



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Institut für Neurobiologie

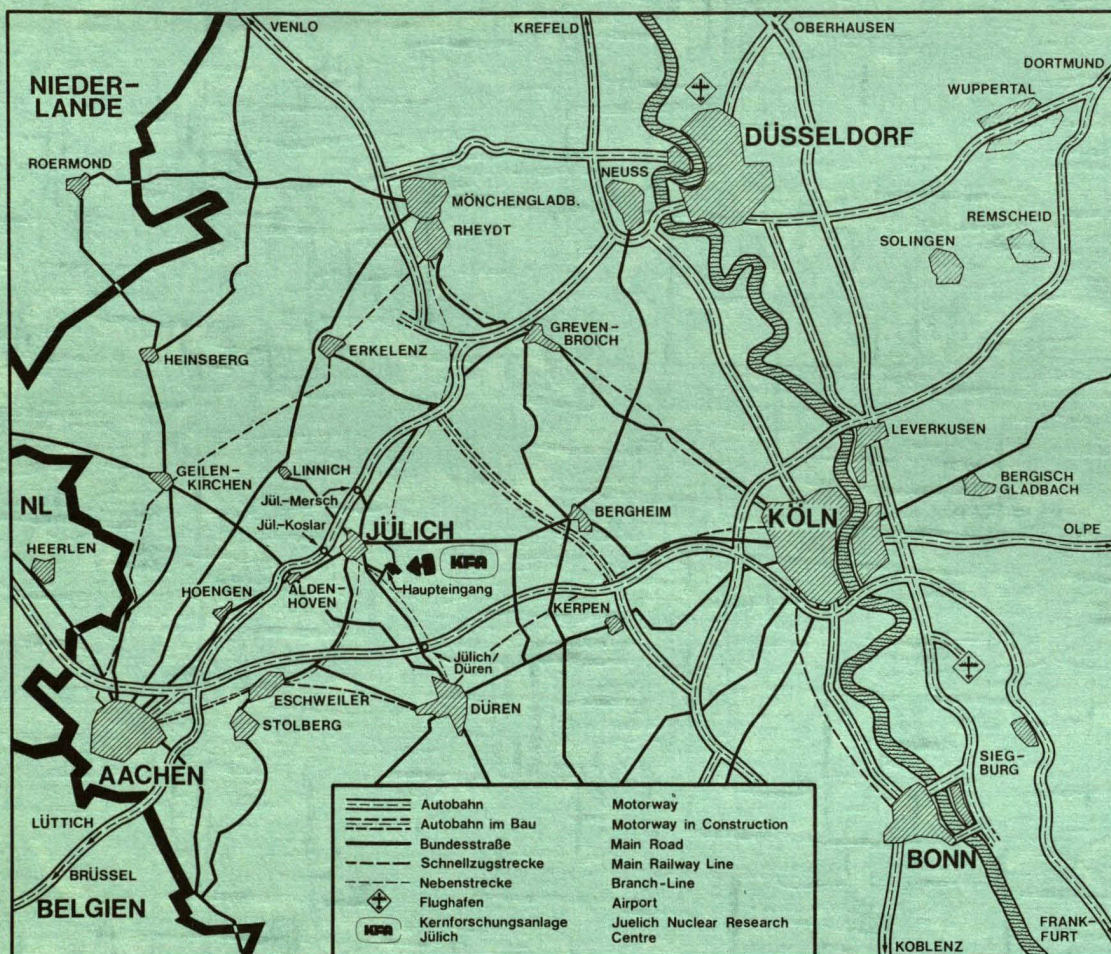
**Experimente zur lichtabhängigen
Rhodopsin-Phosphorylierung
an Stäbchenaußensegment-Suspensionen**

von

U. Wilden

**Jül - 1741
September 1981**

ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1741

Institut für Neurobiologie Jül - 1741

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
Telefon: 02461/610 · Telex: 833556 kfa d



Experimente zur lichtabhängigen Rhodopsin-Phosphorylierung an Stäbchenaußensegment-Suspensionen

von
U. Wilden

D 82 (Diss. T.H. Aachen)

Reg. 160450
Zugangs-Nr. _____

**Experimente zur lichtabhängigen
Rhodopsin-Phosphorylierung
an Stäbchenaußensegment-Suspensionen**

von
U. Wilden

D 82 (Diss. T.H. Aachen)

Summary

1. The light-dependent phosphorylation of frog and bovine rhodopsin was investigated under different conditions with suspensions of isolated rod outer segments. For both frog and bovine rhodopsin the average phosphorylation extent was found to be as high as $7,0 \pm 0,3$ mol phosphate per mol rhodopsin under optimal incubation conditions. The same result has been obtained with two independent methods of analysis.

2. Phosphorylated rhodopsin has been separated into rhodopsin fractions of different phosphorylation extents by means of ion exchange chromatography, in order to get information about the distribution of phosphorylation extents on different rhodopsin molecules within a population of known average phosphorylation extent. The distribution was found to be rather inhomogeneous. Rhodopsin samples of all average phosphorylation extents between 1 and 7 mol phosphate per mol rhodopsin were found to be mixtures of differently phosphorylated rhodopsins and unphosphorylated rhodopsin. Even at the maximum average phosphorylation extent of 7 mol phosphate per mol rhodopsin 2-3 % of the rhodopsin remains unphosphorylated. It is shown that individual rhodopsin molecules are able to incorporate up to 9 phosphate residues. There is evidence for the existence of rhodopsin molecules of all phosphorylation extents between 0 and 9 mol phosphate per mol of rhodopsin.

3. I have tried to find out if under more physiological conditions the initial velocity of phosphorylation is as slow as after bleaching of 100 % of the rhodopsin. The time course of phosphorylation is shown to be much faster with bleaching of only 13-23 % of rhodopsin; addition of kinase containing extract also accelerates the rate of phosphorylation.

4. Dephosphorylation experiments led to a release of about 60 % of the phosphate incorporated.

A possible role of rhodopsin phosphorylation in the regulation of light-dependent enzyme reactions is discussed.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
2.	Material und Methoden	10
2.1	Versuchsobjekt	10
2.2	ROS-Präparation	10
2.2.1	Methode für Rinder-ROS	10
2.2.2	Methode für Frosch-ROS	11
2.2.3	Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration	11
2.2.4	Kinase Extraktion	12
2.3	Phosphorylierung	12
2.3.1	Ansetzen nicht radioaktiver ATP-Stammlösungen	12
2.3.2	Ansetzen der $AT^{32}P$ -Lösung und Berechnung der spezifischen Aktivität	12
2.3.3	Vorbehandlung der ROS-Probe	13
2.3.4	Inkubation mit $AT^{32}P$	13
2.3.4.1	Sammelinkubation	13
2.3.4.2	Einzelinkubation	14
2.3.5	Waschen der TCA-gefällten ROS-Proben	14
2.3.6	Auswertung (Bestimmung des P.-Grades)	14
2.4	Regeneration mit 11-cis-Retinal	15
2.5	Affinitäts-chromatographische Reinigung von Rhodopsin auf der Concanavalin-A-Sepharose-Säule	16
2.5.1	Prinzip	16
2.5.2	Vorbereitung der Säule	16
2.5.3	Vorbereiten und Auftragen der Rhodopsin-Probe	16
2.5.4	Elution des Rhodopsins von der Säule	17
2.6	Ionenaustauscher-Chromatographie auf Ecteola-Cellulose-Säulen	17
2.6.1	Prinzip	17
2.6.2	Vorbereitung der Ecteola-Säulen	17
2.6.3	Auftrennung verschieden hoch phosphorylierter Rhodopsine auf der Ecteola-Säule	18
2.6.4	Die Ecteola-Säulen-Kaskade	18
2.7	Phosphat-Test	20

3.	Ergebnisse	22
3.1	Durchschnittlicher P.-Grad in Rinder-ROS-Suspensionen	22
3.1.1	P.-Grad und Zeitverlauf der Phosphorylierung unter optimalen Bedingungen	22
3.1.2	Der Einfluß der Lagerungszeit von $AT^{32}P$ auf den gemessenen scheinbaren P.-Grad	24
3.1.3	Versuche zur Klärung der Frage, ob ROS-Präparationen von nicht dunkeladaptierten Rinderaugen nennenswerte Mengen an Opsin enthalten	27
3.1.3.1	Vergleich des P.-Grades einer "normalen" ROS-Präparation mit dem einer dunkeladaptierten Präparation	27
3.1.3.2	Untersuchung von Rinder-Rhodopsin-Lösungen in Detergens auf Opsin-Gehalt mit Hilfe der Ammoniumsulfat-Fällung	29
3.1.3.3	Suche nach Opsin-Anteilen in ROS-Präparationen durch Regenerationsversuche mit 11-cis-Retinal	30
3.1.3.4	Concanavalin-A-Sepharose-Säule mit teilweise gebleichtem Rhodopsin	30
3.2	Einfluß verschiedener Reaktions-Bedingungen auf die Phosphorylierung von Rinder-Rhodopsin	32
3.2.1	Der Einfluß einer Prä-Inkubation bei $30^{\circ}C$ auf die Phosphorylierbarkeit	32
3.2.2	Der Einfluß der ATP-Konzentration	33
3.2.3	Der Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration	34
3.2.4	Der Einfluß von Na^{+} und K^{+}	34
3.2.5	Verlauf der Phosphorylierung mit GTP	35
3.2.6	Die Phosphorylierung mit Orange-Licht	37
3.3	Auftrennung nach verschiedenen P.-Graden	38
3.4	Versuche zur Phosphorylierungsgeschwindigkeit unter physiologischeren Bedingungen	50
3.4.1	Der Zeitverlauf der Phosphorylierung bei kleinen (13-23 %) Bleichungen	50

3.4.2	Der Zeitverlauf der Phosphorylierung unter Kinase-Anreicherung	51
3.4.3	Phosphorylierungsversuche mit Frosch- Rhodopsin	53
3.5	Dephosphorylierungsversuche	55
3.5.1	Dephosphorylierungsversuche mit Rinder- Rhodopsin	55
3.5.2	Dephosphorylierungsversuche mit Frosch- Rhodopsin	56
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	68
6.	Literaturverzeichnis	69

Häufig gebrauchte Abkürzungen

ROS	= Stäbchenaußensegment (<u>R</u> od <u>O</u> uter <u>S</u> egment)
P.-Grad	= Phosphorylierungsgrad
P/Rh	= mol Phosphat pro mol Rhodopsin
P _i	= anorganisches Phosphat
P _i -Test	= Test zur quantitativen Bestimmung anorganischen Phosphats
E280/500	= $\frac{\text{Extinktion bei 280 nm}}{\text{Extinktion bei 500 nm}}$
NaPP	= Natriumphosphat
KPP	= Kaliumphosphat

1. EINLEITUNG

Für die Photorezeption stehen den Vertebraten zwei Typen von Rezeptorzellen zur Verfügung, die Stäbchen und die Zapfen. Zum Sehen bei relativ geringen Lichtintensitäten (Dämmerungssehen = scotopisches Sehen) dienen die sog. Stäbchen (engl. rods). Die Zapfen (engl. cones) sprechen nur auf höhere Lichtintensitäten an, sie ermöglichen das Farbsehen.

Beide Rezeptortypen stammen entwicklungsgeschichtlich vom Cilium ab. Sie zeigen im Aufbau große Ähnlichkeit miteinander. Beide bestehen aus einem Außensegment, das die Sehfarbstoffe (Rhodopsine) enthält, aus einem Innensegment mit sehr vielen Mitochondrien, in dem sich der größte Teil des Metabolismus der Zelle abspielt, und aus dem Teil der Zelle mit dem Zellkern und einem Nervenfortsatz, der die Photorezeptorzelle über eine Synapse mit den nachgeschalteten Neuronen verbindet.

