwächere Bande in Spur 4. Das apparente Molekulargewicht dieser Banden betrug etwa 110 kDa. In den Spuren 1 und 2 tauchten diese Banden nicht auf. Somit handelte es sich bei der Bande in Spur 3 um die membranständige, heterolog exprimierte GC2 (hetGC2). In den zytosolischen

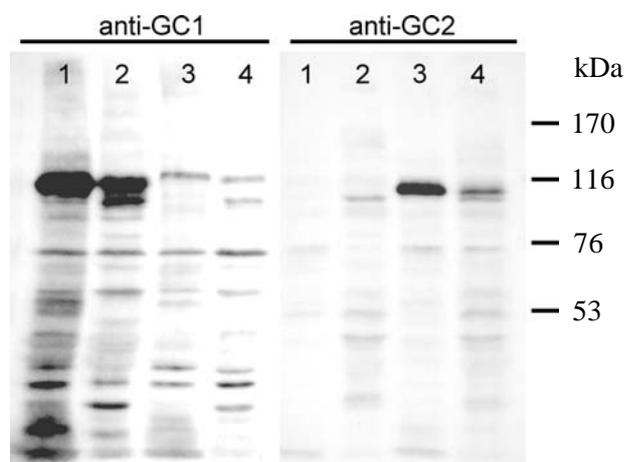


Abbildung 3.8: Western Blot mit GC1- bzw. GC2-exprimierenden tsA-Zellen. 1, Membranen von GC1-exprimierenden tsA-Zellen; 2, Zytosol von GC1-exprimierenden tsA-Zellen; 3, Membranen von GC2-exprimierenden tsA-Zellen; 4, Zytosol von GC2-exprimierenden tsA-Zellen. Es wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen. 7,5 %iges SDS-PAGE-Gel.

Fraktionen (Spuren 2 und 4) markierten die Antikörper ebenfalls Banden, die auf Höhe der GCs lagen. Dabei könnte es sich um falsch prozessierte GC-Formen oder um Verunreinigungen durch Membranen gehandelt haben.

3.1.3.2a GC-Assays mit hetGC1

GCAP-Titrations mit hetGC1

In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der GCAP-Titrations an hetGC1 dargestellt. Um die GCs maximal zu aktivieren, fanden die GCAP-Titrations in Gegenwart von 2 mM EGTA und 0,1 mM ATP statt. Die Konzentrationen von GCAP1-D⁶S und GCAP2-wt variierten zwischen 0 μ M und 10 μ M und die Konzentrationen der Mutanten zwischen 0 μ M und 12,8 μ M. Alle GCAPs aktivierten die hetGC1 konzentrationsabhängig. Mit steigender GCAP-Konzentration stieg auch die GC-Aktivität. Jedoch unterschieden sich die Aktivierungskurven der verschiedenen GCAP-Formen deutlich. Die Aktivierungskurven von GCAP2-wt, CCA, CAC, CAA und AAC liefen auf ein Maximum zu und stiegen bei der höchsten GCAP-Konzentration nur noch leicht an. Diese GCAPs aktivierten die hetGC1 im untersuchten Konzentrationsbereich fast maximal. Daher ließen sich bei den Kurvenanpassungen die maximalen Aktivitäten genau berechnen, wodurch die EC₅₀-Werte dieser Mutanten einen geringen Fehler aufwiesen. Ihre EC₅₀-Werte (siehe Tab. 3.4) lagen bei 4,6 μ M (GCAP2), 3,7 μ M (CCA), 1,5 μ M (CAC), 3,5 μ M (CAA) und 5,9 μ M (AAC). Dagegen unterschieden sich die Aktivierungskurven von GCAP1-D⁶S, ACC, ACA und AAA. Sie liefen auf kein Maximum zu und stiegen bei der höchsten GCAP-Konzentration noch stark an. Diese GCAPs konnten die hetGC1 im untersuchten Konzentrationsbereich nicht maximal aktivieren. Daher ließen sich bei den Kurvenanpassungen die maximalen Aktivitäten nur ungenau berechnen, wodurch die EC₅₀-Werte dieser Mutanten einen großen Fehler aufwiesen. Ihre EC₅₀-Werte lagen bei 16,6 μ M (GCAP1-D⁶S), 48 μ M (ACC) 40 μ M (ACA) und 44 μ M (AAA). Da die X_{max}-Werte aus den maximalen Aktivitäten berechnet wurden, pflanzten sich auch die Fehler fort. Folglich besaßen die GCAPs, welche die hetGC1 maximal aktivierten, X_{max}-Werte mit einem kleinen Fehler und GCAPs, welche die hetGC1 nicht maximal aktivierten, X_{max}-Werte mit einem großen Fehler. Die X_{max}-Werte von GCAP2-wt und GCAP1-D⁶S lagen bei 88 bzw. 194. Die Mutanten CCA, CAC und CAA besaßen Werte von 53, 68 und 67 und die Mutanten ACC, ACA, AAC und AAA Werte von 30, 30, 27 und 44. Wie schon bei den GCAP-Titrations an ROS-Membranen beobachtet, lagen auch hier die X_{max}-Werte der GCAPs, welche an Position 35 einen Cystein-Rest besaßen, über den X_{max}-Werten der anderen Mutanten.

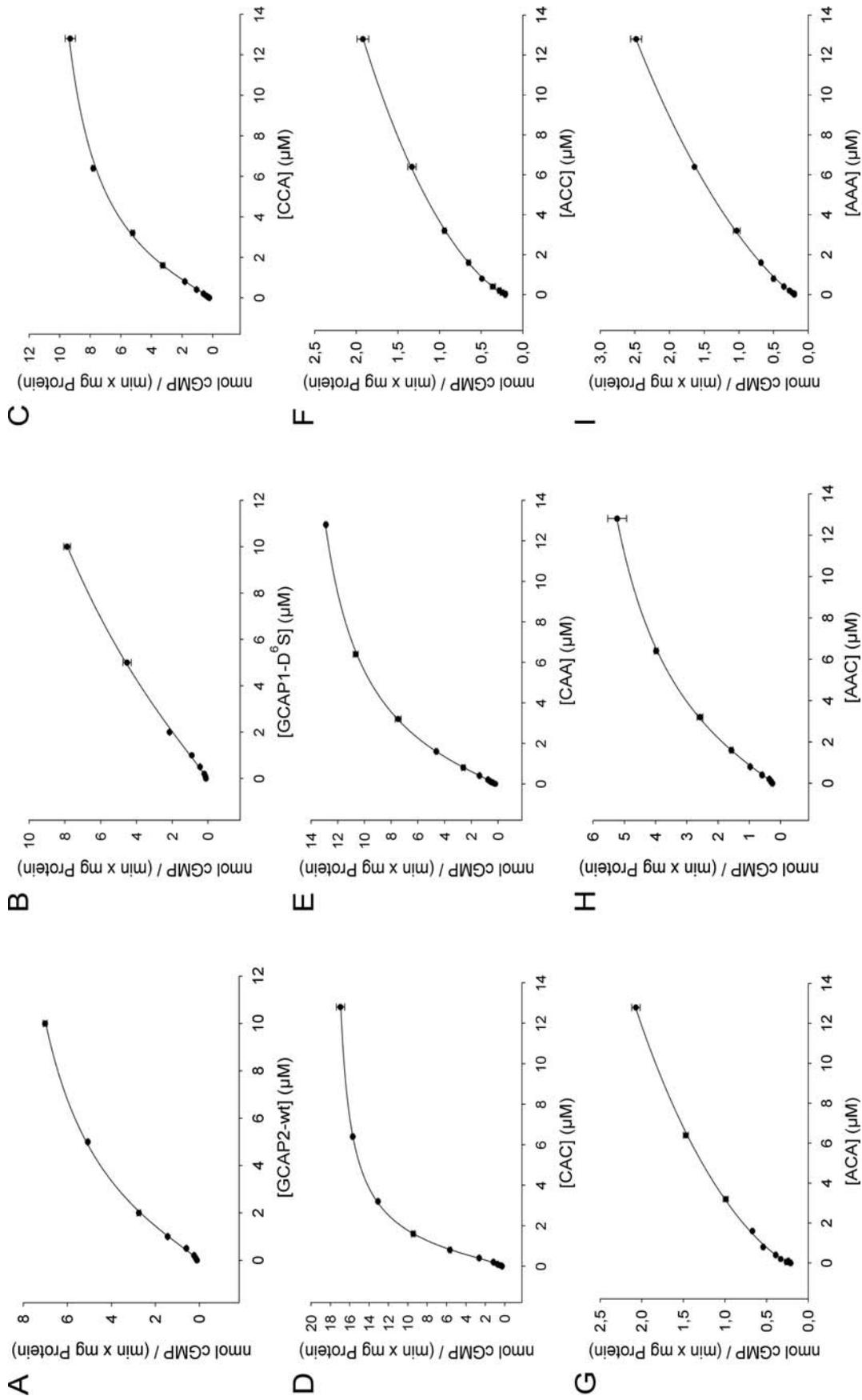


Abbildung 3.9: GCAP-Titrationskurven mit hetGC1. Die Titrationskurven wurden in Gegenwart von 2 mM EGTA und 0,1 mM ATP durchgeführt. Die GCAP-Aktivität, angegeben in "nmol cGMP / (min x mg Protein)", wurde gegen die GCAP-Konzentration aufgetragen. (A) GCAP2-wt, (B) GCAP1-D⁶S, (C) CCA, (D) CAC, (E) CAA, (F) ACC, (G) ACA, (H) AAC, (I) AAA.

Tabelle 3.4: EC_{50} -Werte und X_{max} -Werte der GCAP-Titrationsen mit hetGC1.

GCAP-Form	EC_{50} (μ M)	X_{max}
GCAP2-wt	4,6 +/- 0,6	88 +/- 6
GCAP1-D ⁶ S	16,6 +/- 8,7	194 +/- 66
CCA	3,7 +/- 0,3	53 +/- 2
CAC	1,5 +/- 0,0	68 +/- 1
CAA	3,5 +/- 0,1	77 +/- 1
ACC	48 +/- 30	30 +/- 9
ACA	40 +/- 33	30 +/- 12
AAC	5,9 +/- 0,4	27 +/- 1
AAA	44 +/- 22	44 +/- 12

Kalzium-Titrationsen mit hetGC1

Die Kalzium-Titrationsen wurden bei einer GCAP-Konzentration von 3 μ M durchgeführt, bei der die hetGC1 ausreichend aktiviert werden sollte. Um die GC-Aktivität zu erhöhen, wurden alle Titrationsen in Gegenwart von 0,1 mM ATP durchgeführt. In Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse der Kalzium-Titrationsen an hetGC1 dargestellt. Alle GCAPs aktivierten die GCs bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen und inhibierten die GCs bei hohen Kalzium-Konzentrationen. Die IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten sind in Tabelle 3.5 zusammengefaßt. Die IC_{50} -Werte von GCAP2-wt und der GCAP2-Mutanten lagen im Bereich zwischen 47 nM Kalzium (GCAP2) und 137 nM Kalzium (CCA). Der IC_{50} -Wert von GCAP1-D⁶S lag bei 608 nM Kalzium und damit deutlich über den IC_{50} -Werten von GCAP2-wt und der GCAP2-Mutanten. Dies wurde schon bei den Kalzium-Titrationsen mit ROS-Membranen beobachtet. Die Hill Koeffizienten der GCAPs lagen im Bereich zwischen 1,4 (ACC) und 2,6 (GCAP2).

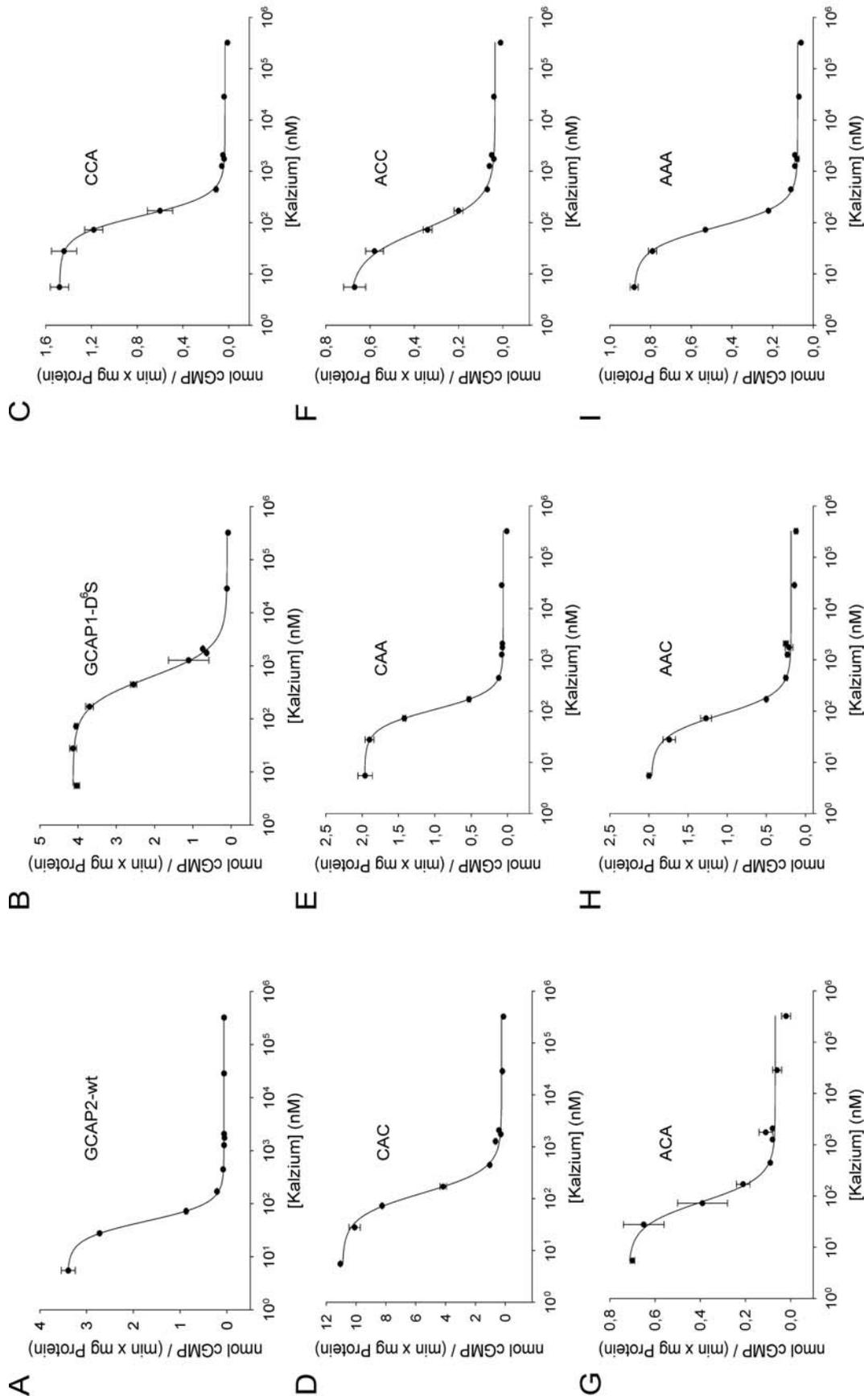


Abbildung.3.10: Kalzium-Titrationen mit hetGC1. Die Titrationen wurden in Gegenwart von 3 μ M GCAP und 0,1 mM ATP durchgeführt. Die GC-Aktivität, angegeben in "nmol cGMP / (min x mg Protein)", wurde gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen. (A) GCAP2, (B) GCAP1-D^{6S}, (C) CCA, (D) CAC, (E) CAA, (F) ACC, (G) ACA, (H) AAC, (I) AAA.

Tabelle 3.5: IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten der Kalzium-Titrationsen mit hetGC1.

GCAP-Form	IC ₅₀ (nM Ca ²⁺)	Hill-Koeffizient
GCAP2-wt	47 +/- 0	2,6 +/- 0,0
GCAP1-D ⁶ S	608 +/- 35	1,6 +/- 0,1
CCA	137 +/- 3	2,2 +/- 0,1
CAC	127 +/- 5	1,9 +/- 0,1
CAA	106 +/- 2	2,4 +/- 0,1
ACC	72 +/- 7	1,4 +/- 0,2
ACA	77 +/- 9	1,8 +/- 0,3
AAC	85 +/- 6	2,0 +/- 0,3
AAA	81 +/- 2	2,0 +/- 0,1

3.1.3.2b GC-Assays mit hetGC2

GCAP-Titrationsen mit hetGC2

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse der GCAP-Titrationsen mit hetGC2 dargestellt. Um die GCs maximal zu aktivieren, fanden die GCAP-Titrationsen in Gegenwart von 2 mM EGTA und 0,1 mM ATP statt. Die Konzentrationen von GCAP1-D⁶S und GCAP2-wt variierten zwischen 0 µM und 10 µM und die Konzentrationen der GCAP2-Mutanten zwischen 0 µM und 12,8 µM. Alle GCAPs aktivierten die hetGC2 konzentrationsabhängig. Mit steigender GCAP-Konzentration stieg auch die GC-Aktivität. Im untersuchten Konzentrationsbereich aktivierten alle GCAPs die hetGC2 maximal. Die EC₅₀-Werte (siehe Tabelle 3.6) der GCAP2-Formen lagen zwischen 0,11 µM (CAC) und 0,37 µM (GCAP2). Der EC₅₀-Wert von GCAP1-D⁶S war mit 2,33 µM deutlich höher als die EC₅₀-Werte der anderen GCAPs. Am stärksten wurde die hetGC2 von GCAP2-wt und GCAP1-D⁶S aktiviert. Sie zeigten X_{max}-Werte von 17,3 (GCAP2) und 19,5 (GCAP1-D⁶S). Die Mutanten CCA und CAC aktivierten die hetGC2 schwächer. Sie hatten X_{max}-Werte von 9,0 und 9,6. Am schwächsten wurde die hetGC2 von CAA (4,2), ACC (4,6), ACA (4,3), AAC (3,1) und AAA (1,1) aktiviert. Somit aktivierten GCAPs, deren Cystein-Rest an Position 35 durch einem Alanin-Rest substituiert wurde, die hetGC2 schwächer als GCAPs, die ein Cystein an

Position 35 besaßen. Ein ähnliches Verhalten konnte schon bei den GCAP-Titrationsen mit ROS-Membranen und mit hetGC1 beobachtet werden. Nur die CAA-Mutante wich davon ab, da sie die hetGC2 nur schwach aktivierte.

Tabelle 3.6: EC₅₀-Werte und X_{max}-Werte der GCAP-Titrationsen mit hetGC2.

GCAP-Form	EC₅₀ (µM)	X_{max}
GCAP2-wt	0,37 +/- 0,07	17,3 +/- 1,3
GCAP1-D ⁶ S	2,33 +/- 0,04	19,5 +/- 0,2
CCA	0,16 +/- 0,02	9,0 +/- 0,5
CAC	0,11 +/- 0,01	9,6 +/- 0,4
CAA	0,16 +/- 0,02	4,2 +/- 0,3
ACC	0,20 +/- 0,04	4,6 +/- 0,4
ACA	0,14 +/- 0,06	4,3 +/- 0,9
AAC	0,17 +/- 0,03	3,1 +/- 0,4
AAA	0,20 +/- 0,65	1,1 +/- 0,1

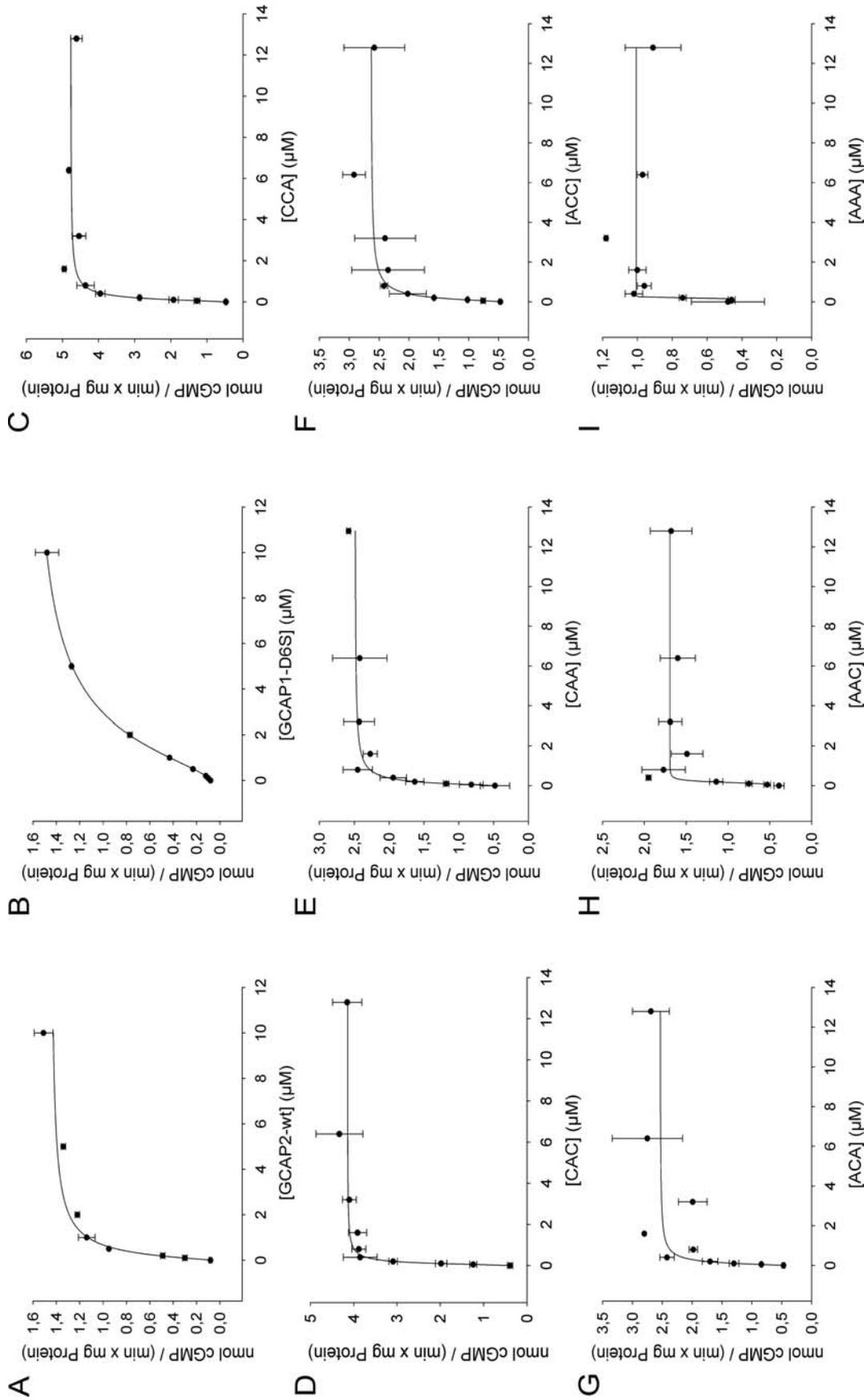


Abbildung 3.11: GCAP-Titrations mit hetGC2. Die Titrations wurden in Gegenwart von 2 mM EGTA und 0,1 mM ATP durchgeführt. Die GC-Aktivität, angegeben in "nmol cGMP / (min x mg Protein)", wurde gegen die GCAP-Konzentration aufgetragen. (A) GCAP2-wt, (B) GCAP1-D⁶S, (C) CCA, (D) CAC, (E) CAA, (F) ACC, (G) ACA, (H) AAC, (I) AAA.