Das Außensegment des Stäbchens, der eigentliche Ort der Photorezeption bei Dämmerungssehen, besteht je nach Tierart aus einigen Hundert bis einigen Tausend übereinandergestapelter flacher Membransäckchen, den Disks. In diese Diskmembranen eingelagert findet sich das Sehpigment des Stäbchenaußensegments, das Rhodopsin. Umgeben ist der Diskstapel von der äußeren Zellmembran, der Plasmamembran, die ebenfalls Rhodopsin enthält (Jan und Revel, 1975).

Im Gegensatz zu den Zapfen haben die Disks der Stäbchen zum größten Teil keine strukturelle Verbindung mit der Plasmamembran (Cohen 1970). Nur an der Basis des Stäbchenaußensegments, kurz oberhalb der dünnen Verbindungsstelle zwischen Außen- und Innensegment (dem Cilium), stehen die Disks noch in kontinuierlicher Verbindung mit der Plasmamembran, aus der sie, wie allgemein angenommen wird, durch Einfaltung und spätere Abschnürung entstehen.

Jeder neugebildete Disk wandert im Stäbchenaußensegment allmählich von der Basis zur Spitze, wo er vom Pigmentepithel phagozytiert und abgebaut wird. Die Lebenszeit eines Disks, also die Zeit von der Bildung bis zum Abbau, hängt teilweise von den Beleuchtungsverhältnissen ab (Hollyfield und Rayborn, 1979).

Bei normalem Hell- Dunkel-Rhythmus beträgt sie bei Säugern etwa 1-2 Wochen, bei Amphibien 1-2 Monate (Poer und Bitensky, 1979). In dieser Zeit wird also der gesamte Disk- und damit Rhodopsin-Bestand des Stäbchenaußensegments (im folgenden abgekürzt: ROS) einmal umgesetzt.

Die äußeren Abmessungen der ROS sind bei den einzelnen Tierarten recht unterschiedlich, z. B. $1\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$ beim Rind, aber ca. $6\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$ beim Frosch (Schnetkamp 1980, Liebman und Entine, 1968), während der periodische Disk-Abstand überall gleich ist und $300\text{ }\text{\AA}$ beträgt. Davon entfallen auf die Disk-Membran $2 \times 65\text{ }\text{\AA}$, auf den intradiskalen Raum $20\text{ }\text{\AA}$ und auf den cytoplasmatischen Raum zwischen 2 Disks $150\text{ }\text{\AA}$ (Chabre and Cavaggioni, 1975). Ein Rinder-ROS enthält demnach etwa 700 Disks, errechnet aus den Abmessungen. Die "center to center distance" des Rhodopsins in der Disk-Membran beträgt etwa $56\text{ }\text{\AA}$ (Montal 1979).

Die Plasmamembran der ROS besitzt im Dunkeln eine hohe Permeabilität für Na^+ . Im Dunkeln besteht ein ständiger Einstrom von Na^+ -Ionen aus dem interzellulären Raum durch die Plasmamembran in das Außensegment, von hier strömt das Na^+ in das Innensegment, wo es aktiv unter ATP-Verbrauch wieder nach außen gepumpt wird (Hagins et al, 1970, Penn und Hagins, 1972). Durch diesen ständigen Kreislauf, der aufrechterhalten wird durch das Na^+ -Konzentrations-Gefälle über der Plasmamembran und durch die Na^+ -Pumpe im Innensegment, wird das Potential der ROS-Membran bei Dunkelheit ständig bei etwa 20 mV gehalten, innen negativ gegen außen (Stieve 1976). Als Antwort auf einen Lichtreiz nimmt die Permeabilität der Plasmamembran für Na^+ vorübergehend ab. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der ROS-Plasmamembran (Tomita 1970, Toyoda et al, 1970) und setzt sich fort in eine Erregung der gesamten Sehzelle bis hin zur Synapse, die das Signal der Lichtabsorption an die nachgeschalteten Neuronen weiterleitet.

Nun erhebt sich eine Schwierigkeit. Der Ort der Lichtabsorption ist das Rhodopsin, und dieses ist zu mindestens 97 % nicht in der Plasmamembran enthalten, sondern in der Diskmembran, die mit der Plasmamembran nicht direkt verbunden ist. Das Rhodopsin ist ein Chromoprotein, dessen Chromophor, das 11-cis-Retinal,

kovalent über eine Schiff'sche Base gebunden ist. Nach Absorption eines Photons durchläuft Rhodopsin eine Kaskade von Reaktionen, an deren Anfang die Isomerisation des 11-cis-Retinals zu all-trans-Retinal und an deren Ende die Abspaltung des all-trans-Retinals vom Proteinanteil, dem Opsin, steht.

Die Kette der Ereignisse, die vom lichtbedingten Zerfall des Rhodopsins in der Diskmembran zur Schließung von Na^+ -Kanälen in der Plasmamembran führt, ist noch weitgehend unverstanden und Gegenstand intensiver Forschungen. Es wird allgemein davon ausgegangen, daß ein diffusibler Transmitter existieren muß, der das Signal vom Ort der Photonenabsorption (Diskmembran) zum Ort der elektrischen Antwort (Plasmamembran) überträgt. Da im voll dunkeladaptierten Zustand ein einziges absorbiertes Photon pro ROS ausreicht, um den Na^+ -Einstrom um etwa 1 % zu verringern (Penn und Hagins, 1972), und da ein ROS schätzungsweise 1000 Na^+ -Kanäle besitzt (Hubbel und Bownds, 1979, Review), müssen pro gebleichtes Rhodopsin ca. 10 Na^+ -Kanäle geschlossen werden können. Um das zu erreichen, sollten bei sehr kleinen Bleichungen für jedes gebleichte Rhodopsin mindestens 10^3 Transmitter-Moleküle ins Cytoplasma entlassen werden.

Ein weiteres unverstandenes Phänomen ist die Licht- Dunkel-Adaptation auf Photorezeptor-Ebene. Nur bei sehr niedrigen Bleichungsraten steigt die Rezeptorantwort linear mit der Lichtintensität. Bei steigenden Bleichungsraten wird der Zuwachs der Rezeptorantwort immer geringer, bis die Antwort bei ca. 10^4 absorbierten Photonen/ROS/sec schließlich sättigt (Fain 1976, Lipton et al, 1977). Je intensiver eine konstant gehaltene Hintergrundbeleuchtung ist, umso geringer wird die Antwort der Zelle auf einen bestimmten zusätzlich gegebenen Reiz, bis schließlich, bei sättigender Hintergrundbeleuchtung, die Reizantwort ganz verschwindet. Anschließend ins Dunkle gebracht, gewinnt die Zelle ihre Lichtempfindlichkeit langsam zurück. Ein geringer Anteil dieser Dunkeladaptation ist auf Regeneration des ausgebleichten Rhodopsins zurückzuführen. Aber auch ohne Regeneration findet eine weitgehende Erholung der elektrischen Antwort statt (vorausgesetzt, die Bleichung war nicht 100 %ig), deren Mechanismus noch ungeklärt ist.

Andererseits sind eine Reihe von lichtabhängigen biochemischen Reaktionen im Stäbchenaußensegment bekannt. Von diesen Reaktionen wird angenommen, daß sie mit den beiden primären Funktionen der Photorezeptorzelle, der Erregbarkeit und der Adaptation, auf noch weitgehend ungeklärte Weise in Verbindung stehen. Möglicherweise sind einige dieser Reaktionen Teil der Brücke zwischen Photonenabsorption und Erregung.

Eine dieser biochemischen Reaktionen ist die lichtinduzierte Phosphorylierung des Rhodopsins, bei der die γ -Phosphat-Gruppe von ATP an einen Threonin - bzw. Serin-Rest des Rhodopsins kovalent gebunden wird (Kühn 1972). Diese Phosphat-Ester-Bindung ist sehr stabil, sie überdauert selbst saure Hydrolyse des Rhodopsins. Das Phosphat-übertragende Enzym, die Rhodopsin-Kinase, ist im Dunkeln löslich, während sie bei Belichtung an die Membran gebunden wird (Kühn 1978). Die Kinase-Aktivität selbst ist lichtunabhängig, aber ihr Substrat, Rhodopsin, kann nur durch Bleichung "aktiviert", d. h. der Phosphorylierung zugänglich gemacht werden (Kühn et al, 1973, McDowell und Kühn, 1977). Wenn das Rhodopsin einmal gebleicht ist, läuft die Phosphorylierung auch im Dunkeln weiter. Die Reaktion ist Mg^{+} -abhängig.

In vivo folgt der lichtinduzierten Phosphorylierung bei genügend langer anschließender Dunkelinkubation eine vollständige Dephosphorylierung (Kühn 1974). Nach dem Zeitverlauf der Phosphorylierung in vitro zu schließen, scheint die Reaktion zu langsam zu sein, um mit der Erregungsbildung selbst etwas zu tun zu haben. Vor allem auf Grund des Zeitverlaufs vermuteten deshalb einige Autoren (Kühn und Bader, 1976, Miller et al, 1975), daß sie an der Lichtadaptation beteiligt sein könnte. Dagegen könnte man einwenden, daß die Phosphorylierung selbst eine Dunkelreaktion ist und nach Abschalten der Lichtquelle noch einige min lang weitergeht, was man von der Lichtadaptation eigentlich nicht erwarten würde (Kühn et al, 1977).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsbedingungen in vitro möglichst genau zu studieren, festzustellen, bis zu welchem Grade Rhodopsin phosphorylierbar ist und wieviele Phosphatbindungsstellen das

einzelne Rhodopsin-Molekül hat. Ferner sollte untersucht werden, ob am phosphorylierten Molekül immer alle Phosphatbindungsstellen besetzt sind, oder ob es auch Zwischenstufen der Phosphorylierung gibt. Eine weitere Fragestellung war, ob die Phosphorylierung unter allen Umständen so langsam verläuft wie bisher gemessen, oder ob sich (möglichst physiologische) Bedingungen finden lassen, unter denen die Reaktion schneller abläuft.

Mit diesem Wissen sollte eine Grundlage geschaffen werden für weiterführende Versuche, in denen nach einem möglichen Zusammenhang des Phosphorylierungs-Zustandes des Rhodopsins mit anderen lichtabhängigen Reaktionen geforscht werden soll. Vielleicht ist es möglich, auf diese Weise zu einem Verständnis der physiologischen Rolle der Phosphorylierung zu gelangen. Damit könnte man evtl. auch dem Verständnis des Sehvorganges auf molekularer Basis einen kleinen Schritt näherkommen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsobjekt

Für die meisten Versuche wurden Rinderaugen benutzt. Die Augen wurden gleich nach dem Schlachten der Tiere den Augenhöhlen entnommen, in einem Dunkelkasten auf Eis gesammelt und so schnell wie möglich ins Labor transportiert, wo sie sofort nach Eintreffen weiter verarbeitet wurden. Für einige Versuche wurden die Rinder auch vorher dunkel adaptiert; d. h. für mindestens eine Stunde bis zum Schlachten wurden ihnen die Augen mit einer schwarzen Binde verbunden. Für eine ROS-Präparation wurden etwa 100 - 180 Augen verbraucht.

Einige Versuche wurden auch an Frosch-ROS (*Rana esculenta*) durchgeführt. Die Tiere wurden jeweils im Herbst und im Frühjahr von einer süddeutschen Firma bezogen und verblieben bis zu ihrer Verwendung in der Tierhaltung des Instituts. Die Frösche wurden vor ihrer Verwendung mindestens zwei Stunden lang in einem lichtdichten Kasten dunkeladaptiert.