Kalzium-Titrationsen mit hetGC2

Die Kalzium-Titrationsen wurden bei einer GCAP-Konzentration von 3 μM durchgeführt, bei der die hetGC2 ausreichend aktiviert werden sollte. Um die GC-Aktivität zu erhöhen, wurden alle Titrationsen in Gegenwart von 0,1 mM ATP durchgeführt. In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse der Kalzium-Titrationsen mit hetGC2 dargestellt. Alle GCAPs aktivierten die hetGC2 bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen und inhibierten die hetGC2 bei hohen Kalzium-Konzentrationen. Die IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten sind in Tabelle 3.7 zusammengefaßt. Die IC_{50} -Werte von GCAP2-wt und der GCAP2-Mutanten lagen im Bereich zwischen 46 nM Kalzium (GCAP2) und 151 nM Kalzium (CCA). Der IC_{50} -Wert von GCAP1-D⁶S lag bei 306 nM Kalzium und damit deutlich über den IC_{50} -Werten von GCAP2-wt und der GCAP2-Mutanten. Dies wurde schon bei den Kalzium-Titrationsen an ROS-Membranen und hetGC1 beobachtet. Die Hill Koeffizienten der GCAPs lagen im Bereich zwischen 1,3 (GCAP1-D⁶S) und 2,6 (CAC).

Tabelle 3.7: IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten der Kalzium-Titrationsen mit hetGC2.

GCAP-Form	IC_{50} (nM Ca^{2+})	Hill-Koeffizient
GCAP2-wt	46 +/- 4	2,3 +/- 0,3
GCAP1-D ⁶ S	306 +/- 29	1,3 +/- 0,1
CCA	151 +/- 4	2,2 +/- 0,1
CAC	62 +/- 1	2,6 +/- 0,1
CAA	109 +/- 3	2,2 +/- 0,1
ACC	144 +/- 9	1,7 +/- 0,2
ACA	93 +/- 4	1,7 +/- 0,1
AAC	53 +/- 3	2,4 +/- 0,3
AAA	49 +/- 6	2,3 +/- 0,5

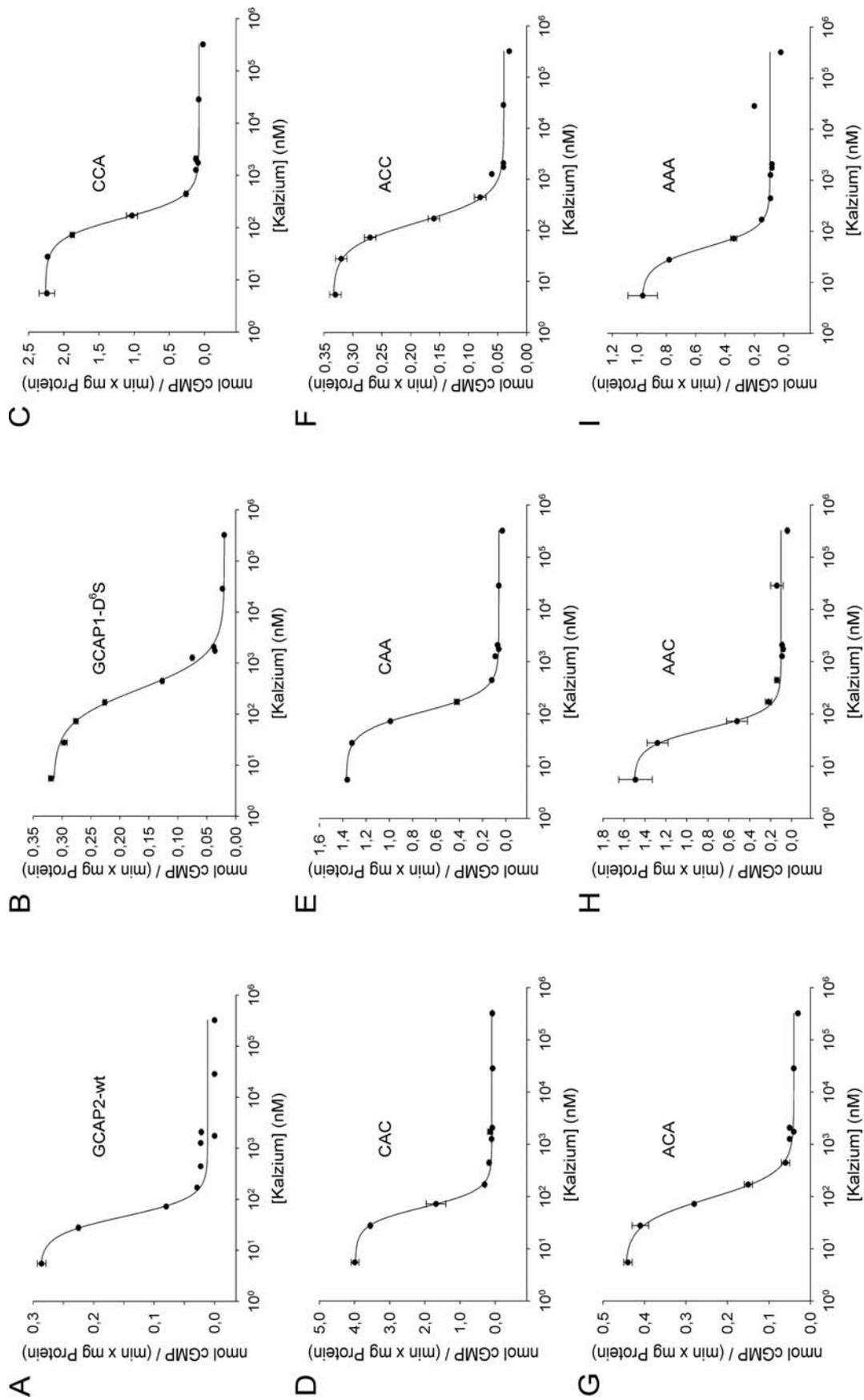


Abbildung.3.12: Kalzium-Titrationen mit hetGC2. Die Titrationen wurden in Gegenwart von 3 μ M GCAP und 0,1 mM ATP durchgeführt. Die GC-Aktivität, angegeben in "nmol cGMP / (min x mg Protein)", wurde gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen. (A) GCAP2-wt, (B) GCAP1-D⁶S, (C) CCA, (D) CAC, (E) CAA, (F) ACC, (G) ACA, (H) AAC, (I) AAA.

3.1.4 Zwischenbilanz der bisherigen Ergebnisse

Ich habe Cystein-Mutanten von GCAP2 genetisch hergestellt, heterolog in *E. coli* exprimiert und überexprimierte Proteine reinigen können. Diese Proteine konnten mit Hilfe eines GCAP2-spezifischen Antikörpers als GCAP2-Formen identifiziert werden (siehe Abb. 3.3). Die GCAP2-Mutanten zeigten den für GCAPs charakteristischen Kalzium-Shift (siehe Abb. 3.4). Dies zeigte, daß die Konformationsänderung, die den Kalzium-Shift bewirkt, durch die Mutationen nicht beeinflusst wurde. Der Myristylierungsgrad der GCAP2-Mutanten lag zwischen 86 % und 93 % (siehe Tab. 3.1).

Um die EC_{50} -Werte, IC_{50} -Werte und X_{max} -Werte der GCAP2-Mutanten für die GC-Aktivierung zu bestimmen, habe ich GC-Assays durchgeführt. Dabei untersuchte ich die Aktivierung nativer GCs aus ROS-Membranen (siehe 3.1.3.1) und die Aktivierung heterolog exprimierter GCs (siehe 3.1.3.2). Alle GCAP2-Mutanten regulierten die Aktivitäten aller GC-Formen sowohl Konzentrations-abhängig, als auch Kalzium-abhängig. Dabei zeigten GCAP2-Mutanten, deren erster Cystein-Rest (C³⁵) gegen einen Alanin-Rest ausgetauscht war, niedrigere X_{max} -Werte als Mutanten, die an dieser Stelle einen Cystein-Rest besaßen (siehe Tab. 3.2, 3.4 und 3.6).

3.2 Die Zugänglichkeit der Cystein-Reste von GCAP2

Die GCAPs sind Kalzium-bindende Proteine, deren Konformation sich Kalzium-abhängig ändert. So zeigten beispielsweise Kalzium-beladene GCAPs eine höhere elektrophoretische Mobilität als Kalzium-freie GCAPs (siehe 3.2) oder die Tryptophan-Fluoreszenz von GCAPs ändert sich Kalzium-abhängig (Sokal et al., 1999). Die Konformation ändert sich aufgrund der Bindung von Kalzium-Ionen an die EF-Hand-Motive. Ein Kalzium-freies EF-Hand-Motiv nimmt eine offene Konformation ein, das heißt, die Helices des EF-Hand-Motivs bilden einen großen Winkel. Bindet ein EF-Hand-Motiv Kalzium, nimmt es eine geschlossene Konformation ein, das heißt, die Helices bilden einen kleinen Winkel. Wie sich die Konformationsänderungen der EF-Hand-Motive auf das gesamte Protein auswirken ist unklar. So ist die einzig bekannte GCAP-Struktur die von Kalzium-beladenem GCAP2-wt (siehe Abb. 3.1). Die Struktur von Kalzium-freiem GCAP2, welche Kalzium-induzierte Strukturunterschiede zeigen würde, ist unbekannt. Mit den GCAP2-Mutanten verfügte ich über Werkzeuge, um Konformationsänderungen im Bereich der drei Cystein-Reste messen zu können. Sie waren dafür geeignet, da das thiolreaktive DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic

acid)) nur mit den Cystein-Resten reagieren kann. Reagiert das DTNB mit einem Cystein-Rest, so muß dieser räumlich zugänglich gewesen sein. Für den Cystein-Rest eines EF-Hand-Motivs bedeutet dies, daß das EF-Hand-Motiv in der offenen, Kalzium-freien, Konformation vorgelegen haben muß. Umgekehrt würde ein geschlossenes, Kalzium-beladenes, EF-Hand-Motiv die Reaktion des Cystein-Restes mit dem DTNB erschweren oder vollständig unterbinden. Da die Stöchiometrie der DTNB-Reaktion mit Cystein-Resten eins zu eins ist und man den molaren Extinktionskoeffizienten des Produktes TNB kennt ($\epsilon = 13.600 \text{ cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 412 \text{ nm}$), kann man die Reaktion quantitativ auswerten.

3.2.1 Die Zugänglichkeit zweier Cystein-Reste ist Kalzium-abhängig

Eine GCAP-Lösung, welche $10 \mu\text{M}$ EGTA bzw. CaCl_2 enthielt, wurde mit $60 \mu\text{M}$ DTNB (finale Konzentration) versetzt. Fünf Minuten später wurde $110 \mu\text{M}$ CaCl_2 bzw. EGTA (finale Konzentrationen) zugegeben. Die genaue Durchführung der DTNB-Experimente ist unter 2.8 beschrieben. In Abbildung 3.13 sind die Ergebnisse dieser DTNB-Experimente dargestellt. In allen Teilabbildungen ist die Absorption ($\lambda = 412 \text{ nm}$), welche sich durch die Reaktion des DTNB mit den zugänglichen Cystein-Resten erhöhte, gegen die Zeit aufgetragen. Als Kontrolle diente entweder die Cystein-freie AAA-Mutante oder Protein-freier Puffer. Die Absorption der GCAP2-wt-Lösung stieg in Gegenwart von EGTA schnell an (Kurve 1 in Abb. 3.13 A), bis sie nach zwei Minuten ein Plateau erreichte. Die Zugabe von Kalzium änderte die Absorption nicht mehr. Wurde der Versuch unter Kalzium-Bedingungen gestartet (Kurve 2 in Abb. 3.13 A), zeigte die Absorption einen biphasischen Verlauf. Während der ersten Phase stieg die Kurve stark an und während der 2. Phase nur noch leicht. Die Zugabe von EGTA induzierte dann einen zweiten schnellen Anstieg der Absorption, bis das Plateau der vorhergehenden Messung erreicht war. In beiden Messungen betrug die Differenz der maximalen Absorption zur Kontrolle $0,12$. Dies entsprach einer Cystein-Konzentration von $8,8 \mu\text{M}$. Da die GCAP2-wt-Konzentration $3 \mu\text{M}$ betrug und GCAP2-wt drei Cystein-Reste besitzt, reagierten folglich alle Cystein-Reste mit dem DTNB. Da die Reaktion schnell verlief, waren unter EGTA-Bedingungen (Kurve 1) alle drei Cystein-Reste für das DTNB gut zugänglich. Unter Kalzium-Bedingungen (Kurve 2) ließ sich die Kurve in drei Abschnitte unterteilen, in den ersten schnellen Anstieg, den langsamen Anstieg und den zweiten, durch EGTA induzierten, schnellen Anstieg. Bei jedem dieser Anstiege änderte sich die Absorption um jeweils $0,004$, was $1 \mu\text{M}$ Cystein-Resten entsprach. Somit war ein Cystein-Rest des

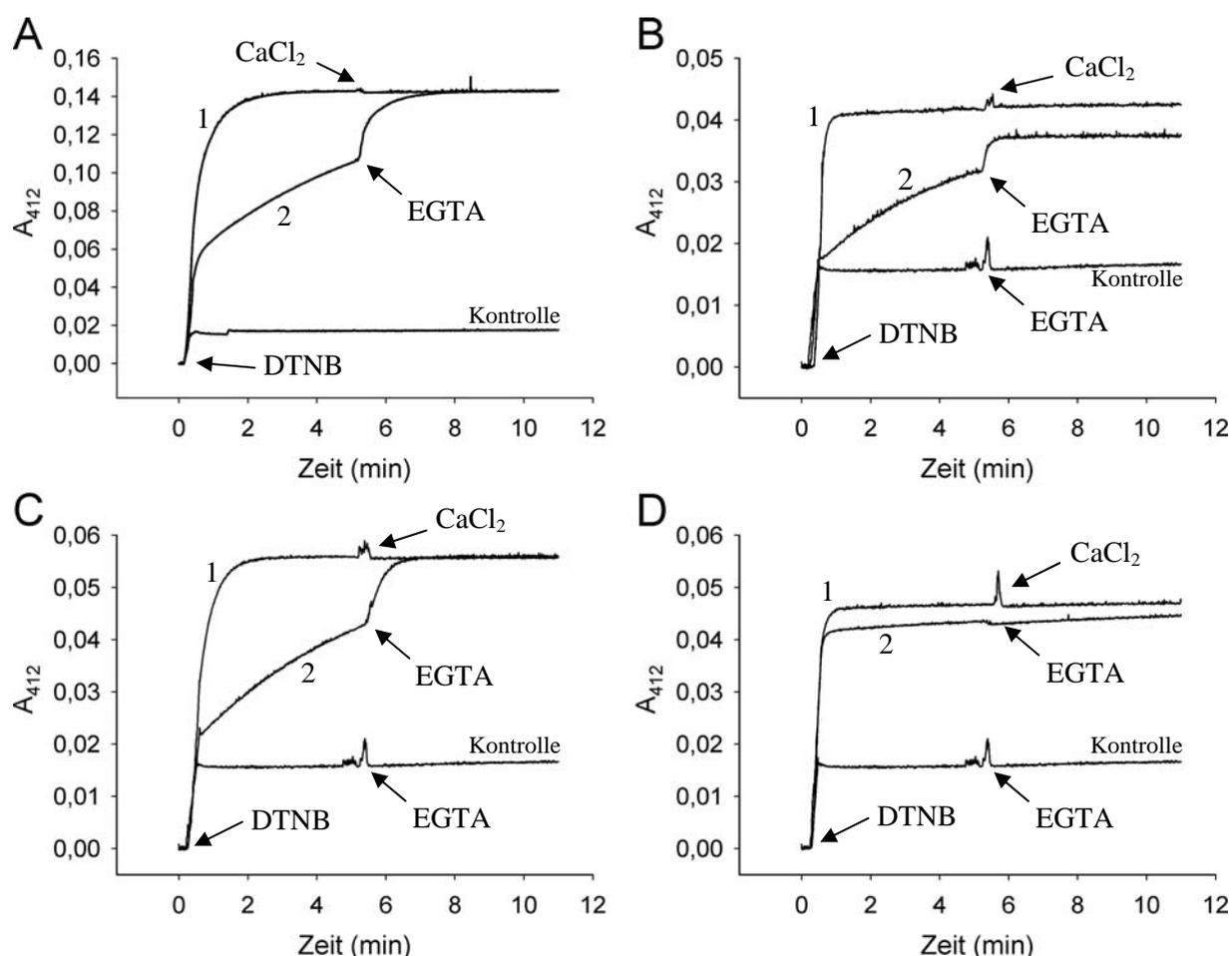


Abbildung 3.13: Kalzium-abhängige DTNB-Reaktion der Cystein-Reste von GCAP2. Die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 412$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die mit "1" beschrifteten Messungen wurden unter EGTA-Bedingungen gestartet, die mit "2" beschrifteten unter Kalzium-Bedingungen. (A) 3 μ M GCAP2, (B) 2 μ M CAA, (C) 3 μ M ACA, (D) 2 μ M AAC; Als Kontrollen dienten Protein-freier Puffer (A) sowie die Cystein-freie AAA-Mutante (B, C und D).

GCAP2-wt unter Kalzium-Bedingungen zugänglich (erster schneller Anstieg), während die restlichen Cystein-Reste nur schwer zugänglich waren (langsamer Anstieg). Erst nach der Zugabe von EGTA konnten diese beiden Cystein-Reste komplett mit dem DTNB reagieren (zweiter schneller Anstieg). Um die Frage, welcher Cystein-Rest unter Kalzium-Bedingungen für DTNB zugänglich war, zu beantworten, habe ich die GCAP2-Mutanten genutzt. Die idealen Mutanten für diesen Versuch waren diejenigen, welche nur noch einen Cystein-Rest besaßen (CAA, ACA und AAC). Unter EGTA-Bedingungen (jeweils Kurve 1, Abb. 3.13 B, C und D) reagierten alle Cystein-Reste schnell und vollständig mit dem DTNB. So änderte sich beispielsweise die Absorption von ACA (siehe Abb. 3.13 C) um 0,04, was einer Konzentration von zugänglichen Cystein-Resten von 2,9 μ M und damit etwa der eingesetzten ACA-Menge (3 μ M) entsprach. Unter Kalzium-Bedingungen waren die Cystein-Reste unterschiedlich zugänglich. Der Cystein-Rest der CAA-Mutante (C^{35} in EF-Hand-Motiv 1) reagierte unter Kalzium-Bedingungen (Kurve 2 in Abb. 3.11 B) nur langsam mit dem DTNB.

Erst nach der Zugabe von EGTA reagierte dieser Cystein-Rest vollständig mit dem DTNB (Kurve 2 in Abb. 3.13 B). Einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigte die Messung der ACA-Mutante (C¹¹¹ in EF-Hand-Motiv 3). Auch hier war der Cystein-Rest erst nach der Zugabe von EGTA vollständig für das DTNB zugänglich (Kurve 2 in Abb. 3.13 C). Der Cystein-Rest der AAC-Mutante (C¹³¹ zwischen EF-Hand-Motiv 3 und 4) war sowohl unter EGTA-Bedingungen (Kurve 1 in Abb. 3.13 D), als auch unter Kalzium-Bedingungen (Kurve 2 in Abb. 3.13 D), gut für das DTNB zugänglich.

3.2.2 Kalzium-Sensitivität von DTNB-Reaktionen

Wie unter 3.2.1 gezeigt wurde, reagierten alle Cystein-Reste in GCAP2-wt mit dem thiolreaktiven DTNB. Die Zugänglichkeit von C³⁵ und C¹¹¹, welche in den EF-Hand-Motiven 1 und 3 lagen, war jedoch Kalzium-abhängig. Dies führte zu der Frage, wie Kalzium-sensitiv die DTNB-Reaktionen dieser beiden Cystein-Reste waren. Zusätzlich wollte ich untersuchen, ob Magnesium die DTNB-Reaktion beeinflusst, da Peshenko und Dizhoor (2004) zeigten, daß Magnesium die IC₅₀-Werte beider GCAP-Isoformen erhöht. Dazu habe ich die DTNB-Messungen bei unterschiedlichen Kalzium-Konzentrationen in Gegenwart von 10 mM Magnesium und in Abwesenheit von Magnesium durchgeführt. Gemessen wurden die GCAP2-Mutanten CAA und ACA. Zusätzlich habe ich zwei GCAP1-Mutanten, ACAA und AACA (freundlicherweise von Frau Dr. Ji-Young Hwang überlassen) untersucht. Hwang et al. (2001) zeigten, daß die Zugänglichkeit der Cystein-Reste 29 und 106 in GCAP1, welche im ersten und dritten EF-Hand-Motiv liegen, Kalzium-sensitiv ist. Diese Erkenntnis wurde mit genetisch veränderten GCAP1-Mutanten gewonnen, welche nur einen Cystein-Rest besaßen. Die Nomenklatur dieser GCAP1-Mutanten ist jener der GCAP2-Mutanten ähnlich. Da GCAP1 vier Cystein-Reste besitzt, heißen die GCAP1-Mutanten ACAA (nur Cystein-Rest 29 vorhanden) und AACA (nur Cystein-Rest 106 vorhanden). Dabei waren die Mutanten GCAP1-ACAA und GCAP2-CAA analog, da ihr einzig verbliebener Cystein-Rest im ersten EF-Hand-Motiv lag. In ähnlicher Weise waren die Mutanten GCAP1-AACA und GCAP2-ACA analog, da ihr einzig verbliebener Cystein-Rest jeweils im dritten EF-Hand-Motiv lag.

Um die Kalzium-Sensitivität der DTNB-Reaktionen zu bestimmen, habe ich zunächst die Absorption ($\lambda = 412 \text{ nm}$) gegen die Zeit aufgetragen. Aus diesen Kurven habe ich dann die Absorption nach zwei Minuten abgelesen, davon 0,1 (Absorption des DTNB) subtrahiert. Diesen Wert habe ich dann gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen. Ich wählte aus folgenden Gründen die Absorption nach zwei Minuten zur Auswertung. Zum einen erreichten

schnelle DTNB-Reaktionen zu diesem Zeitpunkt bereits ihre maximale Absorption und, zum anderen, unterschieden sich langsame DTNB-Reaktionen zu diesem Punkt bereits deutlich. Somit konnte ich die Meßreihen gut auflösen. Die so erhaltenen Punkte habe ich an die folgende Gleichung angepaßt:

$$y = \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log(\text{Ca}^{2+})_{1/2} - x) \cdot n}}$$

3.2.2.1 Kalzium-Sensitivität der DTNB-Reaktionen von GCAP2-Mutanten

In Abbildung 3.14 sind die Messungen der GCAP2-Mutanten CAA und ACA ohne Magnesium dargestellt. Die Teile A und B zeigen, wie sich die Absorption bei unterschiedlichen Kalzium-Konzentrationen änderte. Beide Mutanten reagierten erwartungsgemäß bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen schnell mit dem DTNB. Bei hohen Kalzium-Konzentrationen reagierten sie langsamer, wobei die Absorption nach zehn Minuten keinen maximalen Wert erreichte. Die Teile C und D zeigen die ausgewerteten Daten. Beide Kurven verlaufen sigmoid. Die Kurvenanpassungen ergaben einen $(\text{Ca}^{2+})_{1/2}$ -Wert für CAA von 1094 nM +/- 101 nM Kalzium und für ACA einen $(\text{Ca}^{2+})_{1/2}$ -Wert von 255 nM +/- 26 nM Kalzium. Somit ist der $(\text{Ca}^{2+})_{1/2}$ -Wert von CAA um den Faktor vier größer als der $(\text{Ca}^{2+})_{1/2}$ -Wert von ACA.

Die Messungen von CAA in Gegenwart von Magnesium sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Die Rohdaten (A) zeigten, daß die DTNB-Reaktion bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen schnell und bei hohen Kalzium-Konzentrationen langsam verlief. Die weitere Auswertung der Daten (B) ergab einen $(\text{Ca}^{2+})_{1/2}$ -Wert von 1620 nM +/- 320 nM Kalzium. Verglichen mit der Messung ohne Magnesium hat sich somit der $(\text{Ca}^{2+})_{1/2}$ -Wert um etwa 500 nM Kalzium erhöht.

Die Kalzium-Sensitivität der DTNB-Reaktion von ACA in Gegenwart von Magnesium konnte ich nicht messen. Da mein Kalzium-Puffersystem (NTA-Puffer) neben Kalzium-Ionen auch Magnesium-Ionen pufferte, war es mir unmöglich, Kalzium-Konzentrationen im niedrigen nM-Bereich in Gegenwart von 10 mM Magnesium herzustellen, ohne das Puffersystem zu wechseln.

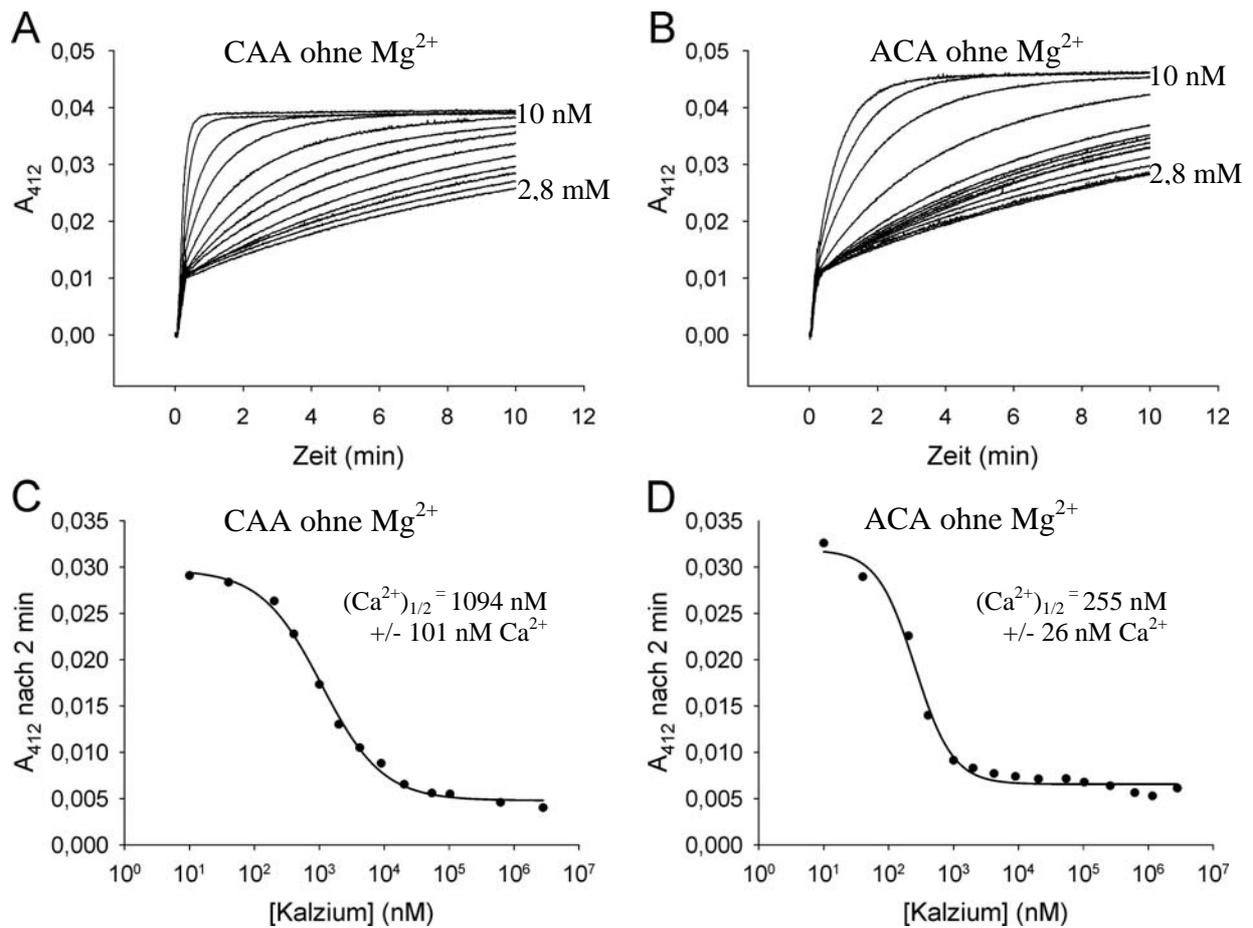


Abbildung 3.14: Kalzium-Titration der DTNB-Reaktion von CAA und ACA ohne Magnesium. (A) Rohdaten CAA, die Proteinkonzentration betrug 2 μM ; (B) Rohdaten ACA, die Proteinkonzentration betrug 2,5 μM ; (C) A_{412} nach 2 min von CAA gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen; (D) A_{412} nach 2 min von ACA gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen. In (A) und (B) sind die minimalen und maximalen Kalzium-Konzentrationen angegeben.

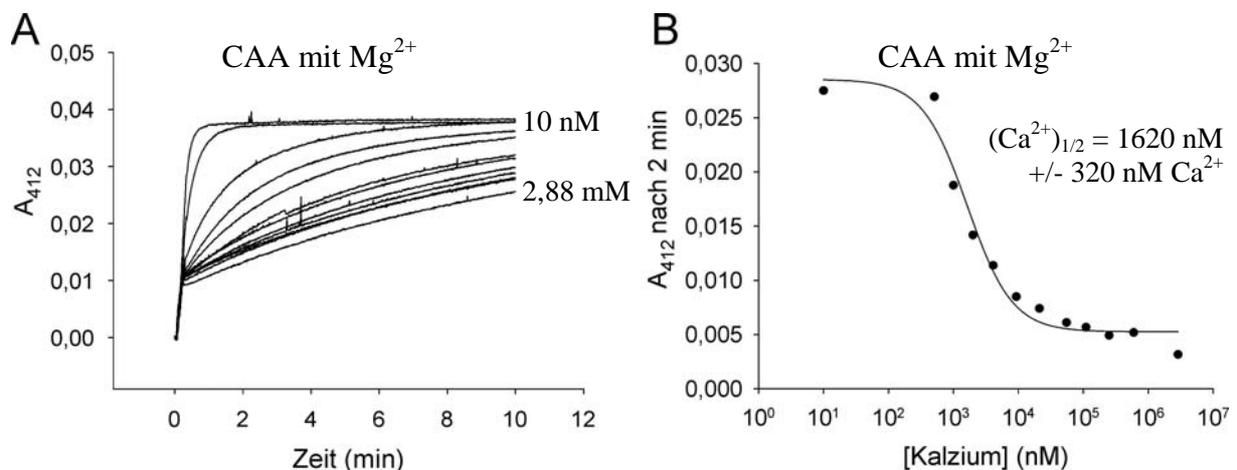


Abbildung 3.15: Kalzium-Titration der DTNB-Reaktion von CAA in Gegenwart von 10 mM Magnesium. (A) Rohdaten mit minimaler und maximaler Kalzium-Konzentration; (B) A_{412} nach 2 min von CAA gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen.

3.2.2.2 Kalzium-Sensitivität der DTNB-Reaktionen von GCAP1-Mutanten

Im Gegensatz zu GCAP2-wt besitzt GCAP1 vier Cystein-Reste. Hwang et al. (2001) zeigten, daß der zweite und der dritte Cystein-Rest von GCAP1, welche in den EF-Hand-Motiven 1 und 3 liegen, Kalzium-sensitiv für die DTNB-Reaktion sind. Jedoch war zum Zeitpunkt dieser Arbeit (2001) der Einfluß von Magnesium auf die Kalzium-Sensitivitäten der GCAPs noch unbekannt. Deshalb wiederholte ich die Kalzium-Titrationen mit DTNB in Gegenwart und in Abwesenheit von 10 mM Magnesium. Dabei nutzte ich die GCAP1-Mutanten, welche nur noch einen Cystein-Reste besaßen (ACAA und AACA). Die Abbildung 3.16 zeigt die Ergebnisse der Messungen ohne Magnesium. Die ACAA-Mutante reagierte bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen schnell mit dem DTNB und bei hohen Kalzium-Konzentrationen langsam. Es wurde jedoch bei allen Kalzium-Konzentrationen die maximal mögliche Absorption erreicht (siehe Abb. 3.16, A). Die AACA-Mutante reagierte bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen ebenfalls schnell. Höhere Kalzium-Konzentrationen unterbanden die DTNB-Reaktion fast vollständig (siehe Abb. 3.16, B). Die Auswertung der Daten (siehe Abb. 3.16, C und D) ergab einen $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Wert für ACAA von 8480 nM +/- 1030 nM Kalzium und für AACA 245 nM +/- 9 nM Kalzium. Somit lag der $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Wert von ACAA um den Faktor 35 über dem von AACA.

Die Messungen von ACAA und AACA in Gegenwart von 10 mM Magnesium sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Die Rohdaten von ACAA (siehe 3.17, A) zeigten ähnliche Kurvenverläufe wie in Abwesenheit von Magnesium. Auch hier wurde bei den hohen Kalzium-Konzentrationen die maximal mögliche Absorption erreicht. Die AACA-Mutante reagierte unter den Magnesium-Bedingungen, selbst bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen, nur langsam mit dem DTNB (siehe 3.17, B). Die ausgewerteten Daten von ACAA (siehe Abb. 3.17, C) ergaben einen $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Wert von 11400 nM +/- 3500 nM Kalzium. Vergleicht man diesen Wert mit dem Wert der Messung ohne Magnesium (8480 nM +/- 1030 nM Kalzium), hat sich der $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Wert der DTNB-Reaktion um etwa 3000 nM Kalzium erhöht. Jedoch liegt diese Verschiebung innerhalb der Fehlergrenzen beider Werte und ist demnach nicht signifikant. Die Auswertung der AACA-Mutante in Gegenwart von Magnesium (siehe Abb. 3.17, D) gestaltete sich schwierig, da bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen nur wenige Meßwerte zur Verfügung standen. Deshalb habe ich einen $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Wert von etwa 900 nM Kalzium abgeschätzt.

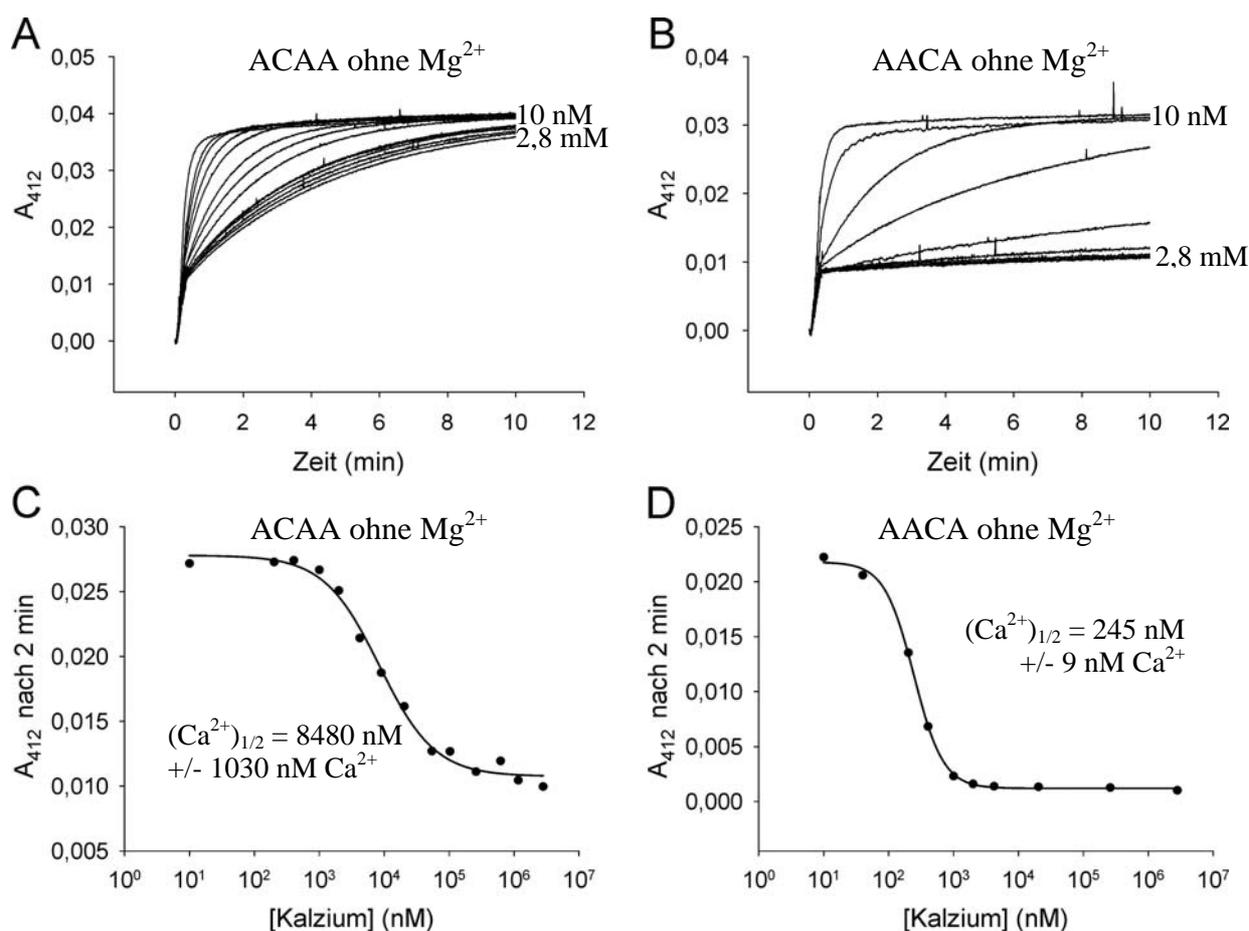


Abbildung 3.16: Kalzium-Titration der DTNB-Reaktion von ACAA und AACA ohne Magnesium. (A) Rohdaten ACAA, die Proteinkonzentration betrug $2 \mu\text{M}$; (B) Rohdaten AACA, die Proteinkonzentration betrug $1,5 \mu\text{M}$; (C) A_{412} nach 2 min von ACAA gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen; (D) A_{412} nach 2 min von AACA gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen. In (A) und (B) sind die minimalen und maximalen Kalzium-Konzentrationen angegeben.

3.2.3 Zusammenfassung der Experimente mit DTNB

Die Zugänglichkeit zweier Cystein-Reste von GCAP2-wt, C^{35} und C^{111} , für das thiolreaktive DTNB war Kalzium-abhängig. Nur unter EGTA-Bedingungen konnten sie schnell mit dem DTNB reagieren. Dadurch war es mir möglich, Kalzium-Sensitivitäten dieser Cystein-Reste für die DTNB-Reaktion zu bestimmen. Als Vergleich habe ich die Kalzium-Sensitivitäten der entsprechenden Cystein-Reste in GCAP1 gemessen. Die $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Werte, in Gegenwart und in Abwesenheit von Magnesium, sind in Tabelle 3.8 aufgelistet. Die $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Werte des Cystein-Restes im ersten EF-Hand Motiv lag bei beiden GCAP-Isoformen über den $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Werten des Cystein-Restes im dritten EF-Hand-Motiv. Magnesium führte bei allen Messungen zu höheren $(Ca^{2+})_{1/2}$ -Werten.