2.2 ROS-Präparation

2.2.1. Methode für Rinder-ROS

Alle Arbeiten wurden bei schwachem Rotlicht bei 0°C durchgeführt (Eisbad). Die Retinen wurden aus den Augen entnommen und in einem Erlenmeyerkolben mit 45 %iger Sucroslösung gesammelt. Die Sucroslösung wurde auf etwa 1 ml pro Retina aufgefüllt und 1 min lang von Hand kräftig geschüttelt. Dabei brechen die Stäbchenaußensegmente von der Retina ab, zum größten Teil an der dünnen Übergangsstelle vom Innen- zum Außensegment (dem Cilium) oder ein Stückchen weiter außen. Nach Abzentrifugieren der groben Gewebereste in Zuckerlösung (5 min bei 5000 U/min in einer Beckman-Zentrifuge) wurde die Suspension mit dem gleichen Volumen 70 mM NaPP-Puffer verdünnt, auf Zentrifugenröhrchen verteilt, mit je ca. 5 ml Sucroslösung ($d = 1,10$) unterschichtet und erneut 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Durch die Unterlage aus $d = 1,10$ Sucroslösung wurden die Pellets weniger fest und ließen sich ohne Homogenisieren, durch schonendes Schwenken mit der Hand wieder in Sucroslösung ($d = 1,10$) suspendieren. Die vereinigten Suspensionen wurden auf einen Dichtegradienten (3-Stufen Sucrose-Gradient) aufgeschichtet und 60 min bei 21000 U/min zentrifugiert. Der Puffer und sämtliche Sucroslösungen enthielten 70 mM Na-Phosphat (pH7), 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol. Die Bande an der Grenzschicht $d_{1,11}/d_{1,13}$ (= ROS-Bande) wurde dem Gradienten mit einer Spritze entnommen, 2-fach mit Puffer verdünnt, gleichmäßig auf 6-12 Röhrchen verteilt und 20 min bei 21000 U/min zentrifugiert. Der Über-

stand wurde möglichst quantitativ entfernt, jedes Pellet 1-2 min mit Argon überspült und die Röhrchen mit Schraubdeckel luftdicht verschlossen. Alle Röhrchen wurden einzeln in Aluminiumfolie verpackt und bis zur Verwendung bei -70°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Die gesamte Prozedur vom Schlachten der ersten Tiere bis zum Einfrieren der ROS-Suspension dauerte etwa 10 Std. Die Ausbeute an Rhodopsin lag im Durchschnitt bei 0,4 - 0,6 mg pro Auge.

2.2.2 Methode für Frosch-ROS

Alle Arbeiten wurden bei schwachem Rotlicht durchgeführt. Die dunkel-adaptierten Frösche wurden decapitiert und die Augen dem Schädeldach entnommen. Die Retinen wurden aus dem Augenbecher herauspräpariert und in NaPP-Puffer oder Hepes-Ringer gesammelt. Anschließend wurden die Retinen in Puffer (0,2 ml pro Retina) 1 min auf einem Heidolph-Schüttler geschüttelt. Dabei brechen die ROS von der Retina ab. Die groben Gewebereste wurden über einem Nylonnetz mit einer Maschenweite von $60\text{ }\mu\text{m}$ abfiltriert. Das Filtrat wurde in einer Tischzentrifuge bei 3000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1-2 ml Puffer oder Ringer aufgenommen. Diese ungereinigte ROS-Suspension wurde ohne weitere Behandlung für Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Experimente gebraucht. Die Inkubationsbedingungen für diese Versuche waren die gleichen wie für Rinder-ROS beschrieben, nur daß die Inkubationstemperatur hier nicht bei 30°C , sondern bei 20°C lag.

Benutzte Lösungen: 1. NaPP-Puffer: 70 mM Na-Phosphat pH 7,2 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol. 2. Hepes-Ringer: 115 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes, pH 7,2.

2.2.3 Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration

Für die Bestimmung wurden $2 \times 40\text{ }\mu\text{l}$ der ROS-Suspension in $400\text{ }\mu\text{l}$ Detergenslösung (2 % Emulphogen oder 2 % Ammonyx LO + 20 mM Hydroxylamin, pH 7,0) pipettiert und die Mischung 10 min bei Raumtemperatur gehalten. Nach dieser Zeit hatten sich die ROS-Membranen im Detergens vollständig gelöst. Diese Lösung wurde 4 min in einer Eppendorf-Zentrifuge klarzentrifugiert. Anschließend wurde in einem Spektralphotometer (Cary 118 oder Cary 219) ein Absorptionsspektrum der Lösung aufgenommen (700 - 200 nm). Die Probe wurde in der Küvette entweder bei hellem Tageslicht 5 min oder mit einem Lichtleiter 2 min gebleicht und erneut ein Spektrum aufgenommen. Aus diesem Extinktionsunterschied bei 500 nm (Absorptionsmaximum des Rinderrhodopsins) wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Rhodopsin-Konzentration errechnet. Dieser Berechnung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 41000 und ein Molekulargewicht von 38000 zugrunde gelegt.

Das Verhältnis E280/500, ein Kriterium für die Reinheit des Rhodopsins, lag bei diesen Präparationen meist zwischen 2,1 und 2,6. Zum Vergleich: Der E280/500-Wert für aus der Membran herausgelöstes und hochgereinigtes Rhodopsin liegt bei 1,65.

Von jeder ROS-Suspension wurde nach Homogenisation die Rhodopsin-Konzentration mehrmals bestimmt, weil sie direkt in die Berechnung des P.-Grades eingeht.

2.2.4 Kinase-Extraktion

Extraktionspuffer: 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7,4. Das zu extrahierende ROS-Pellet wurde bei Rotlicht in wenig (ca. 5 mg/ml) Extraktionspuffer homogenisiert. Die Suspension wurde 1 min beschallt (Ultraschallbad Ultramat III) und für 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde bei 15000 U/min 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort mit Tris-HCl auf eine Konzentration von 100 mM gebracht, weil die Kinase in niedriger Ionenstärke sehr instabil ist (Kühn, pers. Mitteilung). Die gleiche Prozedur wurde mit dem extrahierten Pellet noch einmal wiederholt. Die vereinigten Kinase-Extrakte wurden sofort für Phosphorylierungsversuche weiterverwendet.

2.3 Phosphorylierung

2.3.1 Ansetzen nicht-radioaktiver ATP-Stammlösungen

Nicht-radioaktive ATP-Stammlösung (100 oder 200 mM) wurde etwa alle drei Monate neu angesetzt, mit NaOH auf pH 7,0 titriert und bei -30°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Konzentration jeder neuen Stammlösung wurde spektralphotometrisch überprüft. (λ max. 260 nm), wobei ein molarer Extinktionskoeffizient von 15400 angenommen wurde.

2.3.2 Ansetzen der AT^{32}P -Lösungen und Berechnung der spezifischen Aktivität

Methode I Hier wurde die AT^{32}P -Lösung für jedes Experiment frisch angesetzt. Die nicht-radioaktive ATP-Lösung wurde mit dem jeweils benötigten Puffer auf die gewünschte Konzentration gebracht. Die Konzentration wurde danach noch einmal mit dem Spektralphotometer (Zeiss oder Cary) genau überprüft. Diese Lösung wurde dann mit AT^{32}P ungefähr auf die benötigte spezifische Aktivität gebracht. Die spezifische Aktivität des unverdünnten, frisch gelieferten Buchler- AT^{32}P war meist etwa 2-4 Ci/mmol, d. h. es wurde für die benötigten spezifischen Aktivitäten von 1000-10000 cpm/nmol im allgemeinen etwa 1000-fach mit nicht-radioaktivem ATP verdünnt. Die spezifische Aktivität der AT^{32}P -Lösung wird exakt bestimmt, indem man der Lösung Aliquots entnimmt und deren Radioaktivität im Szintillationszähler mißt (Packard). Aus

der gemessenen Radioaktivität der Lösung und der ATP-Konzentration läßt sich die genaue aktuelle spezifische Aktivität errechnen.

Methode II Hier wurde das frisch gelieferte AT^{32}P (Amersham-Buchler) sofort mit nicht-radioaktivem ATP auf eine spezifische Aktivität von ca. 20000 cpm/nmol gebracht. Auch hier wurde die ATP-Konzentration und die spezifische Aktivität genau bestimmt. Diese Lösung wurde bei -80°C in der Gefriertruhe aufbewahrt. Methode II hat den Vorteil, daß sich das radioaktive ATP in dieser hohen chemischen Konzentration und niedrigen spezifischen Aktivität wesentlich länger hält, d. h. die radio-chemische Zersetzung des AT^{32}P wird durch die starke Verdünnung mit nicht-radioaktivem ATP entscheidend verlangsamt. Der Nachteil ist, daß, solange diese Lösung reicht, die spezifische Aktivität durch den Zerfall des ^{32}P vorgegeben ist, und zwar noch nach unten, aber nicht mehr nach oben verändert werden kann.

Eine Kompromißlösung ist es, die AT^{32}P -Lösung zu Beginn so einzustellen, daß die spezifische Aktivität im Laufe einiger Wochen nicht unter 5×10^4 cpm/nmol (= höchste benötigte spezifische Aktivität) fällt. Die Stabilität des radioaktiven ATP ist dann nicht mehr ganz so gut, aber man hat mehr Dispositionsfreiheit für seine Versuche.

2.3.3 Vorbehandlung der ROS-Probe

Die Rhodopsin-Pellets wurden in dem jeweils benötigten Puffer (meist 100 mM NaPP + 1 mM MgCl_2) homogenisiert und auf etwa 1 mg/ml gebracht. Die Rhodopsin-Konzentration wurde spektralphotometrisch noch einmal genau ermittelt. Für die Inkubation mit AT^{32}P wurde die ROS-Suspension auf ca. 0,5 mg/ml verdünnt und mit AT^{32}P -Lösung auf die gewünschte ATP-Konzentration gebracht. Vor der Inkubation wurde die Probe 1 min mit Ultraschall behandelt (Ultramat III).

2.3.4 Inkubation mit AT^{32}P

2.3.4.1 Sammelinkubation

Hier wurde die gesamte Probe (je nach Versuch zwischen 2 und 30 ml) in einem lichtdurchlässigen 50-ml-Zentrifugenröhrchen inkubiert. Die Reaktion wurde gestartet durch Einschalten der Belichtung. In gewissen Zeitabständen nach dem Start der Reaktion wurden 100- μl -Aliquots entnommen und in Eppendorf-Röhrchen mit je 300 μl eiskalter Präzipitationslösung (25 % TCA, 20 mM ATP, 5 mM H_3PO_4) pipettiert, um die Reaktion zu stoppen und das Protein zu fällen. Da die lichtinduzierte Phosphorylierung Mg^{2+} -abhängig ist, läßt sich die Reaktion auch mit einem Überschuß an EDTA (20 mM) stoppen. Dieser Weg wurde gewählt, wenn eine unvollständige Phosphorylierung gewünscht wurde und das Rhodopsin wieder regeneriert und chromatographisch aufgetrennt werden sollte.

2.3.4.2 Einzelinkubation in Eppendorf-Röhrchen

Hier wurden in eine Anzahl von Eppendorf-Röhrchen je 100 µl der Inkubations-Suspension pipettiert und nach verschiedenen Inkubationszeiten jeweils 300 µl eiskalte Präzipitationslösung zu der Probe gegeben.

Inkubiert wurde in beiden Fällen bei einer Temperatur von 30° C. Die Belichtung erfolgte zumeist mit weißem Licht von einer Intensität, die 80 - 90 % des Rhodopsins in den ersten 30 sec bleichte. In einigen Fällen wurde der Lichtquelle ein Orange-Filter vorgeschaltet, das alle Wellenlängen unter 530 nm zurückhielt.

2.3.5 Waschen der TCA-gefällten ROS-Proben

Die in TCA gefällten ROS-Proben wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und das Pellet 3 x mit je 1 ml 10 % TCA + 5 mM H₃PO₄ gewaschen, um die nicht inkorporierte Radioaktivität zu entfernen. Die gewaschenen Pellets wurden etwa 30 min in je 1,2 ml Szintillationslösung mit 10 % NCS (Gewebe-Löser, Amersham-Searle) auf einem Eppendorf-Schüttler bei 37° C geschüttelt, um das präzipitierte Protein aufzulösen. Die Eppendorf-Röhrchen wurden ohne weitere Zugabe von Szintillationslösung in Szintillationsgläschen gesetzt und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler (Packard) bestimmt. Als Blindprobe (Background) diente die zur Zeit 0 präzipitierte Probe.

Diese Zählmethode ist in einer Reihe von Vorversuchen mit der sonst allgemein üblichen Filtriermethode verglichen worden. Dabei wurde festgestellt, daß beide Methoden gleich gut reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse bringen. Dennoch ist die Zentrifugationsmethode sehr viel vorteilhafter, und zwar aus folgenden Gründen:

1. Kein Substanzverlust (und damit weniger Streuung), da vom Inkubieren bis zum Zählen alles im gleichen Gefäß stattfindet.
2. Ersparnis der sehr teuren und nur einmal zu verwendenden Filter.
3. Reduzierung des sehr hohen Verbrauchs an Waschlösungen und Szintillationsflüssigkeit um 90 %.
4. Wasserersparnis (Wasserstrahlpumpe muß nicht stundenlang laufen).
5. Radioaktive Abfälle lassen sich sammeln und müssen nicht mit der Wasserstrahlpumpe in den Ausguß gespült werden.
6. Wesentliche Arbeitersparnis.

Die Veröffentlichung dieser neu entwickelten Methode ist im Druck (Kühn und Wilden, Methods in Enzymologie, Academic Press, 1981).

2.3.6 Auswertung (Bestimmung des P.-Grades)

Der durchschnittliche P.-Grad des Rhodopsins nach der Inkubation läßt sich

berechnen aus den 4 bekannten Größen:

1. Spezifische Aktivität in cpm/nmol
2. gemessene Radioaktivität der Probe in cpm
3. Rhodopsin-Gehalt der Probe in μg
4. Molekulargewicht des Rhodopsins = 38000

d. h. 38 μg Rh = 1 nmol

P.-Grad =

$$\frac{\text{gemessene Aktivität} \times 38}{\text{spezifische Aktivität} \times \mu\text{g Rh}} = \text{nmol Phosphat/nmol Rhodopsin,}$$

(von jetzt an abgekürzt P/Rh)

Dimensionsbetrachtung: $\frac{\text{cpm} \times \text{nmol} \times \mu\text{g}}{\text{cpm} \times \text{nmol} \times \mu\text{g}} = \text{nmol/nmol}$

Die Auswertung geht davon aus, daß praktisch alles inkorporierte Phosphat tatsächlich an Rhodopsin gebunden ist. Die Richtigkeit dieser Annahme wird im Verlauf der Arbeit demonstriert (z. B. gleicher P.-Grad im säulenchromatographisch gereinigten Rhodopsin wie in ROS-Membranen) und ist auch in der Literatur dokumentiert (z. B. durch Gelelektrophorese, Kühn et al, 1973).

2.4 Regeneration mit 11-cis-Retinal

Um für säulenchromatographische Trennversuche brauchbar zu sein, d. h. um in den einzelnen Fraktionen spektralphotometrisch erfaßbar zu sein, muß das phosphorylierte Opsin erst wieder möglichst vollständig zu Rhodopsin regeneriert werden. Zu diesem Zweck wurde der gebleichten ROS-Suspension ein 3-4-facher molarer Überschuß an 11-cis-Retinal zugesetzt. Diese Mischung wurde für 3 Std. bei 30° C im Dunkeln inkubiert und zwischendurch etwa alle 30 min für 1 min mit Ultraschall behandelt. Nach der Regeneration wurden Rhodopsin-Konzentration und P.-Grad der Probe bestimmt und mit den ursprünglichen Werten verglichen. Wenn nicht mindestens 97 % des Rhodopsins regeneriert waren, wurde noch einmal eine äquimolare Menge an 11-cis-Retinal zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur nachregeneriert. Das kam allerdings selten vor und immer nur dann, wenn die alkoholische 11-cis-Retinal-Lösung mehrere Wochen alt war. Für den nächsten Versuch wurde dann jeweils eine frische 11-cis-Retinal-Lösung angesetzt.

Das phosphorylierte und regenerierte Rhodopsin wurde in einer Beckman-Zentrifuge bei 18000 U/min 20 min lang abzentrifugiert. Der radioaktive Überstand wurde abgegossen und das Rhodopsin-Pellet noch 3-4 x mit Puffer gewaschen, solange, bis im Überstand keine Radioaktivität mehr meßbar war. Nach dem Waschen wurden noch einmal Rhodopsin-Konzentration und P.-Grad gemessen. Das Rhodopsin wurde zum Schluß noch einmal mit Wasser gewaschen.

Dies letzte Pellet wurde dunkel eingepackt und über Nacht auf Eis im Kühlschrank aufbewahrt.

2.5 Affinitäts-chromatographische Reinigung von Rhodopsin auf der Concanavalin-A-Sepharose-Säule

2.5.1 Prinzip

Rhodopsin ist ein Glykoprotein. Der Kohlenhydrat-Anteil trägt 6 α -D-Mannose-reste (Hargrave et al, 1980), die an ein bestimmtes Lectin, das Concanavalin-A, spezifisch mit hoher Affinität gebunden werden. Auf Grund dieser Tatsache läßt sich Rhodopsin in Detergensiösung über einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule von Lipiden und anderen Proteinen quantitativ abtrennen (van Breugel et al, 1977). Nach Auswaschen aller anderen Komponenten der Präparation wird das Rhodopsin mit Hilfe von α -Methyl-Mannosid von der Säule eluiert.

2.5.2 Vorbereitung der Säule

Die Bindungskapazität der Concanavalin-A-Sepharose (Pharmacia) für Rhodopsin beträgt ca. 2 mg/ml. Da das Concanavalin A sehr teuer ist, wurde die Säule jeweils nach der zu reinigenden Rhodopsin-Menge exakt dimensioniert. Das Säulenvolumen war je nach Versuch 0,5 - 10 ml.

Die Concanavalin-A-Sepharose-Suspension wird vorsichtig und langsam mit einer Spritze ohne Kanüle in die Säule eingefüllt, wobei Luftblasen zu vermeiden sind. Die Sepharose-Matrix ist mechanisch sehr empfindlich, schon Rühren mit einem Spatel, z. B. um Luftblasen zu entfernen, verändert die Konsistenz des Materials, wahrscheinlich werden Gelperlen dabei beschädigt. Die Säule muß sorgfältig mit der gleichen Detergensiösung, in der später die Rhodopsin-Probe aufgetragen wird (2 % Emulphogen oder 2 % Ammonyx LO, 20 mM NaCl, 1 mM NaPP, im folgenden Con-A-Säulenpuffer genannt), equilibriert werden. Dazu reicht es aus, das 5-6-fache Säulenvolumen an Puffer langsam, am besten nur unter hydrostatischem Druck, durch die Säule laufen zu lassen. Die Säule darf auf keinen Fall trockenlaufen, über der Oberfläche sollte sich während der gesamten Laufzeit immer mindestens 1 mm Flüssigkeit befinden. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug je nach Geometrie und Volumen der Säule 0,1 - 0,5 ml/min.

2.5.3 Vorbereiten und Auftragen der Rhodopsin-Probe

Das zu reinigende Rhodopsin wurde in Con-A-Säulenpuffer gelöst und unlösliche Reste wurden abzentrifugiert. Die Probe wurde vorsichtig mit einer Gilson-Pipette auf die Säule aufgetragen. Nach Einziehen der Rhodopsin-Lösung in die Säule wurde mit etwa dem 10-fachen Säulenvolumen an Puffer nachgewaschen, solange, bis die letzten Fraktionen gegen Säulenpuffer als Referenz keine Absorption bei 280 nm mehr zeigten.

2.5.4 Elution des Rhodopsins von der Säule

Eluiert wurde mit einer Lösung von 200 mM α -Methyl-Mannosid in 2 % Emulphogen oder Ammonyx LO + 1 mM NaPP. Etwa 2/3 des Säulenvolumens an Elutionspuffer wurden aufgetragen und nach dessen Einziehen die Säule für 10 - 15 min verschlossen, damit sich im Austausch der Rhodopsin-Zuckerreste gegen α -Methyl-Mannosid ein Gleichgewicht einstellen konnte. Anschließend wurde unter hydrostatischem Druck weiter eluiert. Auf diese Weise erhält man das Rhodopsin im Eluat wesentlich konzentrierter (bis 2 mg/ml), als wenn man den Elutionspuffer sofort unter hydrostatischem Druck durchlaufen läßt. Anscheinend geht die Ablösung des Rhodopsins relativ langsam vor sich, trotz des hohen molaren Überschusses (ca. 4000-fach) an α -Methy-Mannosid. Die eluierten Rhodopsin-Fraktionen wurden auf Eis gesammelt. Alle Arbeiten vom Vorbereiten und Auftragen der Probe an wurden unter schwachem Rotlicht durchgeführt.

2.6 Ionenaustauscher-Chromatographie auf Ecteola-Cellulose-Säulen

2.6.1 Prinzip

Da verschieden hoch phosphorylierte Rhodopsine verschiedene Nettoladungen tragen, besteht die Möglichkeit, sie mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie (z. B. Ecteola-Cellulose, Shichi und Somers, 1978) voneinander zu trennen.

Ecteola-Cellulose (Epichlorhydrin-Triäthanolamin-Cellulose) ist ein Anionenaustauscher. Sie wird in Pulverform geliefert (Bio Rad) und ist ein robustes, mechanisch wenig empfindliches Material. Säulen aus Ecteola-Cellulose können ohne weiteres auch mit einer Schlauchpumpe sehr schnell, d. h. unter hohem Druck, gefahren werden.

2.6.2 Vorbereitung der Säulen

Bei Ecteola-Cellulose ist die Säure-Alkali-Aktivierung, die bei Ionenaustauschern auf Cellulose-Basis normalerweise üblich ist, nicht erforderlich. Das wurde in einer Reihe von Vorversuchen einwandfrei festgestellt. Die Säule bindet phosphoryliertes Rhodopsin mit etwa der gleichen Kapazität, und die Stabilität des Rhodopsins ist auf der unbehandelten Säule sogar wesentlich besser als nach der Säure-Alkali-Behandlung. Vor jedem Versuch wird lediglich die benötigte Menge Ecteola-Cellulose in "E-Säulenpuffer" (1 mM NaPP, 2 % Ammonyx LO oder Emulphogen, pH 6,0) suspendiert und 15 min lang sedimentieren gelassen, wobei kleine Schwebeteilchen, - die sog. "fines" - im Überstand bleiben und abdekantiert werden. Diese Prozedur wird noch 2 x wiederholt, beim letzten Mal bleibt der Überstand schon fast klar.

Wird diese Abtrennung der "fines" unterlassen, verstopft die Säule und es ergeben sich sehr schlechte Durchflußraten. Das Cellulose-Material, das im eben beschriebenen Arbeitsgang gleichzeitig gewaschen und mit E-Säulenpuffer equilibriert wurde, wird dann in die Säule eingefüllt. Nach Absitzen der Cellulose und Durchlaufen des Überstandes ist die Säule gebrauchsfertig.

2.6.3 Auftrennung verschieden hoch phosphorylierter Rhodopsinse auf der Ecteola-Säule

Da der Fraktionierung des Rhodopsins auf der Ecteola-Säule meist eine Entlipidisierung auf der Concanavalin-A-Säule vorausgeht, wird die Probe meist in Con-A-Elutionspuffer auf die Säule aufgetragen. Nach Einziehen der Probe in die Säule wird mit dem 5-6-fachen Säulenvolumen an E-Säulenpuffer nachgewaschen. Das unphosphorylierte Rhodopsin läuft dabei frei durch die Säule, ohne gebunden zu werden. Die einzelnen Fraktionen werden in einem Fraktions-sammler (LKB 7000 Ultrarac) aufgefangen. Mit Hilfe einer Schlauchpumpe wird die Durchflußrate auf etwa 0,5 ml/min eingestellt. Diese Rate erwies sich als der brauchbarste Kompromiß. Bei langsamerem Durchlaufen blieb das phosphorylierte Rhodopsin auf der Säule aus einem unbekannten Grunde nicht stabil, in den eluierten Fraktionen trat dann freies Retinal auf. Andererseits waren bei zu schnellem Durchlauf die Trennergebnisse sehr schlecht und das Rhodopsin kam sehr verdünnt von der Säule herunter. Offenbar wird auch auf der Ionenaustauschersäule für die Einstellung eines Gleichgewichts etwas Zeit benötigt. Das Volumen der einzelnen Fraktionen war je nach Menge des Rhodopsins und Volumen der Säule 0,2 - 1,0 ml.