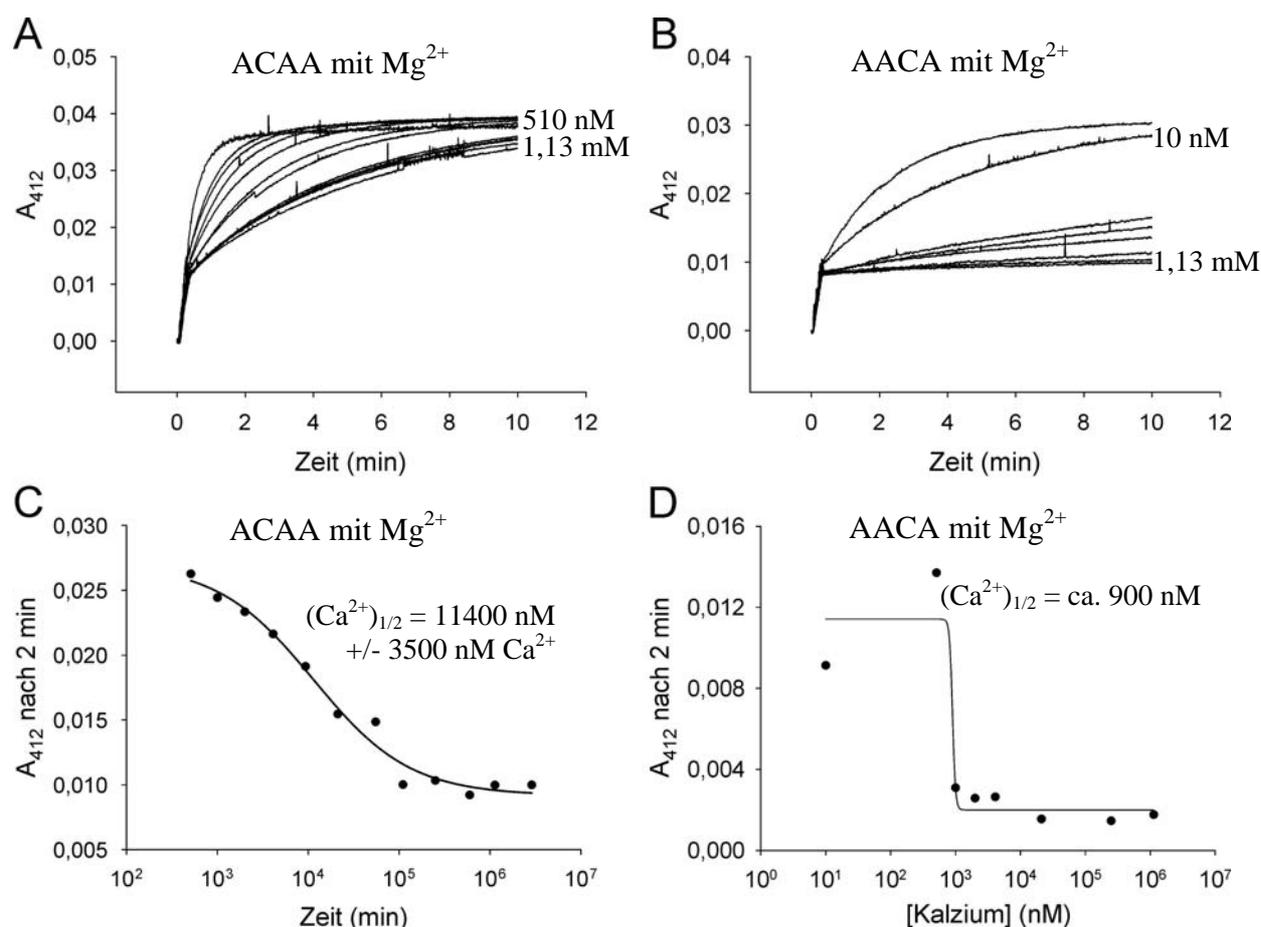


Abbildung 3.17: Kalzium-Titration der DTNB-Reaktion von ACAA und AACA in Gegenwart von 10 mM Magnesium. (A) Rohdaten ACAA, die Proteinkonzentration betrug 2 µM; (B) Rohdaten AACA, die Proteinkonzentration betrug 1,5 µM; (C) A_{412} nach 2 min von ACAA gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen; (D) A_{412} nach 2 min von AACA gegen die Kalzium-Konzentration aufgetragen. In (A) und (B) sind die minimalen und maximalen Kalzium-Konzentrationen angegeben. Der $(Ca^{2+})_{1/2}$ von AACA (D) wurde von mir geschätzt.

Tab. 3.8: Kalzium-Sensitivitäten der DTNB-Reaktion von Cystein-Resten verschiedener GCAP-Mutanten in Gegenwart ($(Ca^{2+})_{1/2}$) und in Abwesenheit von 10 mM Magnesium ($(Ca^{2+})_{1/2} / Mg^{2+}$). n.b. = nicht bestimmt.

GCAP-Form	GCAP2-CAA	GCAP2-ACA	GCAP1-ACAA	GCAP1-AACA
$(Ca^{2+})_{1/2}$ (nM)	1.094 +/- 101	255 +/- 26	8.480 +/- 1030	245 +/- 9
$(Ca^{2+})_{1/2} / Mg^{2+}$ (nM)	1.620 +/- 320	n.b.	11.400 +/- 3.500	900 +/- 47.000

3.3 Fluophore als Monitor für Konformationsänderungen

3.3.1 Fluophore als Monitor für Kalzium-abhängige Konformationsänderungen von GCAP2

Mit Hilfe von Fluophoren kann man Konformationsänderungen von Proteinen detektieren. Dazu muß der Fluophor umgebungssensitiv sein und durch die Konformationsänderung des Proteins in eine andere Umgebung gebracht werden. Beispielsweise könnte der Fluophor in Konformation A am Protein anliegen und in Konformation B zum Lösungsmittel hin exponiert sein. Um die Interpretation eines solchen Experimentes zu vereinfachen, sollte der Fluophor ortsspezifisch, das heißt nur an eine bekannte Position des Proteins, gebunden sein. Dadurch wäre die geänderte Fluoreszenz auf eine Konformationsänderung im Bereich des Fluophors zurückzuführen. Um Fluophore ortsspezifisch an GCAPs zu koppeln, boten sich thiolreaktive Fluophore an, da diese nur an Thiole von Cystein-Reste binden können. Die Cystein-Mutanten von GCAP2 (siehe oben) ermöglichten es mir, Fluophore nur an den ersten Cystein-Rest (C³⁵ in EF-Hand-Motiv 1, CAA-Mutante), nur an den zweiten Cystein-Rest (C¹¹¹ in EF-Hand-Motiv 3, ACA-Mutante) oder nur an den dritten Cystein-Rest (C¹³¹ zwischen dem 3. und 4. EF-Hand-Motiv, AAC-Mutante) binden zu lassen. Zusätzlich stand mir noch die GCAP1-Mutante AAAC (freundlicherweise von Frau Dr. Ji-Young Hwang überlassen), die nur einen Cystein-Rest an Position 125 besitzt, zur Markierung mit Fluophoren zur Verfügung. Da GCAP2 bislang nicht mit Fluophoren markiert wurde, jedoch bekannt war, daß Fluophore unspezifisch mit GCAP1 assoziierten (persönliche Information von Frau Dr. Ji-Young Hwang), setzte ich als Kontrolle die Cystein-freie GCAP2-Mutante AAA in die Markierungsreaktionen ein. An die ACA-Mutante ließ ich den Fluophor Alexa-488 binden und an die CAA-Mutante den Fluophor Alexa-647. Die AAA-Mutante ließ ich nur mit Alexa-647 reagieren. Ich koppelte die GCAPs mit unterschiedlichen Fluophoren, da dies eine Voraussetzung für weiterführende Experimente war (siehe 3.3.2). Um den Erfolg oder den Mißerfolg der Markierungsreaktionen zu überprüfen, nutzte ich die *reversed phase* HPLC. Mit dieser Technik war es möglich, freien Fluophor von an GCAPs gekoppelten Fluophor zu unterscheiden. Ebenso würden Rückschlüsse möglich, ob die Fluophorkopplung die hydrophoben Eigenschaften der GCAPs ändern würde. Danach untersuchte ich, ob sich die Fluoreszenz der markierten GCAPs Kalzium-abhängig ändert. Dazu nahm ich Absorptionsspektren, Excitationsspektren und Emissionsspektren der markierten GCAPs in Gegenwart und in Abwesenheit von Kalzium auf.

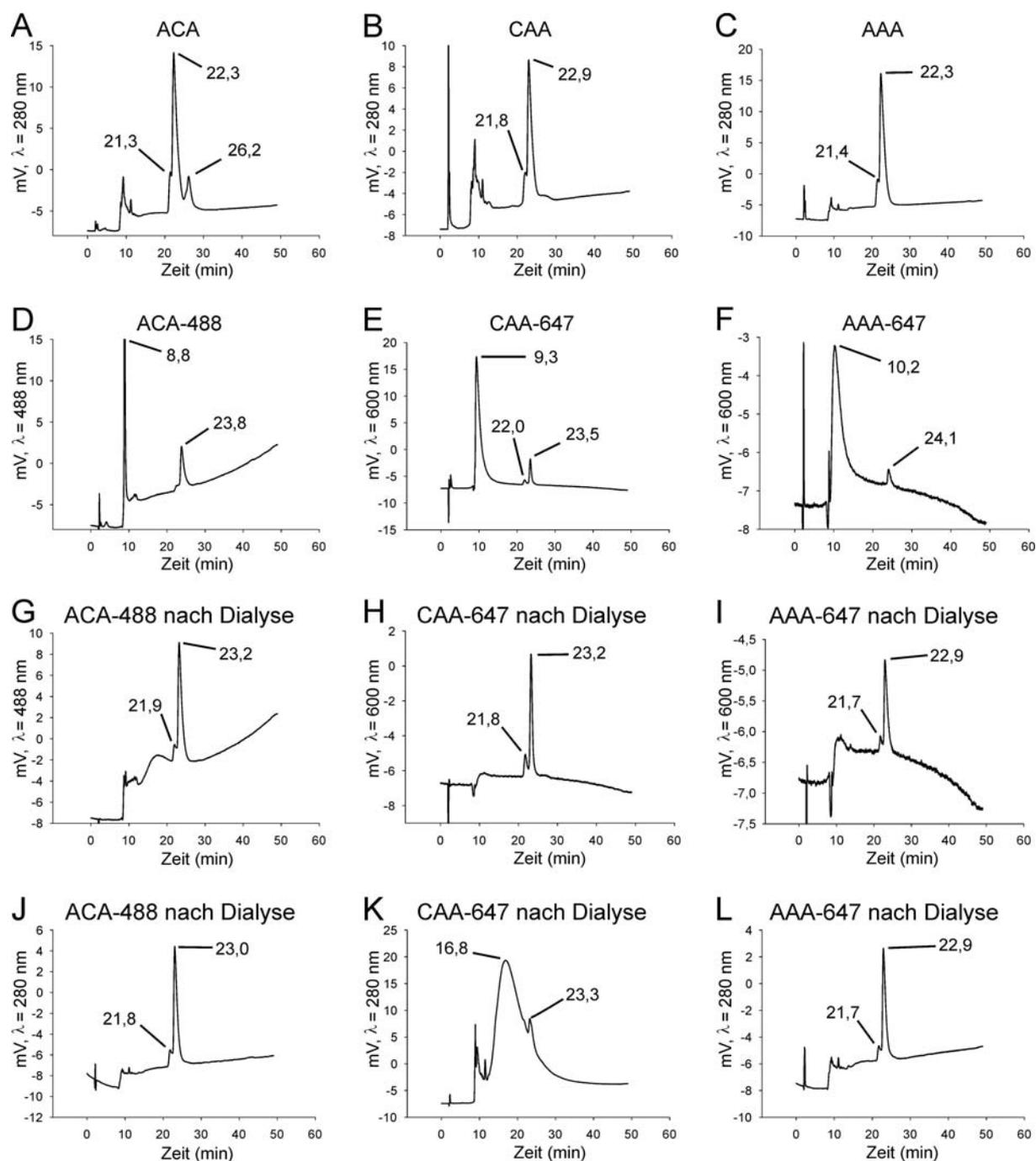


Abbildung 3.18: HPLC-Chromatogramme von GCAP2-Mutanten und von fluoreszenzmarkierten GCAP2-Mutanten. (A), (B) und (C): GCAP2-Mutanten ACA, AAC und AAA bevor sie fluoreszenzmarkiert wurden, $\lambda = 280$ nm; (D), (E) und (F): GCAP2-Mutanten, nachdem sie fluoreszenzmarkiert wurden, $\lambda = 488$ nm (D, ACA-488), $\lambda = 600$ nm (E, CAA-647; F, AAA-647); (G), (H) und (I): fluoreszenzmarkierte GCAP2-Mutanten nach acht Dialyseschritten, $\lambda = 488$ nm (G, ACA-488), $\lambda = 600$ nm (H, CAA-647; I, AAA-647); (J), (K) und (L): fluoreszenzmarkierte GCAP2-Mutanten nach acht Dialyseschritten, $\lambda = 280$ nm.

In Abbildung 3.18 sind die HPLC-Chromatogramme der unmarkierten GCAP-Mutanten ACA, CAA und AAA dargestellt (oberste Reihe, A, B und C). Die Absorption (angegeben in mV) wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm, bei der die aromatischen AS absorbieren, gemessen. Alle Chromatogramme zeigten bei einer Retentionszeit von 21 bis 22 min Peaks.

Dabei handelte es sich um die myristylierten und nichtmyristylierten Formen der GCAP2-Mutanten. Da ich für meine Experimente große Mengen genetisch veränderter GCAPs benötigte (mehrere mg), habe ich alle in dieser Arbeit verwendeten GCAPs heterolog in *E. coli* exprimiert und daraus gereinigt. Um die myristylierten Formen der GCAPs zu erhalten, wurde die N-terminale Myristyltransferase aus der Hefe koexprimiert. Der Anteil der myristylierten GCAPs betrug zwischen 86 % und 93 % (siehe Tab. 3.1). Da die nichtmyristylierten GCAPs hydrophiler als myristylierte GCAPs waren, eluierten sie etwa eine Minute früher von der *reversed phase* HPLC-Säule. Das Chromatogramm von ACA (siehe Abb. 3.18, A) zeigte zusätzlich einen Peak bei 26,2 min Retentionszeit. Dabei könnte es sich um eine Verunreinigung aus *E. coli* handeln oder um eine anders gefaltete ACA-Form. Die Reinigung der GCAPs umfaßte nämlich einen Denaturierungsschritt und einen Renaturierungsschritt.

Die Chromatogramme D, E und F zeigen die Markierungsansätze, nachdem die Markierungsreaktion durch die Zugabe von DTT gestoppt wurde (siehe 2.7). Die Absorption wurde bei Wellenlängen von $\lambda = 488$ nm (Markierungsansatz von ACA-488) und $\lambda = 600$ nm (Markierungsansätze von CAA-647 und AAA-647) aufgezeichnet. Bei diesen Wellenlängen absorbieren die Fluophore. Eine größere Wellenlänge als 600 nm konnte beim verwendeten Absorptionsdetektor (Waters 484) nicht eingestellt werden. Die Chromatogramme zeigten jeweils zwei prominente Peaks bei Retentionszeiten von etwa 9 min und etwa 24 min. Nach der Dialyse der Markierungsansätze (Chromatogramme G, H und I) tauchte der frühe Peak nicht mehr auf. Bei diesem Peak handelte es sich um freien, nicht an GCAP gekoppelten, Fluophor, der durch die Dialyse vollständig entfernt werden konnte. Beim späten Peak, der auch in den Chromatogrammen nach der Dialyse auftauchte (G, H und I), handelte es sich um fluoreszenzmarkierte GCAPs. Gegenüber ihren unmarkierten Formen (A, B und C) verlängerten sich die Retentionszeiten um 0,5 bis 1 min. Die Chromatogramme J, K und L zeigten erneut die Markierungsansätze nach der Dialyse, jedoch wurde diesmal die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm gemessen. Die Chromatogramme zeigten GCAP-Peaks mit gleichen Retentionszeiten wie in G, H und I. Man erkennt kleine Peaks der nichtmyristylierten GCAPs und große Peaks der myristylierten GCAPs. Im Chromatogramm K (CAA-647) lagen die GCAP-Peaks auf der fallenden Flanke eines großen und breiten Peaks mit einer Retentionszeit von 16,8 min. Durch was dieser Peak hervorgerufen wurde, ist unklar. Im Chromatogramm B (unmarkierten CAA) tauchte der Peak nicht auf und auch nach der Kopplung mit Alexa-647 (Chromatogramme E und H) tauchte er nicht auf. Der Peak könnte durch Protein-Verunreinigungen der Säule hervorgerufen worden sein. In den

Chromatogrammen J, K und L waren keine Peaks von unmarkierten GCAPs zu erkennen (vergleiche Chromatogramme A, B und C). Aus dem Vergleich der HPLC-Chromatogramme ließ sich schließen, daß die myristylierten und nichtmyristylierten GCAP-Mutanten mit Fluophoren gekoppelt wurden.

Neben ACA-488 und CAA-647 habe ich zwei weitere GCAP-Mutanten mit Fluophoren gekoppelt: die GCAP2-Mutante AAC mit Atto-590 und die GCAP1-Mutante nmAAAC (nm = nichtmyristyliert) mit Alexa-488. Die HPLC-Analysen dieser GCAP-Formen sind nicht gezeigt. Diese beiden GCAPs habe ich fluoreszenzmarkiert, um mit ihnen Kalzium-abhängige Konformationsänderungen des GC/GCAP-Systems zu detektieren (siehe 3.3.2).

In Abbildung 3.19 sind die Absorptionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten Fluophore dargestellt. Die Tabelle 3.9 gibt die optischen Eigenschaften dieser Fluophore an. Alexa-488 absorbiert maximal Licht der Wellenlänge $\lambda = 495$ nm, Atto-590 Licht der Wellenlänge $\lambda = 594$ und Alexa-647 Licht der Wellenlänge $\lambda = 650$ nm.

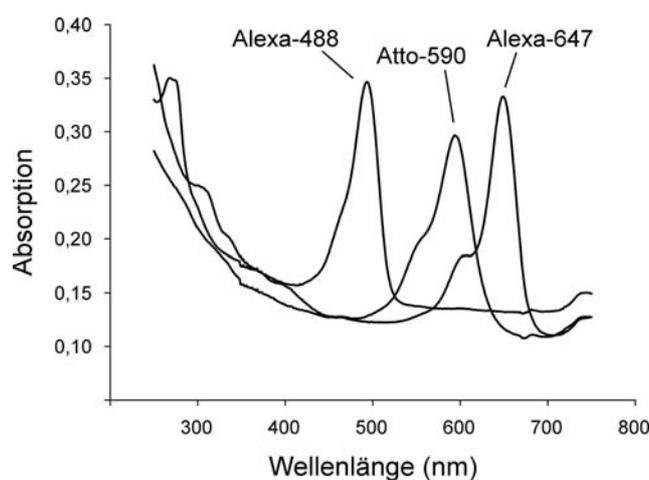


Abbildung 3.19: Absorptionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten Fluophore. 2,8 μ M Alexa-488, 1,5 μ M Atto-590 und 1 μ M Alexa-647 in ddH₂O.

Tab. 3.9: Optische Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Fluophore. λ_{Abs} : Wellenlänge des Absorptionsmaximums, λ_{Em} : Wellenlänge des Emissionsmaximums, ϵ : molarer Extinktionskoeffizient.

Fluophor	λ_{Abs} (nm)	λ_{Em} (nm)	ϵ (cm ⁻¹ x M ⁻¹)
Alexa-488	495	519	7,1 x 10 ⁴
Atto-590	594	624	1,2 x 10 ⁵
Alexa-647	650	665	2,39 x 10 ⁵

In Abbildung 3.20 sind die Absorptionsspektren der fluoreszenzmarkierten GCAP-Mutanten in Gegenwart von Kalzium (schwarze Spektren) und in Abwesenheit von Kalzium (rote Spektren) dargestellt. Die Absorption von ACA-488 (siehe Abb. 3.20, A) wurde durch die Kalzium-Konzentration nicht beeinflusst. Die Absorption von CAA-647 (siehe Abb. 3.20, B) änderte sich leicht. In Abwesenheit von Kalzium absorbierte der Fluophor Alexa-647 das Licht schwächer als in Gegenwart von Kalzium. Das Absorptionsmaximum verschob sich von 650 nm zu 651 nm. Auch die Absorptionseigenschaften von AAC-590 (siehe Abb. 3.20, C) änderten sich Kalzium-abhängig. Das Absorptionsmaximum betrug in Gegenwart von Kalzium 594 nm und in Abwesenheit von Kalzium 593 nm. Die Absorptionseigenschaften von nmAAAC-488 (siehe Abb. 3.20, D) wurden durch Kalzium nicht verändert. Die fluoreszenzmarkierten GCAPs AAC-590 und AAAC-488 wurden in weitergehenden Experimenten verwendet (siehe 3.3.2).

Bei den GCAP-Formen ACA-488 und CAA-647 wurde der Einfluß von Kalzium auf die Emission und die Excitation der Fluophore untersucht (Emissionsspektren und Excitationsspektren nicht gezeigt). Man beobachtete, daß die Maxima von Emission und Excitation in Gegenwart von EGTA höher ausfielen als in Gegenwart von Kalzium. Dieser Effekt war jedoch nicht reversibel. Deshalb waren Konformationsänderungen der GCAPs nicht der Grund dieses Effekts, da Konformationsänderungen reversibel gewesen wären.