Eluiert wurde mit einem NaCl-Gradienten von 0,0-0,5 M in E-Säulenpuffer. Auf diese Weise kam das niedrig phosphorylierte Rhodopsin im Eluat zuerst, das am höchsten phosphorylierte zuletzt. Die unphosphorylierten Fraktionen wurden zur Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration und zur Überprüfung auf Radioaktivität vereinigt. In den phosphorylierten Fraktionen wurden Rhodopsin-Konzentration und P.-Grad für jede Fraktion einzeln bestimmt. Diese Methode ist eine Modifikation einer Methode von Shichi (1978), sie bringt bessere Auftrennung und höhere Wiedergewinnung des eingesetzten Rhodopsins als die Originalmethode. Dennoch bleibt sie ein Kompromiß zwischen mehreren unerwünschten Effekten, und sie ist nicht sehr gut reproduzierbar.

2.6.4 Die Ecteola-Säulen-Kaskade

Bei einer anderen, verbesserten Methode der Rhodopsin-Fraktionierung wurde eine Reihe von kleinen Ecteola-Säulen übereinandergeschaltet. Die zu untersuchende Probe wurde auf die oberste Säule aufgetragen und passierte dann

eine Säule nach der anderen. Unphosphoryliertes Rhodopsin läuft auch hier ungehindert durch die ganze Säulenreihe hindurch. Phosphoryliertes Rhodopsin wird gebunden, und zwar das am höchsten phosphorylierte Rhodopsin auf der ersten Säule, soweit deren Kapazität reicht, das Rhodopsin mit dem zweithöchsten P.-Grad bleibt auf der zweiten Säule usw., bis alles phosphorylierte Rhodopsin gebunden ist.

Je nach durchschnittlichem P.-Grad der aufgetragenen Rhodopsin-Probe werden bis zu 17 Säulen benötigt. Da die Kapazität der Ecteola-Cellulose für Rhodopsin mit fallendem P.-Grad sehr stark abnimmt, müssen die Säulen von der ersten bis zur letzten immer größer werden, um Rhodopsin in meßbaren Mengen binden zu können, und um auch das letzte nur niedrig phosphorylierte Rhodopsin vom unphosphorylierten abtrennen zu können. Es erfordert ein wenig Übung, die einzelnen Säulen je nach aufzutrennender Rhodopsin-Menge und nach dem durchschnittlichen P.-Grad so günstig wie möglich zu dimensionieren.

Nach dem Waschen mit E-Säulenpuffer werden die Säulen einzeln eluiert. Da bei diesem Verfahren die verschieden hoch phosphorylierten Rhodopsin-Fractionen auf verschiedenen Säulen gebunden sind, ist zur Elution kein Salz-Gradient erforderlich. Der Elutionspuffer ist hier 2 % Emulphogen oder Ammonyx LO, 100 mM NaPP, 300 mM NaCl, pH 6,0. Die Pufferkapazität ist hier also wesentlich höher als im Elutionsgradienten für die einfache lange Ecteola-Säule. Das ist wichtig, denn bei schwach gepufferter Elutionslösung verschiebt sich der pH beim Eluieren stark zum Alkalischen hin, und zwar umso mehr, je länger die Säule ist. Es scheint vom Ecteola-Cellulose-Material mit steigender Ionenstärke eine Substanz abgelöst zu werden, die stark alkalisch reagiert. Rhodopsin ist in dieser Elutionslösung nicht sehr stabil. Selbst wenn man in den Auffanggefäßen im Fraktionssammler schon genügend Puffer vorgelegt hat, um den pH sofort nach der Elution wieder zu stabilisieren, ist ein Teil des Rhodopsins oft schon denaturiert, ganz besonders bei langen Säulen. Nimmt man aber kürzere Säulen, dann reicht die Kapazität nicht für das niedrig phosphorylierte Rhodopsin. In dem Falle muß man noch eine oder mehrere Säulen nachschalten. Die Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist die Säulen-Kaskade. Mit dieser Methode können wesentlich bessere Trennungen erzielt werden als mit einer einzigen großen Ecteola-Säule. Ihr Hauptvorteil liegt darin, daß das Rhodopsin (besonders das hoch phosphorylierte Rhodopsin) innerhalb sehr kurzer Zeit eluiert werden kann und nicht im Elutionspuffer eine lange Säule durchwandern muß. Zusätzlich wird auf der Säulen-Kaskade durch die stark gepufferte Elutionslösung die Alkalisierung vermieden, die auf der großen Einzelsäule notgedrungen auftritt und zu Denaturierung besonders der hoch phosphorylierten Rhodopsin-Fractionen führt.

2.7 Der Phosphat-Test

In einigen Experimenten wurde der durch die Messung der inkorporierten Radioaktivität bestimmte P.-Grad von Rinder-Rhodopsin mit Hilfe eines Tests auf anorganisches Phosphat, im folgenden P_i -Test genannt, überprüft. Für diesen Test muß das organische Material zunächst verascht werden, damit das inkorporierte Phosphat als freies anorganisches Phosphat übrig bleibt. Der Test wurde durchgeführt nach der Methode von Ames und Dubin (1960).

Benötigte Lösungen: 1. 10 % $Mg(NO_3)_2$ in 95 % Äthanol

2. 0,5 N HCl

3. P_i -Mixtur

a) 10 % Ascorbinsäure

b) 0,42 % Ammoniummolybdat $4 H_2O$ in 1 N H_2SO_4

Mix: 1 Teil von a auf 6 Teile b

Durchführung (10 - 50 nmol P_i /Probe):

Die Probe wird mit 30 μ l Nitratlösung im Quarz-Reagenzglas am Bunsenbrenner verascht. Nach Zugabe von 0,3 ml 0,5 N HCl wird 15 min unter Rückfluß hydrolysiert. Nach Abkühlung wird das Volumen mit P_i -Mixtur auf 1,0 ml gebracht. Die Probe wird umgeschüttelt und 1 Std. bei 37° C inkubiert. Der sich entwickelnde blaue Phospho-Molybdat-Komplex ist für einige Stunden stabil. Die Absorption des Komplexes wird im Spektralphotometer (Zeiss) bei 820 nm gemessen.

Mit einer Phosphatpuffer-Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve für Phosphatmengen von 5 - 60 nmol P_i /Probe aufgestellt. Der Puffer wurde vor der Messung genau der gleichen Prozedur unterzogen wie die Proben, einschließlich der Veraschung. Es wurden für jeden Verdünnungswert 6 Aliquots verascht und gemessen. 6 Blindproben (alle Reagenzien ohne Phosphat) wurden ebenfalls auf die gleiche Weise behandelt. Die Extinktion der Phosphatpuffer-Probe wurde für jeden Wert in der Eichkurve um die Extinktion der Blindprobe korrigiert. Auf diese Weise erwies sich, wie zu erwarten, die Eichkurve als eine Gerade, die durch den Nullpunkt geht. Wird die Extinktion nicht um die Blindproben-Extinktion korrigiert, ergibt sich ebenfalls eine Gerade, aber sie schneidet die y-Achse bei der Extinktion der Blindprobe.

Von den zu untersuchenden Rhodopsin-Proben wurden jeweils mindestens 4 Aliquots verascht und gemessen, ebenso mindestens 4 Blindproben (alle Reagenzien ohne Rhodopsin) zur Kontrolle. Von Zeit zu Zeit wurde die Eichkurve (Abb. 1) zur Sicherheit wiederholt, aber es ergaben sich keine signifikanten Änderungen.

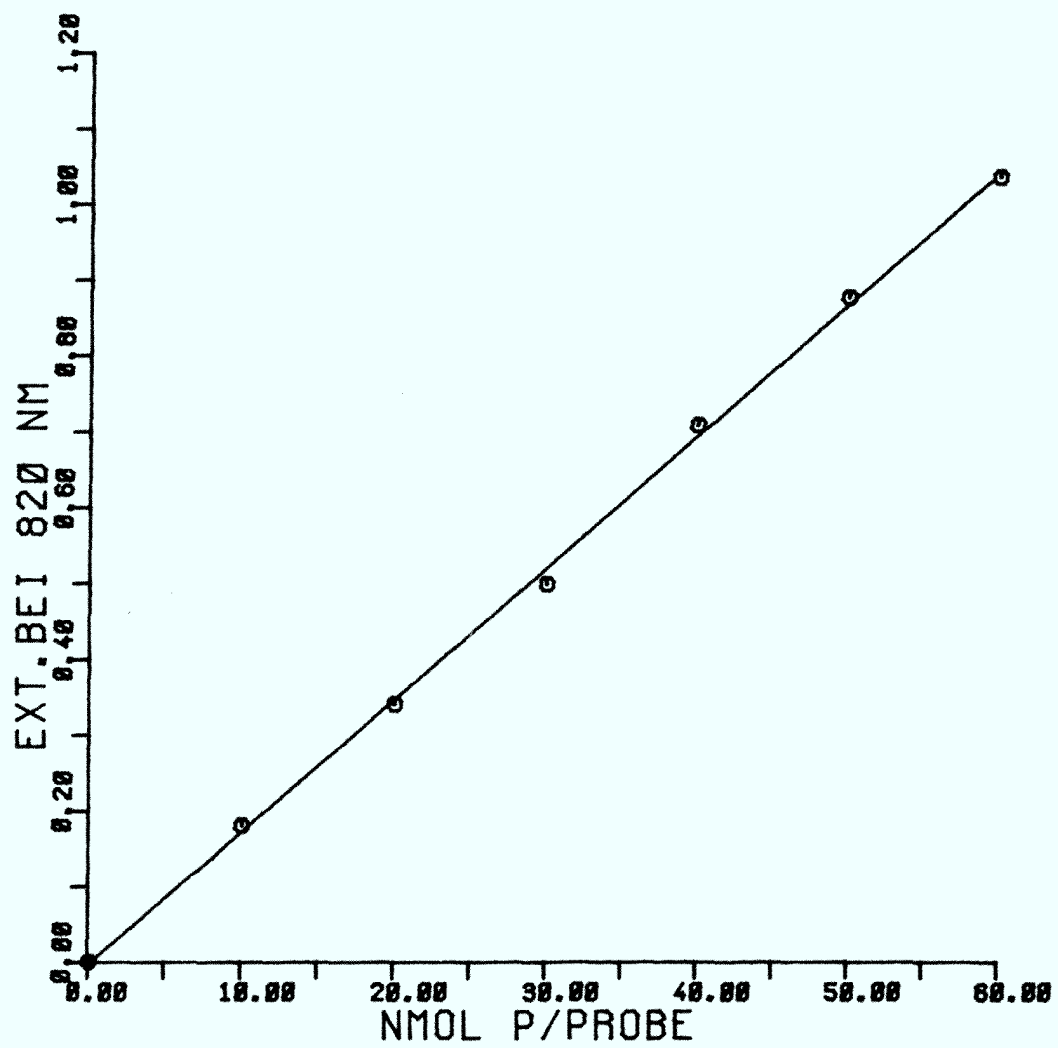


Abb. 1 Eichkurve für den P_i -Test. Erklärung im Text.

3. Ergebnisse

3.1 Durchschnittlicher P.-Grad in Rinder-ROS-Suspensionen

3.1.1 P.-Grad und Zeitverlauf der Phosphorylierung unter optimalen Bedingungen

Der maximal erreichbare P.-Grad * wurde bei fast allen Rinder-ROS-Präparationen nahezu gleich hoch gefunden, nämlich $7,0 \pm 0,3$ P/Rh (Durchschnittswert aus ca. 20 Präparationen und 40 - 45 Inkubationen). Allerdings sind Zeitverlauf und Endwert der Phosphorylierung stark von den gewählten Inkubationsbedingungen abhängig. Auf diese Tatsache ist es wahrscheinlich zurückzuführen, daß die Angaben über den P.-Grad des Rhodopsins in der Literatur sehr unterschiedlich sind.