3.3.2 Fluophore als Monitor für Kalzium-abhängige Interaktionen des GC1/GCAP-Systems

Werden GCs aktiviert, bildet ein GC-Dimer mit einer unbekanntem Anzahl von GCAPs einen Proteinkomplex. Da in Rindersehzellen zwei GCAP-Isoformen existieren, stellt sich die Frage, ob nur eine oder beide GCAP-Isoformen an diesem Proteinkomplex beteiligt sind. Weiterhin stellt sich die Frage, welche Kalzium-abhängigen Konformationsänderungen in diesem Komplex stattfinden. Beispielsweise könnten die beiden GCAPs bei unterschiedlichen Lichtintensitäten, und somit unterschiedlichen Kalzium-Konzentrationen, an verschiedene GC-Domänen binden (siehe 1.4.1). Diese Fragen wollte ich für den Proteinkomplex aus GC1 (es existieren GC1 und GC2 in Sehzellen) und GCAPs mit Hilfe des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zwischen fluoreszenzmarkierten GCAPs beantworten. Bei FRET wird Energie eines angeregten Fluophors A (Donor) auf einen Fluophor B (Akzeptor) übertragen, wodurch Fluophor B zur Fluoreszenz angeregt wird. Dazu muß das

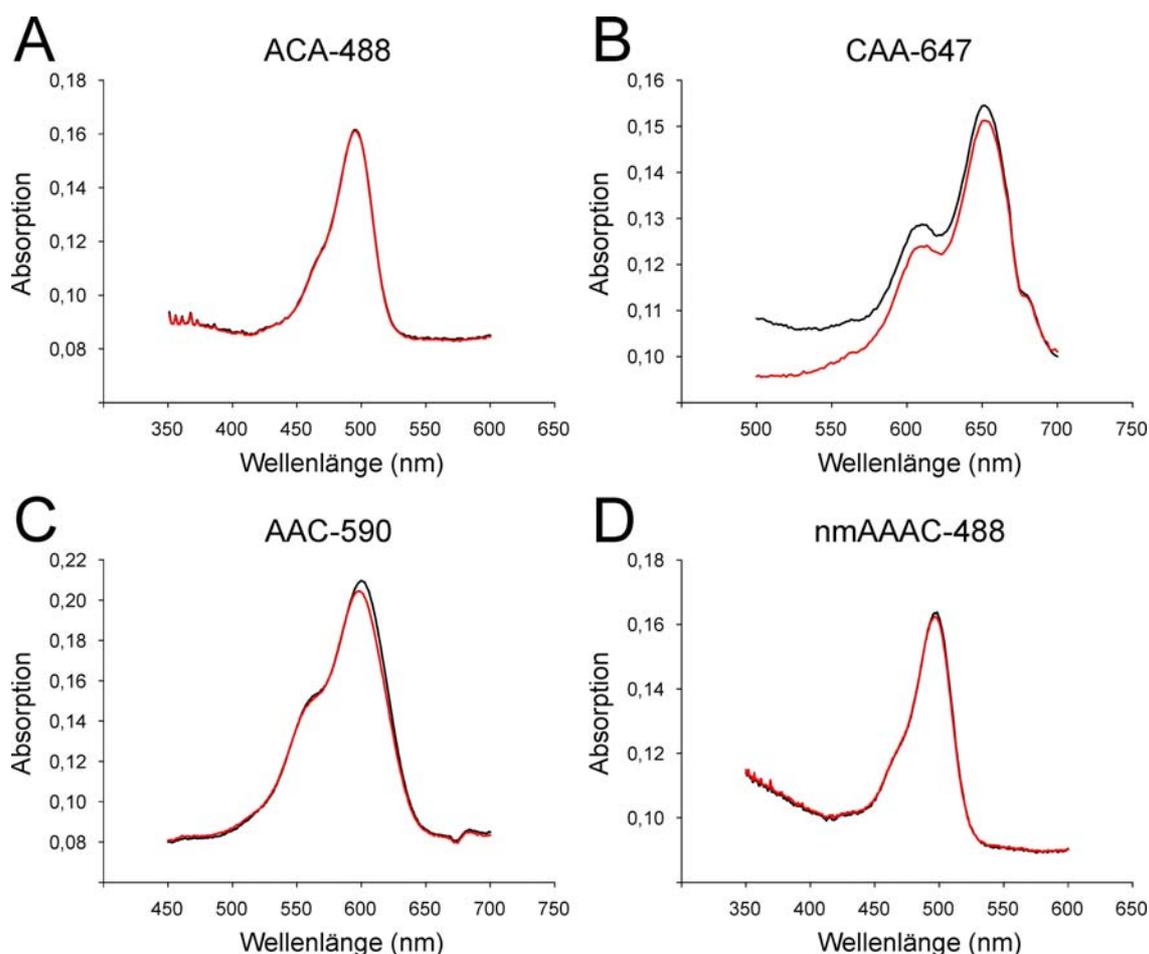


Abbildung 3.20: Absorptionsspektren der fluoreszenzmarkierten GCAP-Mutanten in Abhängigkeit der Kalzium-Konzentration. (A) 1 μM GCAP2-ACA konjugiert mit Alexa-488; (B) 0,2 μM GCAP2-CAA konjugiert mit Alexa-647; (C) 1 μM GCAP2-AAC konjugiert mit Atto-590; (D) 1 μM nichtmyristyliertes GCAP1-AAAC konjugiert mit Alexa-488; Zuerst wurden Absorptionsspektren in Gegenwart von 1,6 mM Kalzium gemessen (schwarze Spektren). Zu dieser Lösung wurden 6,7 mM EGTA (finale Konzentration) zugegeben und erneut die Absorption gemessen (rote Spektren).

Emissionsspektrum des Fluophors A mit dem Absorptionsspektrum des Fluophors B überlappen. Die Effizienz, mit der die Energie übertragen wird, ist distanzabhängig. FRET findet, je nach Donor-Akzeptor-Paar, im Bereich von 1 nm bis 10 nm statt. Die Messung von FRET-Signalen ist folglich ein ideales Werkzeug, um Distanzänderungen zwischen Protein zu bestimmen.

Ich wollte untersuchen, ob FRET zwischen fluoreszenzmarkiertem GCAP1 und fluoreszenzmarkiertem GCAP2 in Gegenwart der GC1 auftritt. Falls ja, wäre dies ein Zeichen für die gleichzeitige Bindung beider GCAP-Isoformen an die GC1. Würde sich das FRET-Signal mit der Kalzium-Konzentration ändern, könnte man daraus die Distanzänderungen zwischen GCAP1 und GCAP2 während der GC1-Aktivierung bestimmen. Zunächst mußte ich dafür geeignete GCAP-Mutanten aussuchen, diese mit thiolreaktiven Fluophoren koppeln und kontrollieren, ob die fluoreszenzmarkierten Fluophore die GC1

aktivieren konnten. Ich verfügte über die GCAP2-Mutanten CAA, ACA und AAC sowie die GCAP1-Mutanten nmCAA (nm = nichtmyristyliert), nmACAA, nmAACA und nmAAAC. Aus diesen Mutanten wählte ich AAC und nmAAAC, da deren Cystein-Reste in keinem der EF-Hand-Motive lag, die für die Kalzium-abhängige Aktivierung der GC1 wichtig sind. AAC koppelte ich mit dem Fluophor Atto-590 (Akzeptor) und AAAC mit dem Fluophor Alexa-488 (Donor). Die Absorptionsspektren dieser fluoreszenzmarkierten GCAP-Mutanten sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Mit diesen fluoreszierenden GCAPs führte ich dann GC-Assays mit ROS-Membranen durch (siehe Abb. 3.21). Beide GCAPs aktivierten die GCs bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen und inhibierten sie bei hohen Kalzium-Konzentrationen. Die Aktivierungskurven unterschieden sich deutlich. Für AAC-590 konnte ich einen IC_{50} -Wert von $42 \text{ nM} \pm 4 \text{ nM}$ Kalzium bestimmen und für nmAAAC-488 einen IC_{50} -Wert von $2220 \text{ nM} \pm 540 \text{ nM}$ Kalzium. Verglichen mit der unmarkierten AAC-Mutante ($IC_{50} = 85 \text{ nM} \pm 1 \text{ nM}$ Kalzium, siehe Tab. 3.2), besaß die fluoreszenzmarkierte AAC-Mutante einen halb so großen IC_{50} -Wert. Die Fluoreszenzmarkierung der nmAAAC-Mutante beeinflusste ebenfalls die GC-Aktivierung. AAAC-488 besaß einen etwa doppelt so hohen IC_{50} -Wert wie die unmarkierte AAAC-Mutante ($IC_{50} = 1052 \text{ nM}$ Kalzium; Hwang et al., 2001). Für die geplanten Fluoreszenzmessungen war es jedoch in erster Linie wichtig, daß die GCs von beiden fluoreszenzmarkierten GCAPs Kalzium-abhängig reguliert werden.

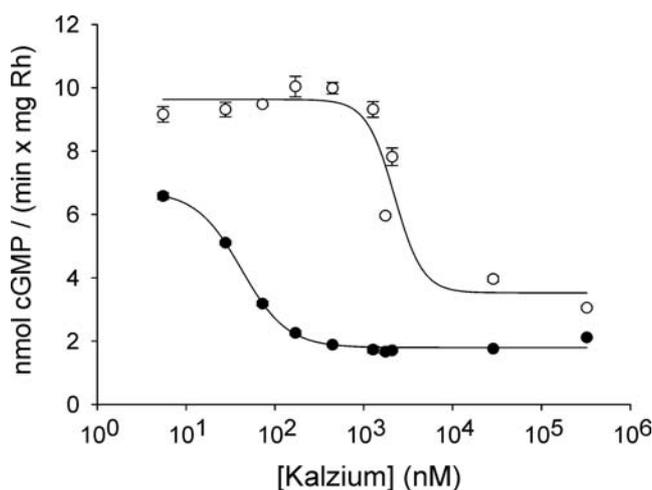


Abbildung 3.21: Kalziumabhängige Aktivierung von GCs aus ROS-Membranen durch die fluoreszenzmarkierten Mutanten AAC-590 und AAAC-488. Die GCAP-Konzentrationen betragen jeweils $2 \mu\text{M}$. AAC-590: schwarze Kreise; AAAC-488: offene Kreise.

Da ROS-Membranen sowohl die GC1, als auch die GC2 enthalten, ich jedoch das GC1/GCAP-System untersuchen wollte, führte ich die Fluoreszenzmessungen an heterolog exprimierter GC1 (hetGC1) durch. Dazu substituierte ich Membranen hetGC1-exprimierender tsA-Zellen mit 100 nM AAC-590 und 100 nM nmAAAC-499 (finale Konzentrationen). Als Kontrolle verwendete ich Membranen untransfizierter tsA-Zellen. Die Kalzium-Konzentration betrug 10 μ M. Danach gab ich EGTA zu (100 μ M, finale Konzentration), um das Kalzium zu komplexieren. Die Emissionsspektren, die bei den verschiedenen Kalzium-Konzentrationen erstellt wurden, sind in Abbildung 3.22 gezeigt, Teil A mit hetGC1-Membranen und Teil B mit Kontroll-Membranen. Die Wellenlänge des Anregungslichts betrug 440 nm, bei welcher der Donor nmAAAC-488 stark und der Akzeptor AAC-590 schwach angeregt wurde. Alle Spektren zeigten einen großen Peak bei $\lambda = 519$ nm, dem Emissionsmaximum von nmAAAC-488, und einen kleineren Peak bei $\lambda = 624$ nm, dem Emissionsmaximum von AAC-590. In Abb. 3.22 (A) verminderte sich das Fluoreszenzsignal von nmAAAC-488, nachdem EGTA zugegeben wurde (rotes Spektrum). Erhöhte man die Kalzium-Konzentration wieder (nicht gezeigt), erhöhte sich auch das Fluoreszenzsignal wieder. Die Fluoreszenz von AAC-590 blieb unter Kalzium- und EGTA-Bedingungen gleich. Die Fluoreszenzintensitäten verhielten sich in Teil B gleich. Somit erfolgte kein FRET zwischen den GCAPs. Die verminderte Fluoreszenzintensität von nmAAAC-488 beruhte auf einer Kalzium-abhängigen Wechselwirkung mit den tsA-Membranen, da dieser Effekt auch bei den Kontrollmessungen auftrat.

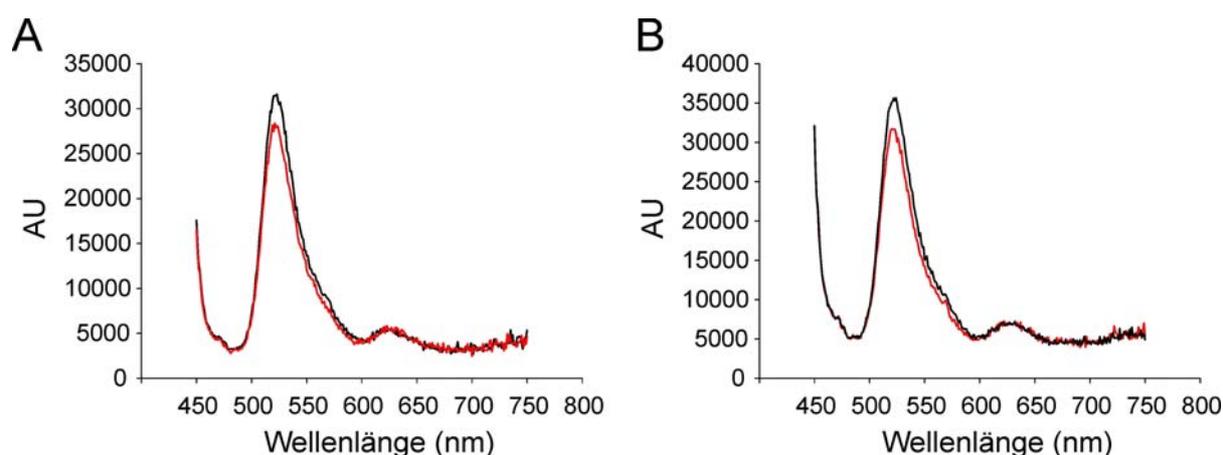


Abbildung 3.22: Emissionsspektren von AAC-590 und AAAC-488. (A) in Gegenwart GC1-enhaltender tsA-Membranen; (B) in Gegenwart von tsA-Membranen (Kontrolle); die Wellenlänge des Anregungslichtes betrug $\lambda = 440$ nm. Schwarze Spektren wurden in Gegenwart von 10 μ M Kalzium aufgezeichnet und rote Spektren in Gegenwart von 50 μ M EGTA.

Um das Problem der Kalzium-abhängigen Wechselwirkungen von GCAPs mit Membranen zu umgehen, deletierte ich die ECD und die TMD der GC1. Dadurch wollte ich eine lösliche, enzymatisch aktive GC1-Form erhalten. Das Konstrukt, GC1cyt (H⁴⁹⁰-K¹¹¹⁰; 69,5 kDa) wurde in *Sf9*-Zellen (Insektenzellen) exprimiert. Mehrere Versuche, GC1cyt im Western Blot nachzuweisen, blieben erfolglos. Jedoch beinhaltete das Zytosol von *Sf9*-Zellen, die mit dem GC1cyt-Expressionvektor transfiziert waren, GC-Aktivität, die sich Kalzium-abhängig durch GCAPs regulieren ließ. In Abbildung 3.23 sind diese Kalzium-Titrations mit GCAP1-D⁶S und GCAP2-wt gezeigt. Man sieht den typischen Kurvenverlauf der GCAP-vermittelten GC-Aktivierung: eine hohe GC-Aktivität bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen und eine niedrige GC-Aktivität bei hohen Kalzium-Konzentrationen. Die Messungen ergaben für GCAP1-D⁶S einen IC₅₀-Wert von 1370 nM +/- 95 nM Kalzium und für GCAP2-wt einen IC₅₀-Wert von 148 nM +/- 4 nM Kalzium. Verglichen mit den Werten der Kalzium-Titrations an hetGC1 aus tsA-Zellen (Tab. 3.4), waren die an GC1cyt ermittelten IC₅₀-Werte zu höheren Kalzium-Konzentrationen hin verschoben.

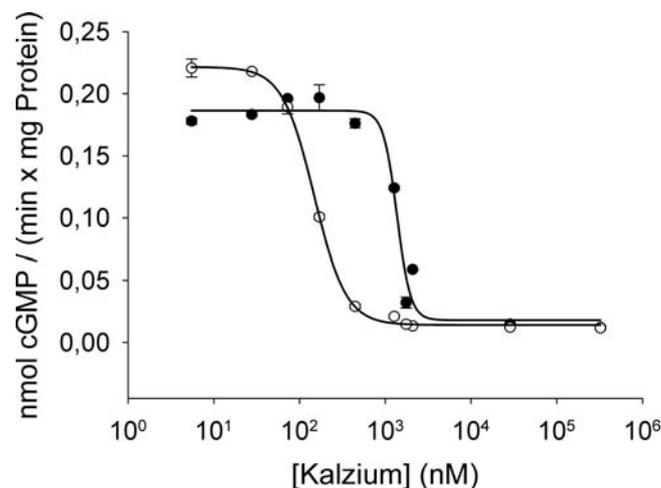


Abbildung 3.23: Durch GCAPs vermittelte, Kalzium-abhängige GC-Aktivität im Zytosol GC1cyt-exprimierender *Sf9*-Zellen. Die GCAP-Konzentrationen betragen jeweils 2 μ M. GCAP1-D⁶S: schwarze Kreise; GCAP2-wt: offene Kreise.

Da ich GC1cyt im Western Blot nicht nachweisen konnte, versuchte ich, mit Hilfe verschiedener Chromatographie-Techniken, GC1cyt zu reinigen. Dadurch wollte ich GC1cyt direkt im Coomassie-gefärbten Gel nachweisen, bzw. höhere GC1cyt-Mengen im Western Blot einsetzen. Dies gelang mir nicht.

Daher klonierte ich ein weiteres GC1-Konstrukt (Abb. 3.24) mit dem Ziel, dieses leichter reinigen zu können. Dieses Konstrukt, CitrinGC1cyt, besaß N-terminal sechs Histidine (His-tag), gefolgt von dem fluoreszierenden Protein Citrin und dem C-terminal gelegenen

GC1cyt. Das Citrin ist ein Derivat des gelb-grün fluoreszierenden Proteins eYFP (Griesbeck et al., 2001). Das Excitationsmaximum liegt bei $\lambda = 513$ nm und das Emissionsmaximum bei $\lambda = 527$ nm. Das Citrin sollte in weiterführenden FRET-Experimenten als Donor bzw. Akzeptor für fluoreszenzmarkierte GCAPs dienen. Der His-Tag sollte die Reinigung von CitrinGC1cyt erleichtern. Die Expression von CitGC1cyt erfolgte in *Sf9*-Zellen und die affinitätschromatographische Reinigung wurde mit Nickel-NTA-Agarose durchgeführt. Während der Reinigung erhielt ich sieben Fraktionen, deren Emissionsspektren in Abbildung 3.24 dargestellt sind. Die Wellenlänge des Anregungslichtes betrug $\lambda = 470$ nm. Die Fraktionen 2, 3 und 4 zeigten eine deutliche Fluoreszenz, deren Emissionsmaximum bei 527 nm lag, einer für Citrin typischen Wellenlänge. Im Western Blot konnte ich mit einem GC1-spezifischen Antikörper, dessen Epitop in GC1cyt enthalten ist, nicht nachweisen. Ebenso zeigte CitGC1cyt keine GC-Aktivität. Somit blieb auch dieser experimentelle Ansatz erfolglos.

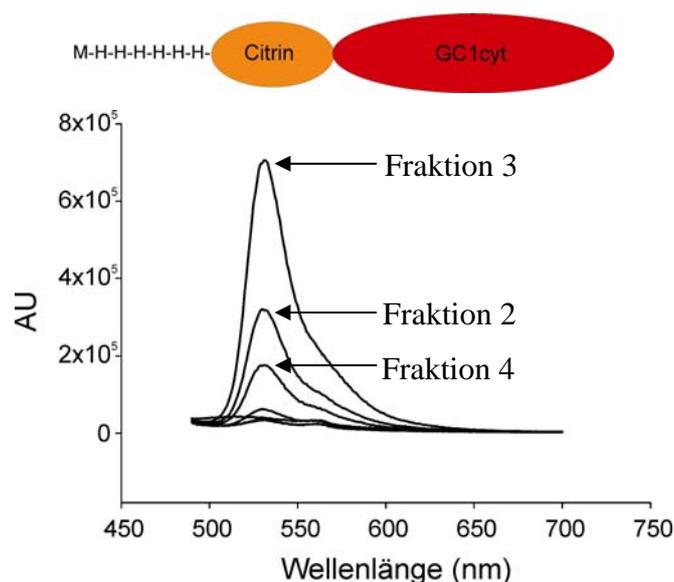


Abbildung 3.24: Emissionsspektren von CitGC1cyt enthaltenden Fraktionen. Die Anregung erfolgte bei $\lambda = 470$ nm. Das Konstrukt CitGC1cyt ist über den Spektren schematisch dargestellt.

3.3.3 Zusammenfassung der Experimente mit fluoreszenzmarkierten Proteinen

GCAP-Mutanten, die nur noch einen Cystein-Rest besaßen, wurden von mir mit thiolreaktiven Fluophoren gekoppelt. Die Absorption dieser fluoreszenzmarkierten GCAPs änderte sich Kalzium-abhängig nicht oder nur wenig (siehe Abb. 3.20). Kalzium-induzierte Änderungen ihrer Emissions- und Excitationsspektren waren nicht reversibel. Daher waren die Änderungen nicht auf Konformationsänderungen der GCAP2-Mutanten zurückzuführen. Ein FRET-Signal zwischen fluoreszenzmarkierten GCAP1-Mutanten und GCAP2-Mutanten in Gegenwart der hetGC1 konnte nicht gemessen werden. Die beobachteten Fluoreszenzänderungen von AAAC-488 beruhten auf Kalzium-abhängigen Interaktionen mit tsA-Membranen. Versuche, diesen Effekt mit einem löslichen GC1-Konstruktes zu umgehen, blieben erfolglos.

4. Diskussion

In dieser Dissertation wurde die Dynamik der Kalzium-abhängigen Regulation membranständiger Guanylatzyklasen (GCs) aus Sehzellen durch Guanylatzyklase aktivierende Proteine (GCAPs) untersucht. Entscheidend für die GC-Aktivierung bei niedrigen Kalzium-Konzentrationen sind die Kalzium-Affinitäten der EF-Hand-Motive von GCAPs. Um die Kalzium-Affinitäten des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAP2 zu bestimmen, konnte ich zwei Cystein-Reste nutzen, die im ersten bzw. zweiten EF-Hand-Motiv liegen. Durch den genetischen Austausch von Cystein-Resten gegen Alanin-Reste, konnte ich die Kalzium-abhängige Zugänglichkeit der verbliebenen Cystein-Reste für das thiolreaktive DTNB messen.

In weiteren Experimenten habe ich Cystein-Mutanten beider GCAP-Isoformen ortsspezifisch mit Fluophoren gekoppelt, um Kalzium-abhängige Konformationsänderungen der GCAPs oder Kalzium-abhängige Konformationsänderungen innerhalb des GC/GCAP-Systems zu untersuchen.

4.1 Einfluß der AS-Austausche auf die GC-Regulation

Die GCAP2-Mutanten wurden, ebenso wie GCAP2-wt und GCAP1-D⁶S, heterolog in *E. coli* exprimiert, daraus gereinigt (siehe Abb. 3.2) und mit Hilfe eines GCAP2-spezifischen Antikörpers identifiziert (siehe Abb. 3.3). Alle Mutanten zeigten den für GCAPs charakteristischen Kalzium-Shift (siehe Abb. 3.4). Folglich beeinflusste keine der Mutationen die Kalzium-induzierte Konformationsänderung, die zum Kalzium-Shift führt. Der Reinheitsgrad der GCAPs lag bei mindestens 95 % und der Myristylierungsgrad betrug 86 % bis 93 % (siehe Tab. 3.1). Somit war die grundlegende Bedingung für die weiterführenden Experimente, nämlich über gereinigte und myristylierte GCAP2-Mutanten zu verfügen, erfüllt.

Durch GC-Assays mit ROS-Membranen und heterolog in tsA-Zellen exprimierten GCs, konnte ich EC₅₀-Werte und IC₅₀-Werte für die verschiedenen GCAP2-Mutanten bestimmen. Diese sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Werte, die um den Faktor ≥ 2 von GCAP2-wt abweichen, sind gelb hervorgehoben. Jedoch liegt diesen Abweichungen kein Muster von AS-Austauschen zugrunde, beispielsweise, daß der C¹¹¹A-Austausch zu erhöhten IC₅₀-Werten führt.

Die X_{\max} -Werte aller GCAP-Titrations sind in Abbildung 4.1 als Balkendiagramm dargestellt. Die AS-Austausche beeinflussten die X_{\max} -Werte. Bei den an ROS-Membranen ermittelten X_{\max} -Werten (schwarze Balken in Abb. 4.1) erkennt man folgendes Muster. Die GCAP2-Mutanten, welche das C^{35} besaßen (CCA, CAC und CAA), zeigten X_{\max} -Werte im Bereich von GCAP2-wt. War hingegen C^{35} durch einen Alanin-Rest substituiert (ACC, ACA, AAC und AAA), verminderten sich die X_{\max} -Werte um etwa 50 %. Bei GCAP-Titrations mit hetGC1 (rote Balken in Abb. 4.1), zeigten CCA und CAC niedrigere X_{\max} -Werte als GCAP2-wt und CAA. Die X_{\max} -Werte der restlichen Mutanten (ACC, ACA, AAC und AAA) lagen deutlich unter den Werten von CCA und CAC. Ein ähnliches Bild war bei den GCAP-Titrations mit hetGC2 zu beobachten (blaue Balken in Abb. 4.1). Lediglich der X_{\max} -Wert von CAA war auf dem Niveau der GCAP2-Mutanten mit ausgetauschtem C^{35} .

Tab. 4.1: Zusammenfassung aller EC_{50} -Werte (angegeben in μM) und IC_{50} -Werte (angegeben in nM) von GCAP2-wt, GCAP1-D⁶S und aller GCAP2-Mutanten. Die hetGCs wurden heterolog in tsA-Zellen exprimiert. Weichen Werte von GCAP2-Mutanten um den Faktor ≥ 2 von den Werten von GCAP2-wt ab, sind die Felder gelb hervorgehoben.

GCAP-Form	<u>ROS-Membranen</u>		<u>hetGC1</u>		<u>hetGC2</u>	
	EC_{50}	IC_{50}	EC_{50}	IC_{50}	EC_{50}	IC_{50}
GCAP2-wt	0,45 +/- 0,17	78 +/- 2	4,6 +/- 0,6	47 +/- 0	0,37 +/- 0,07	46 +/- 4
GCAP1-D ⁶ S	0,77 +/- 0,69	855 +/- 157	16,6 +/- 8,7	608 +/- 35	2,33 +/- 0,04	306 +/- 29
CCA	0,50 +/- 0,16	198 +/- 17	3,7 +/- 0,3	137 +/- 3	0,16 +/- 0,02	151 +/- 4
CAC	0,29 +/- 0,05	227 +/- 13	1,5 +/- 0,0	127 +/- 5	0,11 +/- 0,01	62 +/- 1
CAA	0,31 +/- 0,05	183 +/- 12	3,5 +/- 0,1	106 +/- 2	0,16 +/- 0,02	109 +/- 3
ACC	0,29 +/- 0,05	91 +/- 5	48 +/- 30	72 +/- 7	0,20 +/- 0,04	144 +/- 9
ACA	0,35 +/- 0,03	67 +/- 4	40 +/- 33	77 +/- 9	0,14 +/- 0,06	93 +/- 4
AAC	0,22 +/- 0,01	85 +/- 1	5,9 +/- 0,4	85 +/- 6	0,17 +/- 0,03	53 +/- 3
AAA	0,27 +/- 0,02	183 +/- 12	44 +/- 22	81 +/- 2	0,20 +/- 0,65	49 +/- 6

Ermilov et al. (2001) beobachteten ein ähnliches Aktivierungsmuster der GCs durch Cystein-Mutanten von GCAP2. Bei diesen Mutanten war das C³⁵ durch S, T, D oder K substituiert. In GC-Assays mit ROS-Membranen aktivieren die C³⁵S- und C³⁵T-Mutanten die nativen GCs nur halb so stark, wie GCAP2-wt. Die C³⁵D- und C³⁵K-Mutanten, die eine zusätzliche Ladung tragen, aktivieren die GCs nur noch schwach (C³⁵K) bzw. gar nicht mehr (C³⁵D). Da ROS-Membranen beide GC-Isoformen enthalten, konnten Ermilov et al. keine Aussagen treffen, ob der Austausch von C³⁵ die Stärke der GC1- oder der GC2-Aktivierung beeinflusst. Diese offene Frage konnte ich durch GC-Assays mit hetGCs beantworten. Der Austausch von C³⁵ beeinflusst sowohl die Stärke der GC1-Aktivierung, als auch der GC2-Aktivierung. Dies deutet auf eine gleichartige Regulation beider GC-Isoformen durch GCAP2 hin.

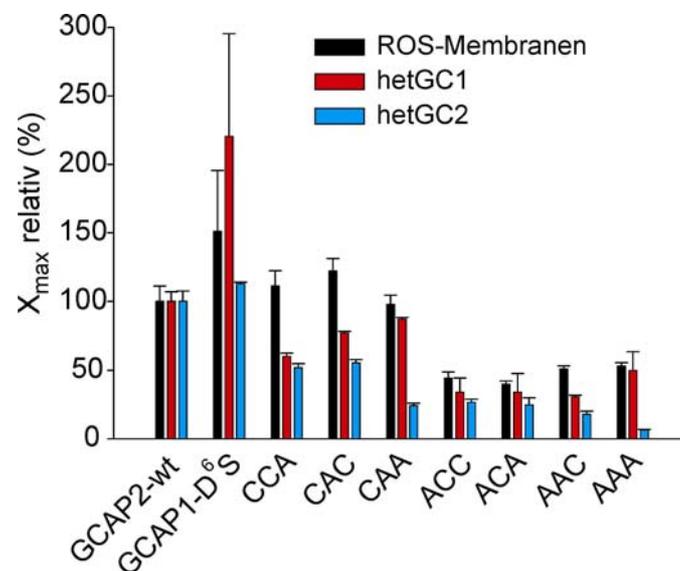


Abbildung 4.1: Vergleich der X_{\max} -Werte aller in dieser Arbeit durchgeführten GCAP-Titrationsen. Die an ROS-Membranen (schwarz), hetGC1 (rot) und hetGC2 (blau) ermittelten X_{\max} -Werte der GCAP2-Mutanten sind jeweils auf den X_{\max} -Wert von GCAP2-wt relativiert.

Hwang et al. (2001) führten GC-Assays mit ROS-Membranen und nichtmyristylierten (nm) GCAP1-Mutanten durch. Die Cystein-Reste dieser GCAP1-Mutanten waren, ähnlich wie die Cystein-Reste meiner GCAP2-Mutanten, gegen Alanin-Reste ausgetauscht. Da die drei Cystein-Reste von GCAP2 in GCAP1 konserviert sind und ebenfalls im ersten und dritten EF-Hand-Motiv liegen, können die Ergebnisse dieser Arbeit mit meinen verglichen werden. Die EC_{50} -Werte der GCAP1-Mutanten weichen, ebenso wie die meiner GCAP2-Mutanten, nur geringfügig vom EC_{50} -Wert des Wildtyps ab. Allerdings beeinflussen die AS-Austausche die Kalzium-Sensitivitäten der GCAP1-Mutanten stärker, als dies die AS-Austausche in den GCAP2-Mutanten tun. Myristyliertes (m) GCAP1 besitzt einen IC_{50} -Wert von etwa 1 μ M Kalzium, nichtmyristyliertes hingegen einen von etwa 2 μ M Kalzium (Hwang et al., 2002).

Die IC_{50} -Werte der nmGCAP1-Mutanten nähern sich um so mehr dem IC_{50} -Wert von mGCAP1 an, je mehr Cystein-Reste gegen Alanin-Reste ausgetauscht sind. Ähnlich werden die X_{max} -Werte von GCAP1 durch die AS-Austausche beeinflusst. Nichtmyristyliertes GCAP1 kann die GC1 nur etwa halb so stark aktivieren wie mGCAP1. Je mehr Cystein-Reste von nmGCAP1 gegen Alanin-Reste ausgetauscht sind, desto mehr gleichen sich die X_{max} -Werte an mGCAP1 an. Die Autoren interpretierten diese Ergebnisse dahingehend, daß die hydrophoben Alanin-Reste die fehlende hydrophobe Myristingruppe kompensieren würden. Die Cystein-Austausche in GCAP1 und GCAP2, insbesondere im ersten EF-Hand-Motiv, beeinflussen die GC-Aktivierung somit unterschiedlich. Die GCAP1-Mutante nmCACC, die der GCAP2-Mutante ACC entspricht, aktiviert die GCs aus ROS-Membranen etwa gleich stark wie nmGCAP1 (Hwang et al., 2001; siehe Tabelle 1), während die GCAP2-Mutante ACC die GCs nur halb so stark aktiviert wie GCAP2-wt (siehe Tab. 4.1). In einer anderen Arbeit zeigen Hwang et al. (2004), daß die GCAP1-Mutante nmCPG (C²⁹ und P³⁰ gegen einen Glycin-Rest ausgetauscht) die GCs aus ROS-Membranen nur minimal aktiviert. Jedoch ist der Austausch des P³⁰, welches wichtig für die Ausbildung von Sekundärstrukturen ist, für diesen Effekt verantwortlich, da der alleinige Austausch von C²⁹ in der GCAP1-Mutante nmCACC zu einer stärkeren GC-Aktivierung führt (siehe oben). Die Austausche von Cystein-Resten im ersten EF-Hand-Motiv wirken sich unterschiedlich auf die GC-Aktivierung aus. Dies deutet darauf hin, daß die GCAPs die GCs durch unterschiedliche Mechanismen aktivieren. Diese Annahme wird durch zahlreiche Arbeiten gestützt, die Unterschiede der GC-Regulation durch GCAP1 und GCAP2 belegen. So beeinflusst eine fehlende Myristin-Gruppe die katalytischen Parameter von GCAP1 stärker als die von GCAP2. Ebenso unterscheidet sich die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M). Dieser Wert für die GC1-Aktivierung durch mGCAP1 ist doppelt so hoch wie der von mGCAP2 (Hwang et al., 2002 und 2003). Ein weiteres Beispiel ist, daß GCAP2 Kalzium-abhängig dimerisieren kann (Olshevskaya et al., 1999) und GCAP1 nicht (Hwang et al., 2004).

4.2 Die GC2 wird von GCAP1 und GCAP2 reguliert

Die Regulation der GC2 durch GCAPs wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während manche Arbeitsgruppen nur die Regulation durch GCAP2 sehen (Goracznik et al., 1998; Haeseleer et al., 1999), sieht eine andere Arbeitsgruppe die Regulation durch beide GCAPs (Krylov et al., 1999). In meiner Diplomarbeit ("Molekulare Unterschiede der membrangebundenen Guanylatzyklasen ROS-GC1 und ROS-GC2 aus Photorezeptoren", Universität zu Köln, 2002) konnte ich die Ergebnisse von Krylov et al. bestätigen. Jedoch

diskutierte ich nicht die Kalzium-Sensitivität der GC2-Regulation. Hwang et al. (2003) zeigten an ROS-Membranen und an heterolog exprimierter GC1, daß GCAP1 einen höheren IC₅₀-Wert besitzt als GCAP2. Dies konnte ich auch für in tsA-Zellen exprimierte GC2 zeigen (siehe Tab. 4.1). Dies deutet darauf hin, daß am Beginn der Lichtantwort, wenn die Kalzium-Konzentration nur leicht gesunken ist, beide GC-Isoformen von GCAP1 aktiviert werden. Dies wäre auch bei einer schwachen Hintergrundbelichtung der Fall, wenn die Kalzium-Konzentration nur geringfügig fallen würde. Das würde bedeuten, daß beide GC-Isoformen und nur GCAP1 an der Lichtadaptation beteiligt sind. Fällt die Kalzium-Konzentration stärker, werden beide GC-Isoformen von beiden GCAP-Isoformen aktiviert.

4.3 Zwei Cystein-Reste von GCAP2 reagieren Kalzium-abhängig mit DTNB

Unter EGTA-Bedingungen reagierten die drei Cystein-Reste von GCAP2-wt mit der thiolreaktiven Substanz DTNB. Unter Kalzium-Bedingungen reagierte nur ein Cystein-Rest mit dem DTNB (siehe 3.13, A). Diese Daten widersprechen den Ergebnissen von Hwang et al. (2002), die ebenfalls die Zugänglichkeit der Cystein-Reste von GCAP2 für DTNB untersuchten. Sie stellten fest, daß nur zwei Cystein-Reste von GCAP2-wt unabhängig der Kalzium-Konzentration mit dem DTNB reagierten. Setzten sie hingegen nmGCAP2 in die DTNB-Reaktion ein, reagierten alle drei Cystein-Reste mit DTNB. Dies wurde dahingehend interpretiert, daß die Myristin-Gruppe einen Cystein-Rest vor der DTNB-Reaktion schützt. Mein Ergebnis, daß die Zugänglichkeit zweier Cystein-Reste für DTNB Kalzium-abhängig und die des dritten Cystein-Restes Kalzium-unabhängig ist, wird eindeutig durch Messungen der GCAP2-Mutanten bestätigt. So konnte ich C³⁵, welches in der Schleife des ersten EF-Hand-Motivs liegt, und C¹¹¹, welches in der Schleife des dritten EF-Hand Motivs liegt, als die Cystein-Reste identifizieren, deren Zugänglichkeit Kalzium-abhängig ist (siehe 3.13, B und C). Für C³⁵ war dies erstaunlich, da für das erste EF-Hand-Motiv keine Kalzium-Bindung angenommen wird. Dennoch zeigen meine Ergebnisse, daß in diesem EF-Hand-Motiv eine Kalzium-induzierte Konformationsänderung stattfindet. Der dritte Cystein-Rest, C¹³¹, welcher zwischen dem dritten und vierten EF-Hand-Motiv liegt, ist unabhängig der Kalzium-Konzentration für DTNB zugänglich (siehe 3.13, D). Da ich die DTNB-Experimente mit myristylierten GCAPs durchführte (Myristylierungsgrad zwischen 86 % und 93 %), kann ich den Schutzeffekt der Myristin-Gruppe für einen Cystein-Rest, den Hwang et al. (2002) beobachteten, nicht bestätigen. Damit die Myristin-Gruppe einen Cystein-Rest sterisch vor

der DTNB-Reaktion schützen kann, müßte sie am GCAP anliegen. Dies ist nicht der Fall. Hughes et al. (1998) zeigten, daß die Myristin-Gruppe von GCAP2 unabhängig der Kalzium-Konzentration zum Lösungsmittel exponiert ist. Eine Möglichkeit den Schutz-Effekt der Myristin-Gruppe zu erklären wäre, daß sie eine Struktur stabilisiert, die die Zugänglichkeit eines Cystein-Restes erschwert.

Wodurch könnten die Unterschiede zwischen meinen Ergebnissen und denen von Hwang et al. begründet sein? Betrachten wir zunächst die Zahl der zugänglichen Cystein-Reste. In Abbildung 5 (Hwang et al., 2001) sind die DTNB-Reaktionen von GCAP2-wt und nmGCAP2 gezeigt. Die GCAP-Konzentration lag zwischen 0,4 μM und 0,6 μM . Die Absorption der DTNB-Lösung, ohne mit Cystein-Resten reagiert zu haben, wird mit 0,015 angegeben. Die maximale Absorption von nmGCAP2 liegt während der DTNB-Reaktion bei 0,045, was einer Cystein-Konzentration von 2,2 μM entspricht. Nimmt man die höchste GCAP-Konzentration an (0,6 μM), würde dies 3,5 zugänglichen Cystein-Resten entsprechen und nicht 3 Cystein-Resten. Die maximale Absorption von GCAP2-wt betrug 0,035. Dies entspricht 1,5 μM Cystein-Resten. Nimmt man auch hier die maximale GCAP-Konzentration an (0,6 μM), wären 2,5 Cystein-Reste zugänglich gewesen und nicht 2 Cystein-Reste. Meiner Meinung nach wurden die Konzentrationen der GCAP-Lösungen zu ungenau bestimmt, wodurch das Ergebnis verfälscht wurde.

Warum Hwang et al. (2001), im Gegensatz zu mir, keine Kalzium-abhängigen Zugänglichkeiten von Cystein-Resten beobachteten, ist unklar. Die Experimente unterschieden sich darin, daß Hwang et al. GCAPs aus der zytosolischen Fraktion von *E. coli* reinigten. Ich reinigte GCAPs aus der nichtzytosolischen Fraktion. Jedoch beeinflußt die Art der Reinigung nicht die GC-Aktivierung. Deshalb schließe ich dies als Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse aus.

4.3.1 Die Kalzium-Affinitäten des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAPs

Die Zugänglichkeit von jeweils zwei Cystein-Resten in GCAP1 und GCAP2 ist Kalzium-abhängig. In GCAP1 sind dies C²⁹ bzw. C¹⁰⁶ (Hwang et al., 2001) und in GCAP2-wt sind dies C³⁵ und C¹¹¹ (siehe 4.2). Diese, zwischen den GCAP-Isoformen konservierten Cystein-Reste, liegen im ersten (C²⁹ bzw. C³⁵) und im dritten EF-Hand-Motiv (C¹⁰⁶ bzw. C¹¹¹). Die Kalzium-Sensitivität der DTNB-Reaktion mit diesen Cystein-Resten kann als Kalzium-Affinität des jeweiligen EF-Hand-Motivs interpretiert werden. Hwang et al. (2001) konnten die Kalzium-Affinitäten des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAP1 bestimmen. Die Kalzium-

Affinitäten des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAP2 habe ich in dieser Arbeit bestimmt. Abweichend von der Arbeit von Hwang et al., führte ich die Messungen in einem Puffer durch, der dem des GC-Assays entsprach. Dieser enthielt 10 mM Magnesium. Deshalb habe ich die Messungen mit den GCAP1-Mutanten wiederholt. Um den Einfluß von Magnesium auf die Kalzium-Affinitäten zu untersuchen, habe ich die Messungen auch in Abwesenheit von Magnesium durchgeführt.

In Tabelle 4.2 sind die Kalzium-Affinitäten (apparente K_D -Werte) des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAP1 und GCAP2 angegeben. Die apparenten K_D -Werte des ersten EF-Hand-Motivs liegen bei beiden GCAPs über den apparenten K_D -Werten des dritten EF-Hand-Motivs. Das erste EF-Hand-Motiv von GCAP2 besitzt einen niedrigeren apparenten K_D -Wert als das von GCAP1. Die apparenten K_D -Werte lassen sich dazu benutzen, um nach der unten stehenden Gleichung die Dissoziations-Ratenkonstanten K_{off} bzw. die Zeitkonstante zu bestimmen.

$$K_D = \frac{K_{off}}{K_{on}}$$

Die Assoziation von Kalzium ist bei GCAP1 diffusionskontrolliert und die Assoziations-Ratenkonstante (K_{on}) beträgt $2 \times 10^8 \times M^{-1} \times sek^{-1}$ (Sokal et al., 1999). Für GCAP2 habe ich ebenfalls diesen K_{on} -Wert angenommen.

Tab. 4.2: Apparente K_D -Werte und Zeitkonstanten der Kalzium-Dissoziation des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAP1 und GCAP2.

GCAP-Form	GCAP2-CAA	GCAP2-ACA	nmGCAP1- ACAA	nmGCAP1- AACA
K_D	1.094 +/- 101 nM Ca^{2+}	255 +/- 26 nM Ca^{2+}	8.480 +/- 1030 nM Ca^{2+}	245 +/- 9 nM Ca^{2+}
K_{off}	219 sek ⁻¹	51 sek ⁻¹	1696 sek ⁻¹	49 sek ⁻¹
Zeitkonstante	4,6 msek	19,6 msek	0,6 msek	20,4 msek
$(Ca^{2+})_{1/2}$ (Magnesium)	1.620 +/- 320 nM Ca^{2+}	n.b.	11.400 +/- 3.500 nM Ca^{2+}	ca. 900 nM Ca^{2+}
K_{off} (Magnesium)	324 sek ⁻¹	n.b.	2280 sek ⁻¹	180 sek ⁻¹
Zeitkonstante (Magnesium)	3,1 msek	n.b.	0,4 msek	5,6 msek

Was bedeuten diese Daten für die GC-Aktivierung durch GCAP2? Die apparenten K_D -Werte beider EF-Hand-Motive liegen oberhalb des IC_{50} -Wertes ($IC_{50} = 78$ nM Kalzium, siehe Tab. 4.1). Der apparente K_D -Wert des gesamten GCAP2 beträgt 300 nM Kalzium (Ames et al., 1999). Daher müssen die Kalzium-Affinitäten des zweiten und / oder vierten EF-Hand-Motivs höher liegen, um die GCs im Konzentrationsbereich unter 100 nM Kalzium regulieren zu können. Dies würde bedeuten, daß durch die Kalzium-Dissoziation am dritten EF-Hand-Motiv eine Konformationsänderung induziert wird, die der erste Schritt der GC-Aktivierung ist. Die Zeitkonstante mit der dies geschieht (19,6 msec, siehe Tab. 4.2) ist niedrig genug, um in den Zeitablauf der Lichtantwort (100 bis 200 msec) zu passen.