In einer Reihe von Versuchen wurden die optimalen Bedingungen für eine möglichst rasche und vollständige Phosphorylierung wie folgt ermittelt (Kühn und Wilden, 1981): Inkubation in 100 mM NaPP- oder KPP-Puffer mit 1 mM $MgCl_2$, pH 7,4, ATP-Konzentration 3 mM, Rhodopsin-Konzentration ca. 0,5 mg/ml Inkubationsmedium. Die Inkubations-Temperatur betrug $30^{\circ}C$. Belichtet wurde mit einer 150 W Reflector-Flood-Lampe in 30 cm Abstand von der Probe, wobei das Rhodopsin bereits innerhalb der 1. min vollständig gebleicht wurde. In allen Abbildungen, wenn nicht anders angegeben, ist die Zeit 0 identisch mit dem Einsetzen der Belichtung. Wie in Abb. 2 ersichtlich, ist die Phosphorylierung zwar in Tris-Puffer schneller als in NaPP, aber manche Präparationen dephosphorylieren signifikant in Tris-Puffer, selbst bei einer ATP-Konzentration von 3 mM, so daß der P.-Grad am Ende der Inkubation nicht immer dem maximal erreichbaren P.-Grad entspricht.

Im Dunkeln ist die Phosphorylierbarkeit des Rhodopsins sehr gering, nur maximal etwa 0,1 - 0,2 P/Rh, wie Abb. 2 ebenfalls zeigt. In Abb. 2 sowie in allen anderen Abbildungen, in denen die Zeitverläufe der Phosphorylierung und Dephosphorylierung unter verschiedenen Bedingungen verglichen werden, stammen jeweils alle Kurven von der gleichen Präparation. Diese Fest-

* Es handelt sich hier um den durchschnittlichen P.-Grad der jeweils untersuchten Population von Rhodopsin-Molekülen, wobei die Verteilung der P.-Grade auf die einzelnen Rhodopsin-Moleküle zunächst nicht bestimmt ist.

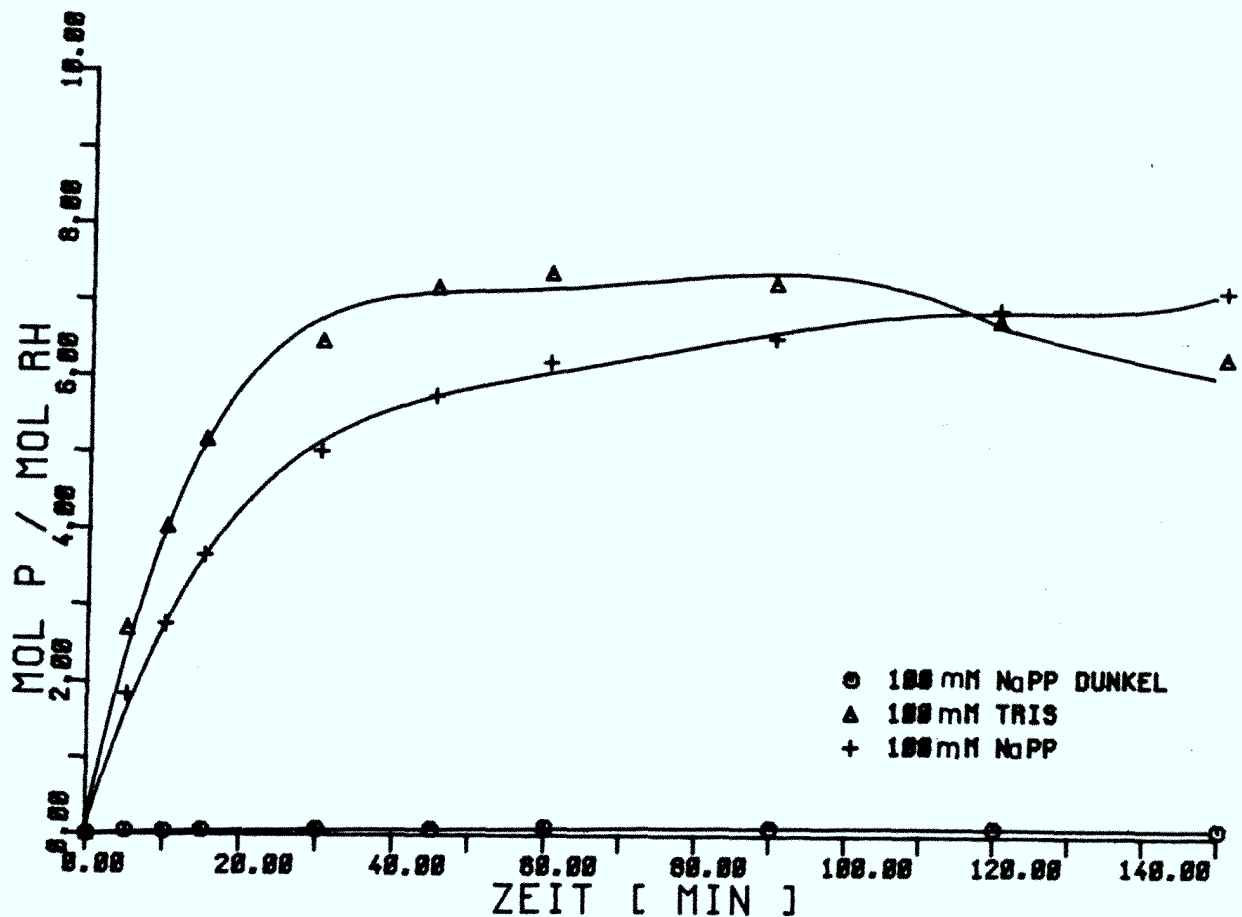


Abb. 2 Vergleich des Zeitverlaufs der Phosphorylierung mit der gleichen ROS-Präparation in Tris-HCl und NaPP bei kontinuierlicher Belichtung und im Dunkeln in NaPP. ATP-Konzentration jeweils 3 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,4 (=optimale Bedingungen)

stellung ist wichtig, denn unter gleichen Bedingungen verhält sich die gleiche Präparation immer gleich, während verschiedene Präparationen in ihrem Verhalten gewisse Abweichungen zeigen können, vor allem in Bezug auf die Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung und auf die Dephosphorylierbarkeit. Abb. 3 zeigt die Zeitverläufe der Phosphorylierung von drei verschiedenen Präparationen, die zur gleichen Zeit unter gleichen Bedingungen aufgenommen worden sind. Die Unterschiede kommen zumindest teilweise dadurch zustande, daß von der Kinase, die ja im Dunkeln löslich und nicht membrangebunden ist, bei der Präparation einmal mehr, einmal weniger verloren geht. Ein gewisser Teil der Kinase wird mit Sicherheit immer ausgewaschen, so daß die Phosphorylierung in vitro wahrscheinlich nicht

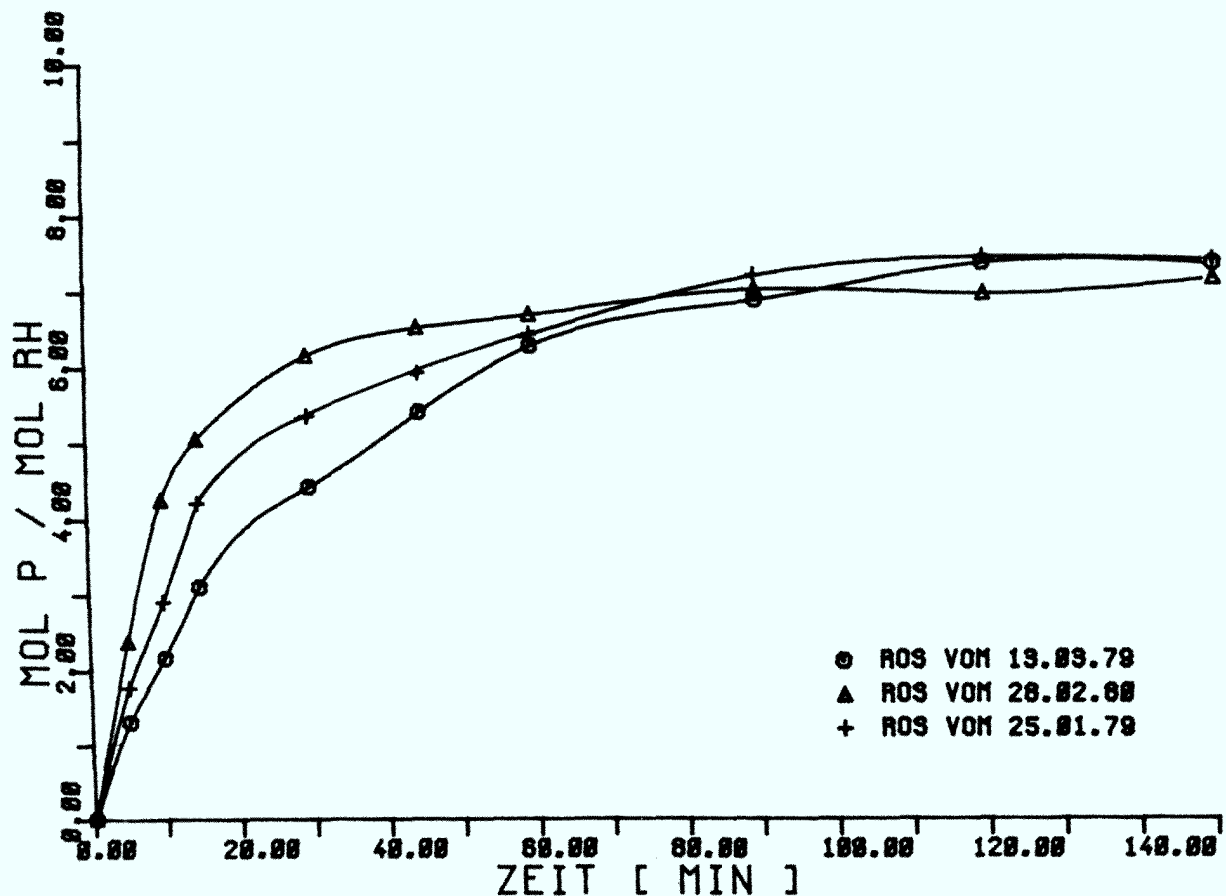


Abb. 3 Zeitverlauf der Phosphorylierung mit drei verschiedenen ROS-Präparationen unter gleichen Bedingungen. Inkubationsmedium: 100 mM NaPP, 3 mM ATP, 1 mM MgCl_2 , pH 7,4.

ihre maximale Geschwindigkeit erreichen kann. Außerdem gehen beim Einfrieren und Auftauen jedesmal ca. 30-40 % der Kinase-Aktivität verloren (H. Kühn, pers. Mitteilung).