Meine Messungen der apparenten K_D -Werte des ersten und dritten EF-Hand-Motivs von GCAP1 ergaben Werte, die etwa um eine Größenordnung unter den von Hwang et al. (2001) ermittelten Werten liegen. Dies könnte am abweichenden Puffersystem gelegen haben.

In Gegenwart von Magnesium erhöhten sich die apparenten K_D -Werte der ersten EF-Hand-Motive beider GCAPs und des dritten EF-Hand-Motivs von GCAP1 (siehe Tab. 4.2). Der apparente K_D -Wert des dritten EF-Hand-Motivs von GCAP2 konnte nicht bestimmt werden. Peshenko und Dizhoor (2004) zeigten, daß Magnesium die IC_{50} -Werte beider GCAP-Isoformen erhöht. Meine Ergebnisse helfen, dies für GCAP1 auf molekularer Ebene zu erklären. Magnesium erhöht den apparenten K_D -Wert des dritten EF-Hand-Motivs von GCAP1. Die Kalzium-Dissoziation von diesem EF-Hand-Motiv induziert eine Konformationsänderung, die der erste Schritt der GC-Aktivierung ist (Hwang et al., 2001). In Gegenwart von Magnesium geschieht dieser Schritt erst bei höheren Kalzium-Konzentrationen, wodurch sich der IC_{50} -Wert erhöht. Um den Magnesium-Einfluß vollständig zu verstehen, müßten alle EF-Hand-Motive untersucht werden. Dies war mit meinem experimentellen Ansatz, der die vorhandenen Cystein-Reste nutzte, nicht möglich. In der Sehzelle könnte der Magnesium-Effekt der Feinabstimmung der Kalzium-Sensitivität des GC/GCAP-Systems dienen. Jedoch sind mir keine Arbeiten bekannt, die lichtabhängige Veränderungen der Magnesium-Konzentration in Sehzellen beschreiben. In Außensegmenten von Salamander-Sehzellen konnten Fluktuationen der Magnesium-Konzentration sogar ausgeschlossen werden (Chen et al., 2003). Möglicherweise wird die Kalzium-Sensitivität des GC1/GCAP1-System nur außerhalb des Außensegments von Sehzellen durch Magnesium feinreguliert. Dies wäre in Synapsen von Zapfensehzellen (Venkataraman et al., 2003), im Riechkolben (Duda et al., 2001) und in bestimmten Pinealocyten der Fall (Venkataraman et al., 2000). Dort konnte die GC1 und GCAP1 nachgewiesen werden.

4.4 Fluophore als Monitor für Kalzium-abhängige Konformationsänderungen

GCAP-Mutanten, die nur einen Cystein-Rest besaßen, ermöglichten mir, thiolreaktive Fluophore ortsspezifisch zu koppeln. Dadurch wollte ich Kalzium-abhängige Konformationsänderungen der GCAPs und Kalzium-abhängige Konformationsänderungen des GC/GCAP-Systems messen.

4.4.1 Fluophore als Monitor für Konformationsänderungen von GCAP2

Ich koppelte die Fluophore Alexa-488 und Alexa-647 an die GCAP2-Mutanten ACA und CAA. Da deren verbliebene Cystein-Reste in EF-Hand-Motiven lagen, in denen ich durch die DTNB-Experimente Konformationsänderungen messen konnte, erwartete ich Kalzium-induzierte Änderungen der Fluoreszenz. Dies konnte ich nicht beobachten. Eine mögliche Erklärung dieses negativen Ergebnisses wäre, daß die Fluophore die Kalzium-Bindung des jeweiligen EF-Hand-Motivs und damit eine Konformationsänderung unterbunden haben.

4.4.2 Fluophore als Monitor für Kalzium-abhängige Interaktionen des GC1/GCAP-Systems

Zwischen unterschiedlich fluoreszenzmarkiertem GCAP1 und GCAP2 wollte ich den Förster Resonanz-Energie-Transfer (FRET) in Gegenwart der hetGC1 messen. Dadurch wollte ich die Frage, ob beide GCAP-Isoformen gleichzeitig an die GC1 binden, beantworten. Dazu koppelte ich die GCAP1-Mutante AAAC mit dem Fluophor Alexa-488, der als FRET-Donor dienen sollte, und die GCAP2-Mutante AAC mit dem Fluophor Atto-590, der als FRET-Akzeptor dienen sollte. Ich wählte diese beiden GCAP-Mutanten, da die verbliebenen Cystein-Reste in keiner der Regionen lagen, die für die GC-Regulation wichtig sind. Beide fluoreszenzmarkierten GCAP-Mutanten erfüllten die Grundvoraussetzung des FRET-Experiments, GCs aus ROS-Membranen Kalzium-abhängig zu aktivieren (siehe 3.21). Dennoch ließ sich kein FRET messen. Lediglich die Fluoreszenzintensität des FRET-Donors, AAAC-488, änderte sich Kalzium-abhängig und reversibel. Dieser Effekt beruhte auf einer Kalzium-abhängigen Wechselwirkung mit tsA-Membranen, da er auch bei der negativ-Kontrolle auftrat. Dennoch kann, trotz meines negativen Ergebnisses, die

gleichzeitige Bindung beider GCAP-Isoformen an die GC1 nicht ausgeschlossen werden. Zum einen, lagen die GCAP-Konzentrationen deutlich unter den EC_{50} -Werten für die hetGC1-Aktivierung. Höhere GCAP-Konzentrationen hätten jedoch die Wechselwirkungen von GCAP1 mit den tsA-Zellmembranen erhöht. Zum anderen verfügte ich über keine positiv-Kontrolle, welche FRET zwischen Molekülen auf einer Matrize (hier: hetGC1) zeigte. Würden GCAP1 und GCAP2 gleichzeitig an die GC1 binden, würde die Aktivierung stärker ausfallen, als wenn nur eine GCAP-Isoform binden würde. Diesen Effekt der additiven Aktivierung beobachteten Krishnan et al. (1998) an in COS-Zellen exprimierter GC1.

Um das Problem der Kalzium-abhängigen Wechselwirkung der GCAPs mit Membranen zu umgehen, versuchte ich ein lösliches, enzymatisch aktives GC1-Konstrukt zu exprimieren und zu reinigen. Dies erschien möglich, da die GCAP-Bindestellen in der intrazellulären Domäne der GC1 liegen (siehe 1.4.1). Ein Konstrukt, GC1cyt, war enzymatisch aktiv und wurde von beiden GCAP-Isoformen Kalzium-abhängig reguliert (siehe 3.23). Da ich dieses Konstrukt nicht im Western Blot nachweisen konnte und nicht reinigen konnte, generierte ich CitGC1cyt. Dieses Konstrukt besaß einen His-Tag und Citrin, ein Derivat des fluoreszierenden Proteins eYFP, besaß. Dieses fluoreszierende Konstrukt sollte in weiterführenden FRET-Experimenten mit fluoreszenzmarkierten GCAPs verwendet werden. CitGC1cyt zeigte eine Citrin-typische Fluoreszenz (siehe 3.24), aber keine GCAP-vermittelte GC-Aktivität. Dieser experimentelle Ansatz endete folglich in einem weiteren negativen Ergebnis.

Anhand der negativen Ergebnisse aller Fluoreszenz-Experimente, konnte ich kein Modell der GCAP-vermittelten GC1-Aktivierung (siehe 1.4.2) bestätigen oder ausschließen.

4.5 Ausblick

In dieser Dissertation konnte ich zeigen, daß Magnesium den K_D -Wert für Kalzium des dritten EF-Hand-Motivs von GCAP1 erhöht und dadurch auch den IC_{50} -Wert. Für GCAP2 konnte ich den K_D -Wert des dritten EF-Hand-Motivs nur in Abwesenheit von Magnesium bestimmen. Der K_D -Wert sollte auch in Gegenwart von Magnesium bestimmt werden. Dies würde die Frage, ob Magnesium, ähnlich wie bei GCAP1, den IC_{50} -Wert durch eine Erhöhung des K_D -Wertes beeinflußt, beantworten.

Die Fluoreszenzmessungen waren durch Wechselwirkungen von GCAPs mit Membranen gestört. Durch den Einsatz von löslichen, enzymatisch aktiven GC1-Konstrukten habe ich versucht, diese Störungen zu verhindern. Jedoch konnte keines dieser GC1-Konstrukte eindeutig über einen Antikörper identifiziert oder gereinigt werden. Die FRET-Experimente müßten mit einem gereinigten GC1-Konstrukt wiederholt werden. Eine Voraussetzung dafür ist allerdings, daß Protein in ausreichenden Mengen exprimiert wird. Dies sollte die Frage beantworten, ob beide GCAP-Isoformen gleichzeitig an die GC1 binden und falls ja, welche Kalzium-abhängigen Distanzveränderungen auftreten. Die löslichen GC1-Konstrukte könnten mit Hilfe der Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektroskopie untersucht werden. Mit dieser Technik lassen sich Protein-Protein-Wechselwirkungen direkt messen. So könnten GC1/GCAP-Wechselwirkungen direkt gemessen werden. Durch den Einsatz von Peptiden, die den Interaktionsstellen der GC1 mit GCAPs entsprechen, ließe sich überprüfen, an welche Interaktionsstellen GCAPs bei welchen Kalzium-Konzentrationen binden.

Weitere Anwendungen der löslichen GC1-Konstrukte wären *cross-linking* Experimente, native Gelelektrophorese oder die Kristallisierung und dreidimensionale Strukturaufklärung.

5 Literaturverzeichnis

- Ames, J.B., Dizhoor, A.M., Ikura, M., Palczewski, K., Stryer, L. (1999): Three-dimensional Structure of Guanylyl Cyclase Activating Protein-2, a Ca^{2+} -sensitive Modulator of Photoreceptor Guanylyl Cyclases, *J. Biol. Chem.* **274**, 19329-19337
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucl. Acis 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
- Burgoyne, R.D. (2004): The neuronal calcium-sensor proteins, *Biochim. Biophys. Acta* **1742**, 59-68
- Burns, M.E., Baylor, D.A. (2001): Activation, Deactivation, and Adaptation in Vertebrate Photoreceptor Cells, *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 779-805
- Chen, C., Nakatani, K., Koutalos, Y. (2003): Free magnesium concentration in salamander photoreceptor outer segments, *J. Physiol.* **553**, 125-135
- Cook, N.J., Hanke, W., Kaupp, U.B. (1987): Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 585-589
- Cooper, N., Liu, L., Yoshida, A., Pozdnyakov, N., Margulis, A., Sitaramayya, A. (1996): The Bovine Rod Outer Segment Guanylate Cyclase, ROS-GC, Is Present in Both Outer Segment and Synaptic Layers of the Retina, *Journal of Molecular Neuroscience* **6**, 211-222
- Dizhoor, A.M., Lowe, D.G., Olshetskaya, E.V., 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., Olshetskaya, 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., Fik-Rymarkiewicz, E., Venkataraman, V., Krishnan, R., Koch, K.-W., Sharma, R.K. (2005): The Calcium-Sensor Guanylate Cyclase Activating Protein Type 2 Specific Site in Rod Outer Segment Membrane Guanylate Cyclase Type 1, *Biochem.* **44**, 7336-7345
- Duda, T., Goraczniak, R., Surgucheva, I., Rudnicka-Nawrot, M., Gorczyca, W.A., Palczewski, K., Sitaramayya, A., Baehr, W., Sharma, R.K. (1996): Calcium Modulation of Bovine Photoreceptor Guanylate Cyclase, *Biochem.* **35**, 8478-8482
- Duda, T., Jankowska, A., Venkataraman, V., Nagele, R.G., Sharma, R.K. (2001): A Novel Calcium-Regulated Membrane Guanylate Cyclase Transduction System in the Olfactory Neuroepithelium,

- Duda, T., Koch, K.-W., Venkataraman, V., Lange, C., Beyermann, M., Sharma, R.K. (2002): Ca^{2+} sensor S100 β -modulated sites of membrane guanylate cyclase in the photoreceptor-bipolar synapse, *EMBO J.* **21**, 2547-2556
- Duda, T., Sharma, R.K. (2004): S100B-modulated Ca^{2+} -dependent ROS-GC1 transduction machinery in the gustatory epithelium: a new mechanism in gustatory transduction, *FEBS Lett.* **577**, 393-398
- Ermilov, A., Olshevskaya, E.V., Dizhoor, A.M. (2001): Instead of Binding Calcium, One of the EF-hand Structures in Guanylyl Cyclase Activating Protein-2 Is Required for Targeting Photoreceptor Guanylyl Cyclase, *J. Biol. Chem.* **276**, 48143-48148
- Fain, G.L., Matthews, H.R., Cornwall, M.C., Koutalos, Y. (2001) Adaptation in Vertebrate Photoreceptors, *Physiol. Rev.* **81**, 117-151
- 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.* **271**, 8022-8027
- Fung, B.K.-K., Hurley, J.B., Stryer, L. (1981): Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 152-156
- Goraczniak, R.M., Duda, T., Sharma, R.K. (1997): Structural and Functional Characterization of a Second Subfamily Member of the Calcium-Modulated Bovine Rod Outer Segment Membrane Guanylate Cyclase, ROS-GC2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 666-670
- Goraczniak, R.M., Duda, T., Sharma, R.K. (1998): Calcium Modulated Signaling Site in Type 2 Rod Outer Segment Membrane Guanylate Cyclase (ROS-GC2), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **245**, 447-453
- 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., Polans, A.S., Surgucheva, I.G., Subbaraya, I., Baehr, W., Palczewski, K. (1995): Guanylyl Cyclase Activating Protein, *J. Biol. Chem.* **270**, 22029-22036
- Gorczyka, W.A., Gray-Keller, M.P., Detwiler, P.B., Palczewski, K. (1994): Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4014-4018
- Gray-Keller, M.P. Detwiler, P.B. (1994): The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods, *Neuron* **13**, 849-861
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y. (2001): Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein – Mechanisms and applications, *J. Biol. Chem.* **276**, 29188-29194
- Haeseleer, F., Sokal, I., Li, N., Pettenati, M., Rao, N., Bronson, D., Wechter, R., Baehr, W., Palczewski, K. (1999): Molecular Characterization of a Third Member of the Guanylyl Cyclase-activating Protein Subfamily, *J. Biol. Chem.* **274**, 6526-6535

- Hallett, M.A., Delaat, J.L., Arikawa, K., Schlamp, C.L., Kong, F., Williams, D.S. (1996): Distribution of guanylate cyclase within photoreceptor outer segments, *Journal of cell Science* **109**, 1803-1812
- Howes, K.A., Pennesi, M.E., Sokal, I., Church-Kopish, J., Schmidt, B., Margolis, D., Frederick, J.M., Rieke, F., Palczewski, K., Wu, S.M., Detwiler, P.B., Baehr, W. (2002): GCAP1 rescues rod photoreceptor response in GCAP1 / GCAP2 knockout mice, *EMBO J.* **21**, 1545-1554
- Hsu, Y.-T., Molday, R.S. (1994): Interaction of Calmodulin with the Cyclic GMP-gated Channel of Rod Photoreceptor cells, *J. Biol. Chem.* **269**, 29765-29770
- Hubel, D.H. (1988): Eye, brain and vision, *Scientific American Library Series* **22**
- Hughes, R.E., Brzovic, P.S., Dizhoor, A.M., Klevit, R.E., Hurley, J.B. (1998): Ca²⁺-dependent conformational changes in bovine GCAP-2, *Protein Science* **7**, 2675-2680
- Hurley, J.H. (1998): The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 770-777
- Hwang, J.-Y., Koch, K.-W. (2002): Calcium- and Myristoyl-Dependent Properties of Guanylate Cyclase-Activating Protein-1 and Protein-2, *Biochem.* **41**, 13021-13028
- Hwang, J.-Y., Koch, K.-W. (2002): The myristoylation of the neuronal Ca²⁺-sensors guanylate cyclase-activating protein 1 and 2, *Biochim. Biophys. Acta* **1600**, 111-117
- Hwang, J.-Y., Lange, C., Helten, A., Höppner-Heitmann, D., Duda, T., Sharma, R.K., Koch, K.-W. (2003): Regulatory modes of rod outer segment membrane guanylate cyclase differ in catalytic efficiency and Ca²⁺-sensitivity, *Eur. J. Biochem.* **270**, 3814-3821
- Hwang, J.-Y., Schlesinger, R., Koch, K.-W. (2004): Irregular dimerization of guanylate cyclase-activating protein 1 mutants causes loss of target activation, *Eur. J. Biochem.* **271**, 3785-3793
- Hwang, J.-Y., Schlesinger, R., Koch, K.-W. (2001): Calcium-dependent cysteine reactivities in the neuronal calcium sensor guanylate cyclase-activating protein 1, *FEBS Lett.* **508**, 355-359
- Imanishi, Y., Yang, L., Sokal, I., Filipek, S., Palczewski, K., Baehr, W. (2004): Diversity of Guanylate Cyclase-Activating Proteins (GCAPs) in Teleost Fish: Characterization of Three Novel GCAPs (GCAP4, GCAP5, GCAP6) from Zebrafish (*Danio rerio*) and Prediction of Eight GCAPs (GCAP1-8) in Pufferfish (*Fugu rubripes*), *J. Mol. Evol.* **59**, 204-217
- Koch, K.-W. (1991): Purification and Identification of Photoreceptor Guanylate Cyclase, *J. Biol. Chem.* **266**, 8634-8637
- Koch, K.-W., Duda, T., Sharma, R.K. (2002): Photoreceptor specific guanylate cyclases in vertebrate phototransduction, *Mol. Cell. Biochem.* **230**, 97-106
- Koch, K.-W., Stryer, L. (1988): Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions, *Nature* **334**, 64-66

- Körschen, H.G., Beyermann, M., Müller, F., Heck, M., Vantler, M., Koch, K.-W., Kellner, R., Wolfrum, U., Bode, C., Hofmann, K.P., Kaupp, U.B. (1999): Interaction of glutamic-acid-rich proteins with the cGMP signaling pathway in rod photoreceptors, *Nature* **400**, 761-766
- Krishnan, A., Goraczniak, R.M., Duda, T., Sharma, R.K. (1998): Third calcium-modulated rod outer segment membrane guanylate cyclase transduction mechanism, *Mol. Cell. Biochem.* **178**, 251-259
- Krishnan, A., Venkataraman, V., Fik-Rymarkiewicz, E., Duda, T., Sharma, R.K. (2004): Structural, Biochemical, and Functional Characterization of the Calcium Sensor Neurocalcin δ in the Inner Retinal Neurons and Its Linkage with the Rod Outer Segment Membrane Guanylate Cyclase Transduction System, *Biochem.* **43**, 2708-2723
- Krylov, D.M., Hurley, J.B. (2001): Identification of Proximate Regions in a Complex of Retinal Guanylyl Cyclase 1 and Guanylyl Cyclase-activating Protein-1 by a Novel Mass Spectrometry-based Method, *J. Biol. Chem.* **276**, 30648-30654
- Krylov, D.M., Niemi, G.A., Dizhoor, A.M., Hurley, J.B. (1999): Mapping Sites in Guanylyl Cyclase Activating Protein-1 Required for Regulation of Photoreceptor Membrane Guanylyl Cyclase, *J. Biol. Chem.* **274**, 10833-10839
- Kühn, H., Wilden, U. (1987): Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin-kinase and arrestin, *J. Recept. Res.* **7**, 283-298
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685
- Lamb, T.D., Pugh, E.N.jr. (2004): Dark adaptation and the retinoid cycle of vision, *Prog. Retin. Eye Res.* **23**, 307-380[^]
- Lange, C., Duda, T., Beyermann, M., Sharma, R.K., Koch, K.-W. (1999): Regions in vertebrate photoreceptor guanylyl cyclase ROS-GC1 involved in Ca^{2+} -dependent regulation by guanylyl cyclase-activating protein GCAP-1, *FEBS Lett.* **460**, 27-31
- Laura, R.P., Dizhoor, A.M., Hurley, J.B. (1996): The Membrane Guanylyl Cyclase, Retinal Guanylyl Cyclase-1, Is Activated through Its Intracellular Domain, *J. Biol. Chem.* **271**, 11646-11651
- Li, N., Sokal, I., Bronson, J.D., Palczewski, K., Baehr, W. (2001): Identification of Functional Regions of Guanylate Cyclase-Activating Protein 1 (GCAP1) Using GCAP1 / GCIP Chimeras, *Biol. Chem.* **382**, 1179-1188
- Lishko, P.V., Martemyanov, K.A., Hopp, J.A., Arshavsky, V.Y. (2002): Specific Binding of RGS9-G β 5L to Protein Anchor in Photoreceptor Membranes Greatly Enhances Its Catalytic Activity, *J. Biol. Chem.* **277**, 24376-24381
- Liu, X., Senso, 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
- Lolley, R.N., Racz, E. (1982): Calcium modulation of cyclic GMP synthesis in rat visual cells, *Vision. Res.* **22**, 1481-1486

- 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 guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5535-5539
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., Waldman, S.A. (2000): Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP, *Pharmacol. Rev.* **52**, 375-413
- Mendez, A., Burns, M.E., Sokal, I., Dizhoor, A.M., Baehr, W., Palczewski, K., Baylor, D.A., Chen, J. (2001): Role of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in setting the flash sensitivity of rod photoreceptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9948-9953
- Olshevskaya, E.V., Hughes, R.E., Hurley, J.B., Dizhoor, A.M. (1997): Calcium Binding, but Not a Calcium-Myristoyl Switch, Controls the Ability of Guanylyl Cyclase-activating Protein GCAP-2 to Regulate Photoreceptor Guanylyl Cyclase, *J. Biol. Chem.* **272**, 14327-14333
- Olshevskaya, E.V., Boikov, S., Ermilov, A., Krylov, D., Hurley, J.B., Dizhoor, A.M. (1999): Mapping Functional Domains of the Guanylate Cyclase Regulator Protein, GCAP2, *J. Biol. Chem.* **274**, 10823-10832
- Olshevskaya, E.V., Ermilov, A.N., Dizhoor, A.M. (1999): Dimerization of Guanylyl Cyclase-activating Protein and a Mechanism of Photoreceptor Guanylyl Cyclase Activation, *J. Biol. Chem.* **274**, 25583-25587
- Otto-Bruc, A., Buczylo, J., Surgucheva, I., Subbaraya, I., Rudnicka-Nawrot, M., Crabb, J.W., Arendt, A., Hargrave, P.A., Baehr, W., Palczewski, K., (1997): Functional Reconstitution of Photoreceptor Guanylate Cyclase with Native and Mutant Forms of Guanylate Cyclase-Activating Protein 1, *Biochem.* **36**, 4295-4302
- Otto-Bruc, A., Fariss, R.N., Haeseleer, F., Huang, J., Buczylo, J., Surgucheva, I., Baehr, W., Milam, A.H., Palczewski, K. (1997): Localization of guanylate cyclase-activating 2 in mammalian retinal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4727-4732
- Palczewski, K., Sokal, I., Baehr, W. (2004): Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1123-1130
- 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
- Peshenko, I.V., Dizhoor, A.M. (2004): Guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs) are Ca^{2+} / Mg^{2+} Sensors: implications for photoreceptor guanylyl cyclase (RetGC) regulation in mammalian photoreceptors, *J. Biol. Chem.* **279**, 16903-16906
- Peshenko, I.V., Moiseyev, G.P., Olshevskaya, E.V., Dizhoor, A.M. (2004): Factors that Determine Ca^{2+} Sensitivity of Photoreceptor Guanylyl Cyclase. Kinetic Analysis of the Interaction between the Ca^{2+} -Bound and the Ca^{2+} -Free Guanylyl Cyclase Activating Proteins (GCAPs) and Recombinant Photoreceptor Guanylyl Cyclase 1 (RetGC-1), *Biochem.* **43**, 13769-13804
- Pugh Jr, E.N., Nikonov, S., Lamb, T.D. (1999): Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation, *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 410-418

- Sampath, A.P., Matthews, H.R., Cornwall, M.C., Fain, G.L. (1998): Bleached Pigment Produces a Maintained Decrease in Outer Segment Ca^{2+} in Salamander Rods, *J. Gen. Physiol.* **111**, 53-64
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Schnetkamp, P.P., Daemen, F.J. (1982): Isolation and characterization of osmotically sealed bovine rod outer segments, *Methods Enzymol.* **81**, 110-116
- Schrem, A., Lange, C., Beyermann, M., Koch, K.-W. (1999): Identification of a Domain in Guanylyl Cyclase-activating Protein 1 That Interacts with a Complex of Guanylyl Cyclase and Tubulin in Photoreceptors, *J. Biol. Chem.* **274**, 6244-6249.
- Senin, I.I., Koch, K.-W., Philippov, P.P. (2002): Ca^{2+} -dependent control of rhodopsin phosphorylation: recoverin and rhodopsinkinase, *Adv. Exp. Med. Biol.* **514**, 69-99
- Sharma, R.K. (2002): Evolution of the membrane guanylate cyclase transduction system, *Mol. Cell. Biochem.* **230**, 3-30
- Sharma, R.K., Duda, T., Venkataraman, V., Koch, K.-W. (2004): Calcium-modulated mammalian membrane guanylate cyclase ROS-GC transduction machinery in sensory neurons: a universal concept, *Current Topics in Biochemical Research* **6**, 111-143
- 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
- Sokal, I., Haeseleer, F., Arendt, A., Adman, E.T., Hargrave, P.A., Palczewski, K. (1999): Identification of a Guanylyl Cyclase-Activating Protein-Binding Site within the Catalytic Domain of Retinal Guanylyl Cyclase 1, *Biochem.* **38**, 1387-1393
- Sokal, I., Li, N., Klug, C.S., Filipek, S.B., Hubbell, W.L., Baehr, W., Palczewski, K. (2001): Calcium-sensitive Regions of GCAP1 as Observed by Chemical Modifications, Fluorescence, and EPR Spectroscopies, *J. Biol. Chem.* **276**, 43361-43373
- Sokal, I., Otto-Bruc, A.E., Surgucheva, I., Verlinde, C.L.M.J., Wang, C.-K., Baehr, W., Palczewski, K. (1999): Conformational Changes in Guanylyl Cyclase-activating Protein 1 (GCAP1) and Its Tryptophan Mutants as a Function of Calcium Concentration, *J. Biol. Chem.* **274**, 19829-19837
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4353
- Venkataraman, V., Duda, T., Vardi, N., Koch, K.-W., Sharma, R.K. (2003): Calcium-Modulated Cyclase Transduction Machinery in the Photoreceptor-Bipolar Synaptic Region, *Biochem.* **42**, 5640-5648
- Venkataraman, V., Nagele, R., Duda, T., Sharma, R.K. (2000): Rod Outer Segment Membrane Guanylate Cyclase Type 1-Linked Stimulatory and Inhibitory Calcium Signaling Systems in the Pineal Gland: Biochemical, Molecular, and Immunohistochemical Evidence, *Biochem.* **39**, 6042-6052
- Wald, G. (1968): Molecular basis of visual excitation, *Science* **162**, 230-239

- Weitz, D., Zoche, M., Müller, F., Beyermann, M., Körschen, H.G., Kaupp, U.B., Koch, K.-W. (1998): Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an unconventional binding site in the N-terminus of the β -subunit, *EMBO J.* **17**, 2273-2284
- Woodruff, M., Sampath, A.P., Matthews, H.R., Krasnoperova, N.V., Lem, J., Fain, G.L. (2002): Measurement of cytoplasmic calcium concentration in the rods of wild-type and transducin knock-out mice, *J. Physiol. (Lond.)* **542**, 843-854
- 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
- Yang, R.-B., Garbers, D.L. (1997): Two Eye Guanylyl Cyclases Are Expressed in the Same Photoreceptor Cells and Form Homomers in Preference to Heteromers, *J. Biol. Chem.* **272**, 13738-13742
- Yang, R.B., Robinson, S.W., Xiong, W.-H., Yau, K.-W., Birch, D.G., Garbers, D.L. (1999): Disruption of a Retinal Guanylyl Cyclase Gene Leads to Cone-Specific Dystrophy and Paradoxical Rod Behaviour, *J. Neurosci.* **19** (14), 5889-5897
- Yu, H., Olshevskaya, E., Duda, T., Seno, K., Hayashi, F., Sharma, R.K., Dizhoor, A.M., Yamazaki, A. (1999): Activation of Retinal Guanylyl Cyclase-1 by Ca^{2+} -binding Proteins Involves Its Dimerization, *J. Biol. Chem.* **274**, 15547-15555
- Zozula, S., Stryer, L. (1992): Calcium-myristoyl protein switch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11569-11573

AS-Sequenz der GC1

Die AS-Sequenz der GC1 aus dem Rind ist inklusive der *leader*-Sequenz (grau hinterlegt) dargestellt. Somit beträgt die AS-Anzahl der GC1 1110 AS. Die Extrazelluläre Domäne ist cyan, die Transmembranale Domäne grün und die Intrazelluläre Domäne gelb hinterlegt. Die Intrazelluläre Domäne entspricht dem Konstrukt GC1cyt und ist Bestandteil des Konstruktes CitrinGC1cyt. Das Molekulargewicht von GC1cyt beträgt 69,5 kDa und das von CitrinGC1cyt beträgt 97,3 kDa.

	5	10	15	20	25	30																								
1	M	T	A	C	T	F	L	A	G	G	L	R	D	P	G	L	C	G	P	T	R	W	A	P	S	P	P	G	L	P
31	P	I	P	P	R	P	R	L	R	L	R	P	P	L	L	L	L	L	L	L	P	R	S	V	L	S	A	V	F	T
61	V	G	V	L	G	P	W	A	C	D	P	I	F	A	R	A	R	P	D	L	A	A	R	L	A	A	S	R	L	N
91	H	A	A	A	L	E	G	G	P	R	F	E	V	A	L	L	P	E	P	C	R	T	P	G	S	L	G	A	V	S
121	S	A	L	T	R	V	S	G	L	V	G	P	V	N	P	A	A	C	R	P	A	E	L	L	A	Q	E	A	G	V
151	A	L	V	P	W	G	C	P	G	T	R	A	A	G	T	T	A	P	V	V	T	P	A	A	D	A	L	Y	A	L
181	L	R	A	F	R	W	A	H	V	A	L	V	T	A	P	Q	D	L	W	V	E	A	G	H	A	L	S	T	A	L
211	R	A	R	G	L	P	V	A	L	V	T	S	M	E	P	S	D	L	S	G	A	R	E	A	L	R	R	V	Q	D
241	G	P	R	V	R	A	V	I	M	V	M	H	S	V	L	L	G	G	E	E	Q	R	C	L	L	E	A	A	E	E
271	L	G	L	A	D	G	S	L	V	F	L	P	F	D	T	L	H	Y	A	L	S	P	G	P	D	A	L	A	V	L
301	A	N	S	S	Q	L	R	K	A	H	D	A	V	L	T	L	T	R	H	C	P	L	G	G	S	V	R	D	S	L
331	R	R	A	Q	E	H	R	E	L	P	L	D	L	N	L	Q	Q	V	S	P	L	F	G	T	I	Y	D	S	V	F
361	L	L	A	G	G	V	A	R	A	R	V	A	A	G	G	G	W	V	S	G	A	A	V	A	R	H	I	R	D	A
391	R	V	P	G	F	C	G	A	L	G	G	A	E	E	P	S	F	V	L	L	D	T	D	A	T	G	D	Q	L	F
421	A	T	Y	V	L	D	P	T	Q	G	F	F	H	S	A	G	T	P	V	H	F	P	K	G	G	R	G	P	G	P
451	D	P	S	C	W	F	D	P	D	T	I	C	N	G	G	V	E	P	S	V	V	F	I	G	F	L	L	V	V	G
481	M	G	L	A	G	A	F	L	A	H	Y	C	R	H	R	L	L	H	I	Q	M	V	S	G	P	N	K	I	I	L
511	T	L	D	D	I	T	F	L	H	P	H	G	G	N	S	R	K	V	A	Q	G	S	R	T	S	L	A	A	R	S
541	I	S	D	V	R	S	I	H	S	Q	L	P	D	Y	T	N	I	G	L	Y	E	G	D	W	V	W	L	K	K	F
571	P	G	D	R	H	I	A	I	R	P	A	T	K	M	A	F	S	K	I	R	E	L	R	H	E	N	V	A	L	Y
601	L	G	L	F	L	A	G	G	A	G	G	P	A	A	P	G	E	G	V	L	A	V	V	S	E	H	C	A	R	G
631	S	L	Q	D	L	L	A	Q	R	D	I	K	L	D	W	M	F	K	S	S	L	L	L	D	L	I	K	G	I	R
661	Y	L	H	H	R	G	V	A	H	G	R	L	K	S	R	N	C	V	V	D	G	R	F	V	L	K	V	T	D	H
691	G	H	G	R	L	L	E	A	Q	R	V	L	P	E	P	P	S	A	E	D	Q	L	W	T	A	P	E	L	L	R
721	D	P	V	L	E	R	R	G	T	L	A	G	D	V	F	S	L	G	I	I	M	Q	E	V	V	C	R	S	A	P
751	Y	A	M	L	E	L	T	P	E	E	V	V	K	R	V	Q	S	P	P	P	L	C	R	P	S	V	S	I	D	Q
781	A	P	M	E	C	I	Q	L	M	K	Q	C	W	A	E	Q	P	E	L	R	P	S	M	D	R	T	F	E	L	F
811	K	S	I	N	K	G	R	K	M	N	I	I	D	S	M	L	R	M	L	E	Q	Y	S	S	N	L	E	D	L	I
841	R	E	R	T	E	E	L	E	L	E	K	Q	K	T	D	R	L	L	T	Q	M	L	P	P	S	V	A	E	A	L
871	K	M	G	T	P	V	E	P	E	Y	F	E	E	V	T	L	Y	F	S	D	I	V	G	F	T	T	I	S	A	M
901	S	E	P	I	E	V	V	D	L	L	N	D	L	Y	T	L	F	D	A	I	I	G	S	H	D	V	Y	K	V	E
931	T	I	G	D	A	Y	M	V	A	S	G	L	P	Q	R	N	G	H	R	H	A	A	E	I	A	N	M	A	L	D
961	I	L	S	A	V	G	T	F	R	M	R	H	M	P	E	V	P	V	R	I	R	I	G	L	H	S	G	P	C	V
991	A	G	V	V	G	L	T	M	P	R	Y	C	L	F	G	D	T	V	N	T	A	S	A	M	E	S	T	G	L	P
1021	Y	R	I	H	V	N	R	S	T	V	Q	I	L	S	A	L	N	E	G	F	L	T	E	V	R	G	R	T	E	L
1051	K	G	K	G	A	E	E	T	Y	W	L	V	G	R	R	G	F	N	K	P	I	P	K	P	P	D	L	Q	P	G
1081	A	S	N	H	G	I	S	L	H	E	I	P	P	D	R	R	Q	K	L	E	K	A	R	P	G	Q	F	S	G	K

Vergleich der AS-Sequenzen von GCAP1 und GCAP2 aus dem Rind

Der AS-Vergleich wurde mit dem Programm CLUSTAL / "PC/Gene" (A. Baroch, Universität Genf, V.6.7) durchgeführt. Identische AS werden durch einen Stern (*), ähnliche AS durch einen Punkt (·) symbolisiert. Die Sequenzidentität beträgt 39 % und 31 % der AS sind ähnlich. Die Cystein-Reste sind grau hinterlegt.

GCAP1	MGNIM-----DGKSVEELSSTEC [■] HQWYKKFMTE [■] CPSGQLTYEFRQFFG	44
GCAP2	MGQQFSWEEAEENGAVGAADAAQLQEWYKKFLEE [■] CPSGTLFMHEFKRFFK	50
	** * * * *	
GCAP1	LKNLSPWASQYVEQMFETFDENKDGIDFMFYVAALSLVLKGVKQKLRW	94
GCAP2	VPDNEE-ATQYVEAMFRAFDTNGDNTIDFLEYVAALNLVLRGTLEHKLKW	99
	. . . * * * * *	
GCAP1	YFKLYDVDGNGC [■] IDRDELLTIIRAI-RAINPC [■] S-----DSTMTAEFF	135
GCAP2	TFKIYDKDRNGC [■] IDRQELLDIVESIYKLLKAC [■] SVEVEAEQQGKLLTPEEV	149
	** . . . * * * * *	
GCAP1	TDTVFSKIDVNGDGELSLEEFMEGVQKDQMLLDLTLTRSLDLTRIVRRLQN	185
GCAP2	VDRIFLLVDENGDGQLSLNEFVEGARRDKWVMKMLQMDLNPSSWISQRR	199
	. * . * . * * * * *	
GCAP1	GEQDEEGASGRETEAAEADG	205
GCAP2	-----KSAMF	204
	. *	

DNA-Sequenz von GCAP2 mit Mutagenese-Primern

Der Sequenzvergleich zwischen GCAP2 und Mutagenese-Primern wurde mit dem Programm PCSUPP (Dr. Wolfgang Bönigk) erstellt. Von der Originalsequenz abweichende Basen sind grau hinterlegt.

```

1  ATGGGGCAGCAGTTCAGCTGGGAGGAGGCGGAGGAGAACGGCGCAGTCGGTTCGGCGGGAC
   TACCCCGTCGTCAAGTCGACCCTCCTCCGCCTCCTCTTGCCGCGTCAGCCACGCCGCCTG

                                     5'-GGAGGAGgcaCCCAGCGGC-3' (3410)
61  GCGGCGCAGCTTCAAGAGTGGTACAAGAAGTTCCTGGAGGAGTGCCCCAGCGGCACGCTC
   CGCCGCGTCGAAGTTCTCACCATGTTCTTCAAGGACCTCCTCACGGGGTCGCCGTGCGAG
                                     3'-GGACCTCCTCcgTGGGTCG-5' (3411)

121 TTCATGCACGAGTTC AAGCGCTTCTTCAAGGTCCCGGACAACGAGGAGGCCACCCAATAC
   AAGTACGTGCTCAAGTTCGCGAAGAAGTTCAGGGCCTGTTGCTCCTCCGGTGGGTATG

181 GTAGAGGCCATGTTCCGAGCCTTCGACACGAATGGGGACAACACCATTGACTTCCTGGAG
   CATCTCCGGTACAAGGCTCGGAAGCTGTGCTTACCCCTGTTGTGGTAACTGAAGGACCTC

241 TACGTGGCAGCCCTGAACCTTGTGCTGAGGGGCACCCTGGAGCACAAGCTCAAGTGGACC
   ATGCACCGTCGGGACTTGGAACACGACTCCCCGTGGGACCTCGTGTTCGAGTTCACCTGG

                                     5'-GCAATGGCgcCATCGACCGCC-3' (3412)
301 TTCAAGATCTACGACAAGGACCGCAATGGCTGCATCGACCGCCAGGAGCTGCTGGACATC
   AAGTCTAGATGCTGTTCCCTGGCGTTACCGACGTAGCTGGCGGTCCCTCGACGACCTGTAG
                                     3'-GGCGTTACCGcgGTAGCTGG-5' (3413)

                                     5'-GAAAGCCgcCAGTGTGGAGG-3' (3414)
361 GTGGAGTCCATCTACAAGCTGAAGAAAGCCTGCAGTGTGGAGGTGGAGGCCGAGCAGCAG
   CACCTCAGGTAGATGTTTCGACTTCTTTTCGGACGTACACCTCCACCTCCGGCTCGTCGTC
                                     3'-GACTTCTTTTCGGcgGTACAC-5' (3415)

421 GGCAAGCTGCTCACCCCGAGGAGTTCGTGGACAGGATCTTCCTTCTGGTGGATGAAAAT
   CCGTTCGACGAGTGGGGCTCCTCCAGCACCTGTCTTAGAAGGAAGACCACCTACTTTTA

481 GGAGATGGTCAGCTGTCCCTGAATGAGTTCGTTGAAGGTGCCCGTCGTGACAAGTGGGTG
   CCTTACCAGTCGACAGGGACTTACTCAAGCAACTTCCACGGGCAGCACTGTTACCCAC

541 ATGAAGATGCTGCAGATGGATCTGAACCCAGTAGCTGGATCTCTCAGCAGAGGCGGAAA
   TACTTCTACGACGTCTACCTAGACTTGGGGTCATCGACCTAGAGAGTCGTCTCCGCCTTT

601 AGTGCCATGTTCTGA
   TCACGGTACAAGACT

```

Vergleich der AS-Sequenzen von eYFP und Citrin

Der AS-Vergleich wurde von dem Programm CLUSTAL / "PC/Gene" (A. Baroch, Universität Genf, V.6.7) durchgeführt. Identische AS werden durch einen Stern (*), ähnliche AS durch einen Punkt (·) symbolisiert. Das Citrin unterscheidet sich von EYFP durch den AS-Austausch Q⁷⁰M (grau hervorgehoben). Die Fluoreszenz des Citrins wird durch Chlorid nicht beeinflusst und liegt doppelt so hoch wie die Fluoreszenz des eYFP. Das Molekulargewicht beider Proteine beträgt 27,8 kDa.

EYFP	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICT	50
CITRIN	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTTLKFICT	50

EYFP	TGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF	100
CITRIN	TGKLPVPWPTLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF	100

EYFP	FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHN	150
CITRIN	FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHN	150

EYFP	VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH	200
CITRIN	VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH	200

EYFP	YLSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK	239
CITRIN	YLSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK	239

DANKE

Diese Dissertation wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-1), Forschungszentrum Jülich, angefertigt.

Ich danke allen, die am reibungslosen Ablauf des Institutslebens beteiligt waren. Besonders danke ich folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. K.-W. Koch für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. W. Klein für die Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität Köln.

Herrn Prof. Dr. U. B. Kaupp für die Möglichkeit, diese Arbeit am IBI-1 anzufertigen.

Frau D. Höppner-Heitmann für die Hilfe im Labor, für die Präparation der ROS und für die seelische Unterstützung nach Niederlagen unseres Fußballvereins.

Frau A. Eckert für die unermüdliche Hilfe beim Ausfüllen von Formularen, ständiges Geldwechseln und überhaupt.

Herrn Dr. W. Bönigk und Herrn PD Dr. A. Baumann für die molekularbiologische Unterstützung.

Herrn Dr. T. Gensch für die Hilfe bei Fluoreszenzmessungen.

Frau M. Bruns für die Hilfe in der Zellkultur.

Herrn Rudi Esser für all die Dinge, die nur auffallen, wenn sie nicht getan werden.

Herrn D. Grammig für die Lösung diverser Computerprobleme.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch betreut worden.

(Andreas Helten)

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4213
April 2006
ISSN 0944-2952