3.1.2 Der Einfluß der Lagerungszeit von AT^{32}P auf den gemessenen scheinbaren P.-Grad

Phosphorylierungsgeschwindigkeit sowie Endwert der Phosphorylierung schienen erstaunlicherweise stark davon abhängig zu sein, wie alt das verwendete AT^{32}P (Amersham Bucher) war. Der beschriebene P.-Grad von ca. 7 P/Rh war lange Zeit anscheinend nur mit frisch geliefertem AT^{32}P zu erreichen, obwohl der natürliche radioaktive Zerfall von ^{32}P (Halbwertszeit 14,3 Tage) bei der Berechnung und Einstellung der spezifischen Radioaktivität immer berücksichtigt wurde. Abb. 4 zeigt den Zeitver-

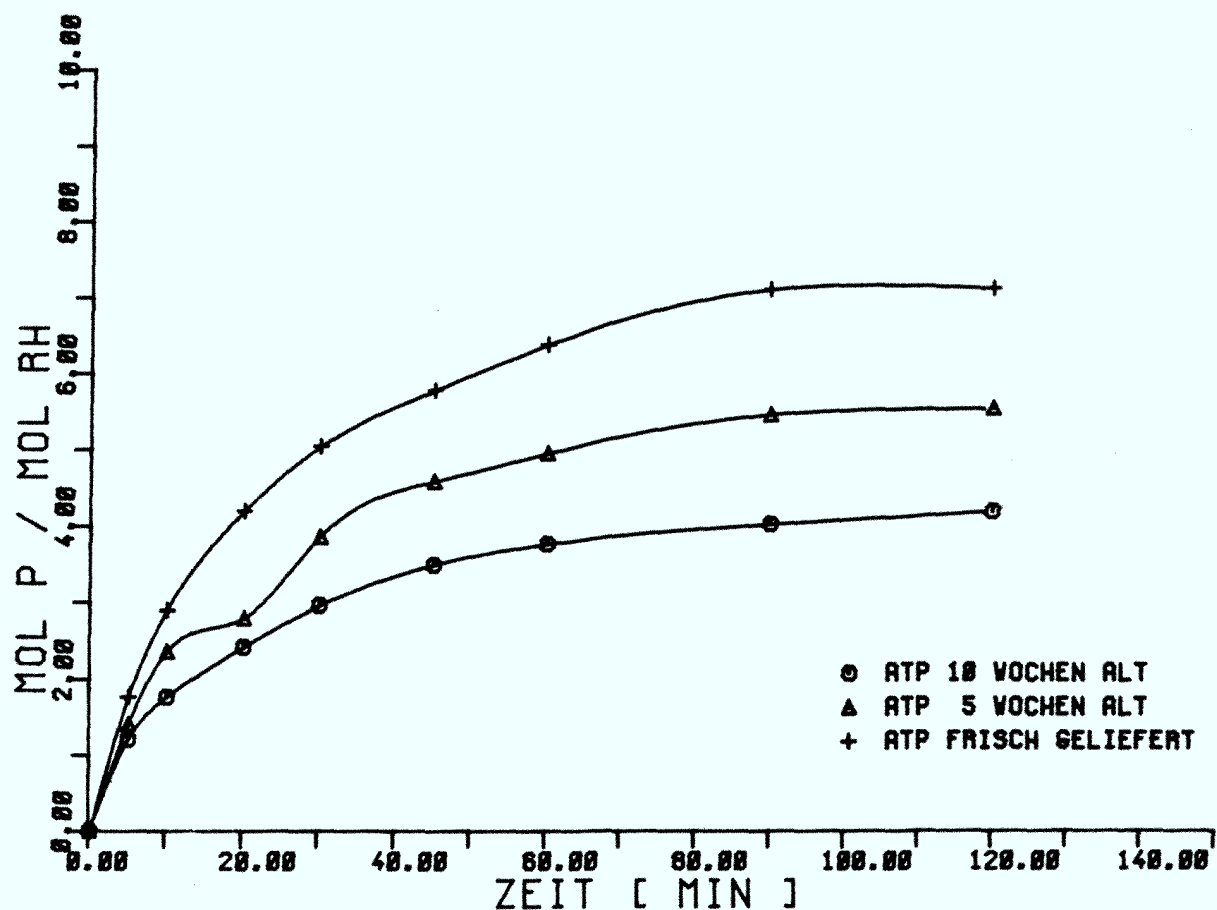


Abb. 4 Der Einfluß der Alterung von AT^{32}P auf die Phosphorylierung der gleichen ROS-Präparation. Inkubationsmedium: 100 mM NaPP, 3 mM ATP, 1 mM MgCl_2 , pH 7,4.

lauf der Phosphorylierung der gleichen Präparation (ROS v. 21. 1. 79) mit frisch geliefertem sowie mit 5 Wochen altem und 10 Wochen altem AT^{32}P . Das AT^{32}P war in der von Amersham Buchler gelieferten spezifischen Radioaktivität von ca. 2-4 Ci/mmol ohne weitere Zusätze bei -70°C gelagert worden. Für die unterschiedlichen Ergebnisse kamen zwei Ursachen in Betracht: Entweder war der P.-Grad mit gealtertem AT^{32}P tatsächlich niedriger, dann mußte durch Lagerung und Zerfall der radioaktiven ATP-Lösung eine Substanz entstanden sein, die die Kinase-Aktivität hemmte; oder bei gealtertem AT^{32}P entsprach die gemessene spezifische Radioaktivität nicht mehr der wahren AT^{32}P -spezifischen Radioaktivität. Im letzteren Fall mußte durch radiolytischen Zerfall ein AT^{32}P -Abbauprodukt entstanden

sein (z. B. $^{32}\text{P}_i$), das zwar bei der Bestimmung der spezifischen Radioaktivität mitgemessen wurde, aber in Wirklichkeit nicht an der Reaktion teilnahm, so daß der aus der Messung der Radioaktivität errechnete P.-Grad niedriger als der tatsächlich erreichte P.-Grad war.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, und da von der Herstellerfirma keine befriedigende Erklärung zu bekommen war, wurde eine von Radioisotopen unabhängige Methode, nämlich die direkte chemische Phosphatbestimmung an gereinigtem Rhodopsin, angewandt.

Mit dem Phosphat-Test ($=\text{P}_i$ -Test) läßt sich nach Veraschen einer Probe organischen Materials der Phosphat-Gehalt der Probe als anorganisches Phosphat bestimmen. Da die Diskmembran neben Rhodopsin große Mengen an Phospholipiden enthält, ist das ans Rhodopsin gebundene Phosphat nur dann zu bestimmen, wenn das Rhodopsin vorher von den Lipiden und möglichst auch von anderen Proteinen abgetrennt wird. Dies gelingt leicht mit Hilfe der Concanavalin-A-Sepharose-Säule.

Das phosphorylierte Rhodopsin aller drei Proben aus Abb. 4 wurde regeneriert und über einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule gereinigt. Auf die gleiche Weise wurde eine unphosphorylierte Probe der gleichen ROS-Präparation entlipidisiert. Mit Hilfe des P_i -Tests wurde dann der Phosphat-Gehalt aller vier Proben bestimmt. Der P_i -Test wurde 2x hintereinander durchgeführt, wobei jedesmal von jeder Probe 4 Aliquots mit je 5 nmol Rhodopsin verascht und untersucht wurden. Die ermittelten Werte beruhen also jeweils auf 8 Einzelmessungen. Da der Test sehr empfindlich ist und schon auf ganz geringe Phosphatmengen, die überall als Verunreinigungen vorkommen können, anspricht, wurden auch jedesmal 4 Blindproben (alle Reagenzien ohne Rhodopsin) auf die gleiche Weise untersucht. Die gemessene Extinktion der Proben (0,4-0,7) wurde um die Extinktion der Blindproben ($0,065 \pm 0,013$) korrigiert. Ferner wurde mit drei weiteren ROS-Präparationen der P_i -Test einmal an gereinigtem Rhodopsin, einmal an Diskmembranen durchgeführt. Auch hier wurden jeweils 4 Aliquots von jeder Probe untersucht, und zwar bei gereinigtem Rhodopsin je 5 nmol, bei ungereinigtem Rhodopsin (= ganze Membranen) 0,5 nmol/Probe. Tabelle I zeigt das Ergebnis dieser Messungen.

Tabelle I

durch Radioaktivitätsmessung ermittelter P.-Grad	mit P_i -Test ermittelter P.-Grad
0,0	$0,0 \pm 0,5$
4,3	$7,2 \pm 0,5$
5,6	$6,9 \pm 0,3$
7,3	$7,1 \pm 0,4$

Zum Vergleich: ROS-Membranen enthielten 66 ± 4 mol Phosphat/mol Rhodopsin, während der Phosphat-Gehalt des gereinigten unphosphorylierten Rhodopsins sich in allen vier untersuchten ROS-Präparationen nicht signifikant vom Phosphat-Gehalt der Blindproben unterschied.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß der wahre P.-Grad in allen drei Versuchen ca. 7 P/Rh war, aber die spezifische Radioaktivität des gealterten $AT^{32}P$ stimmte offensichtlich nicht mehr.

In der Folgezeit gelang es, durch Veränderung der Lagerungsbedingungen diese Alterungserscheinungen des radioaktiven ATP weitgehend zu verhindern; und zwar wurde

1. das Buchler-ATP sofort nach Lieferung mit nicht-radioaktivem ATP auf eine spezifische Aktivität von ca. 2×10^4 cpm/nmol verdünnt und
2. wurden der Lösung gleichzeitig 10 mM Ammoniumcarbonat und 1 mM EDTA zugefügt.

Bei drei weiteren ROS-Präparationen, die mit dem so behandelten $AT^{32}P$ phosphoryliert worden waren, wurden die P.-Grade noch einmal mit beiden Methoden ermittelt und miteinander verglichen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede mehr, auch nicht mit 6 Wochen altem $AT^{32}P$.

3.1.3 Versuche zur Klärung der Frage, ob ROS-Präparationen von nicht-dunkeladaptierten Rinderaugen nennenswerte Mengen an Opsin enthalten

3.1.3.1 Vergleich des P.-Grades einer "normalen" ROS-Präparation mit dem einer dunkeladaptierten Präparation

Der in unserem Laboratorium gefundene P.-Grad ist im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Werten extrem hoch. Da die

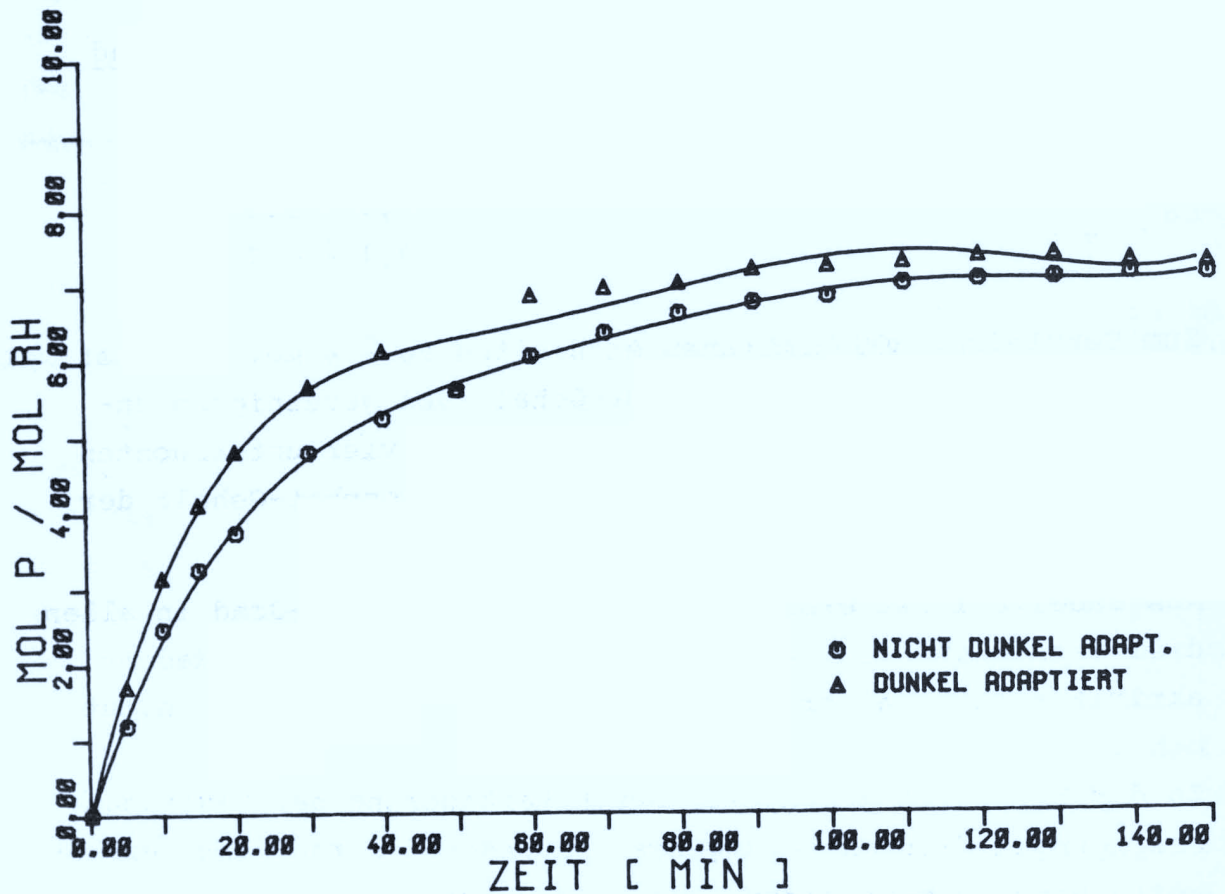


Abb. 5 Zeitverlauf der Phosphorylierung mit einer dunkeladaptierten und einer nicht-dunkeladaptierten ROS-Präparation. Inkubationsmedium: 100 mM NaPP, 3 mM ATP, 1 mM MgCl_2 , pH 7,4.

Rinderaugen in unseren Präparationen normalerweise nicht in vivo dunkeladaptiert worden sind, könnte der Einwand erhoben werden, daß solche ROS-Membranen vielleicht noch einen gewissen Anteil an Opsin enthielten. Laut Daemen (1973) und Pober und Bitensky (1979, Review) sollen in nicht dunkeladaptierten Rinder-ROS-Präparationen immer mindestens 10-20 % Opsin vorhanden sein. Dieses Opsin könnte dann bei Lichtinkubation durch "Recycling" (McDowell und Kühn, 1977) mitphosphoryliert werden und auf diese Weise einen etwas zu hohen P.-Grad vortäuschen.

Um diese Frage zu entscheiden, wurden mehrfach Phosphorylierungsversuche mit ROS aus dunkeladaptierten Rinderaugen (s. Methoden) vorgenommen und Zeitverlauf und Endwert der Phosphorylierung mit denen nichtdunkeladaptierter ROS verglichen.

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen dunkeladaptierten und nicht dunkeladaptierten ROS (4 Versuche). Der durchschnittliche P.-Grad ist in beiden Fällen etwa 7 P/Rh.

Abb. 5 zeigt den Zeitverlauf der Reaktion mit einer "normalen" und einer dunkeladaptierten Präparation. Es ist lediglich ein Unterschied in der Anfangsgeschwindigkeit zu sehen, wie er in verschiedenen Präparationen immer auftritt. Wenn demnach in unseren Rinder-ROS tatsächlich ein nennenswerter Anteil an Opsin vorhanden sein sollte, so ist dieses Opsin jedenfalls nicht mehr phosphorylierbar und kann somit die Berechnungen nicht stören. Im übrigen wird auch Frosch-Rhodopsin 7-fach phosphoryliert (s. Versuch 3.4.3), und die Frösche werden routinemäßig vor der Präparation dunkeladaptiert.

3.1.3.2 Untersuchung von Rinder-Rhodopsin-Lösungen in Detergens auf Opsin-Gehalt mit Hilfe der Ammoniumsulfat-Fällung

Wie Makino und Mitarbeiter (1977) berichteten und wie eigene Versuche bestätigten, präzipitiert Opsin in Detergens-Lösung schon bei 40 % Sättigung mit Ammoniumsulfat, während Rhodopsin bei dieser Konzentration noch klar in Lösung bleibt. Das läßt sich deutlich demonstrieren mit Concanavalin-A-gereinigtem Rhodopsin in 2 %iger Ammonyx-Lösung (Extinktionsverhältnis $E_{280/500} = 1,7$). Diese Lösung bleibt im Dunkeln bei 40 % Sättigung mit Ammoniumsulfat völlig klar. Wird die Lösung jedoch kurz belichtet, so daß etwa 10 % des Rhodopsins gebleicht werden, und etwa 10 min bei Raumtemperatur belassen, dann zeigt sich eine deutliche Trübung, die während der nächsten 60 min noch zunimmt. Danach läßt sich die Lösung in einer Beckman-Zentrifuge bei 10 000 U/min wieder klarzentrifugieren. Dieser Vorgang kann mehrmals wiederholt werden, bis alles Rhodopsin gebleicht ist. Offenbar hat Opsin eine stärkere Neigung zu aggregieren als Rhodopsin und kann daher leichter gefällt werden. Dieser Versuch zeigt, daß bei der hier verwendeten Rhodopsin-Konzentration (1 mg/ml) ein Opsin-Gehalt von etwa 10 % bereits als deutliche Trübung erkennbar ist.

Wenn man eine nicht-dunkeladaptierte Rinder-ROS-Präparation in 2 % Ammonyx löst und die Lösung zu 40 % mit Ammoniumsulfat sättigt, bleibt sie ebenfalls klar. Das wiederholte Trüben der Lösung nach Belichtung mit je etwa 10 % Bleichung läßt sich

auch hier demonstrieren. Diese Tatsache ist ein weiterer wichtiger Hinweis darauf, daß unsere ROS-Präparationen, wenn überhaupt, dann nur sehr wenig Opsin enthalten.

3.1.3.3 Suche nach Opsin-Anteilen in ROS-Präparationen durch Regenerationsversuche mit 11-cis-Retinal

Opsin läßt sich bekanntlich mit 11-cis-Retinal zu Rhodopsin regenerieren. Wenn in einer Rhodopsin-Suspension Opsin vorhanden ist, sollte sich der meßbare Rhodopsin-Gehalt der Probe durch Inkubation mit 11-cis-Retinal steigern lassen. Acht Präparationen, die zum Teil von hellen Sonnentagen, zum anderen Teil von trüben Tagen stammten, wurden auf diese Weise untersucht. In keiner dieser acht Präparationen konnte eine Zunahme des Rhodopsin-Gehalts um mehr als maximal 4 % festgestellt werden, auch nicht bei sehr langer Inkubation (über Nacht) mit hohem Überschuß an 11-cis-Retinal. Außerdem wurden alle phosphorylierten Proben vor der Weiterbehandlung auf den Säulen routinemäßig mit 11-cis-Retinal regeneriert. Die Regenerationsrate lag fast immer zwischen 97 und 103 %. Ein einziges Mal wurde eine Rhodopsin-Probe zu 109 % regeneriert, aber diese Probe stammte nicht einmal von einem besonders hellen Tag. Ich habe daher angenommen, daß die Retinen oder die ROS-Suspension dieser einen Präparation einmal aus Versehen kurz be-
lichtet worden ist. Da sich der P.-Grad dieser Probe durch Reinigung auf der Concanavalin-A-Sepharose-Säule nicht mehr weiter erniedrigte, wurde diese Probe trotzdem für die Säulen-Kaskade weiterverwendet.

3.1.3.4 Concanavalin-A-Sepharose-Säulen mit teilweise gebleichtem Rhodopsin

Um festzustellen, ob sich Opsin auf der Concanavalin-A-Säule ebenso verhält wie Rhodopsin, wurde hochphosphoryliertes und regeneriertes Rhodopsin (P.-Grad 6.8 P/Rh) zu 50 % gebleicht, so daß der scheinbare P.-Grad (Phosphat pro durch E500 meßbares Rhodopsin) nun 13,6 P/Rh betrug. Die Suspension wurde in 2 % Ammonyx gelöst und über eine Concanavalin-A-Sepharose-Säule gegeben. Nach Elution des Rhodopsins wurde der P.-Grad erneut bestimmt. Diesmal ergab sich ein Wert von 8,8 P/Rh; offenbar wird Opsin nicht wie Rhodopsin vollständig von der Säule eluiert. Es müssen $\frac{(13,6-8,8) 100}{6,8} = 71$ % des Opsins auf

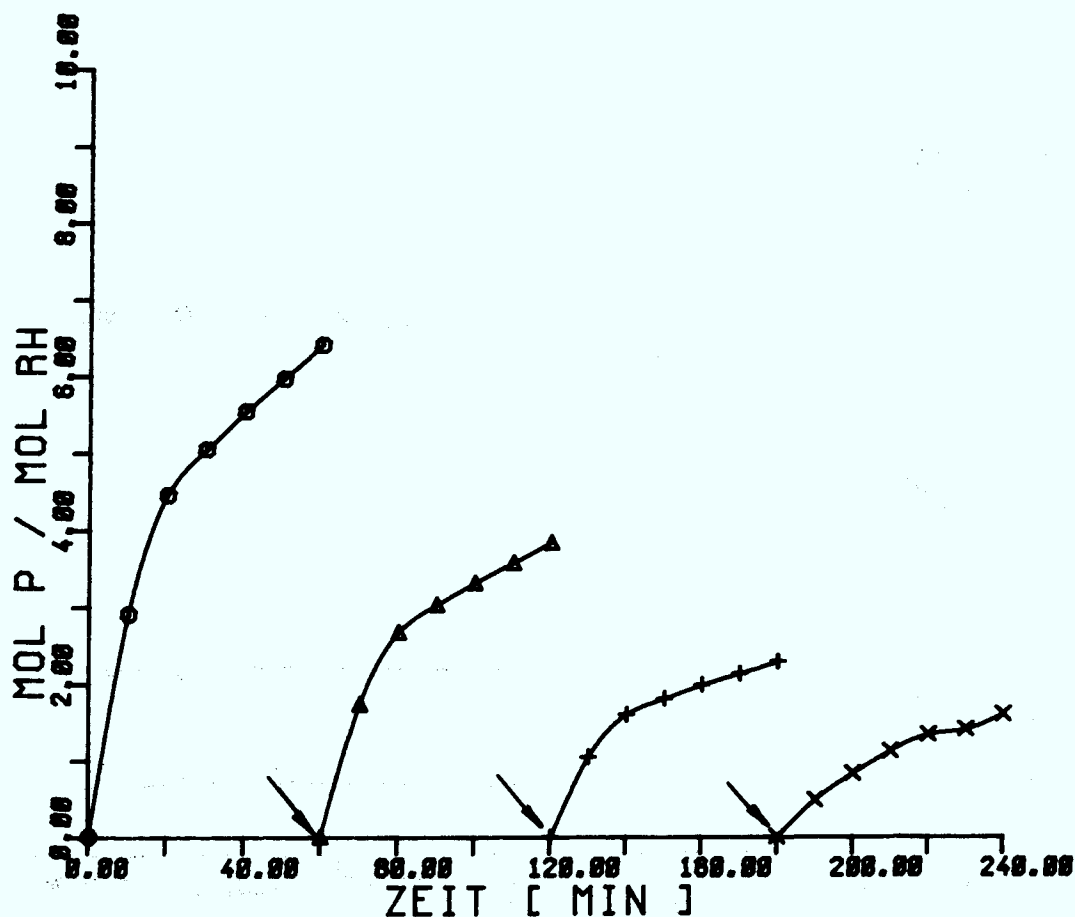


Abb. 6 Phosphorylierung nach Prä-Inkubation für verschiedene Zeiten bei 30° C, danach erst ATP-Zugabe und Belichtung. Inkubationsmedium: 100 mM NaPP, 1 mM MgCl₂, pH 7,4. Die Pfeile zeigen jeweils die Zugabe von 3 mM ATP und das gleichzeitige Einsetzen der Belichtung an.

der Säule geblieben sein. Der Versuch wurde noch mehrmals, auch mit anderen Bleichungsraten und mit Emulphogen und Octylglucosid als Detergens, wiederholt. Das Ergebnis schien ein wenig vom Detergens abhängig zu sein, aber immer blieben 65-75 % des Opsins auf der Säule. Das bedeutet: Wenn eine phosphorylierte ROS-Suspension Opsin enthält, dann muß sich der P.-Grad nach der Reinigung auf der Concanavalin-A-Sepharose-Säule scheinbar ändern. Bei fast allen untersuchten Rhodopsin-Präparationen erniedrigte sich der P.-Grad nach der Concanavalin-A-Sepharose-Säule um höchstens 2-3 %. Es können also höchstens 4-5 % Opsin in den Präparationen vorhanden gewesen sein.

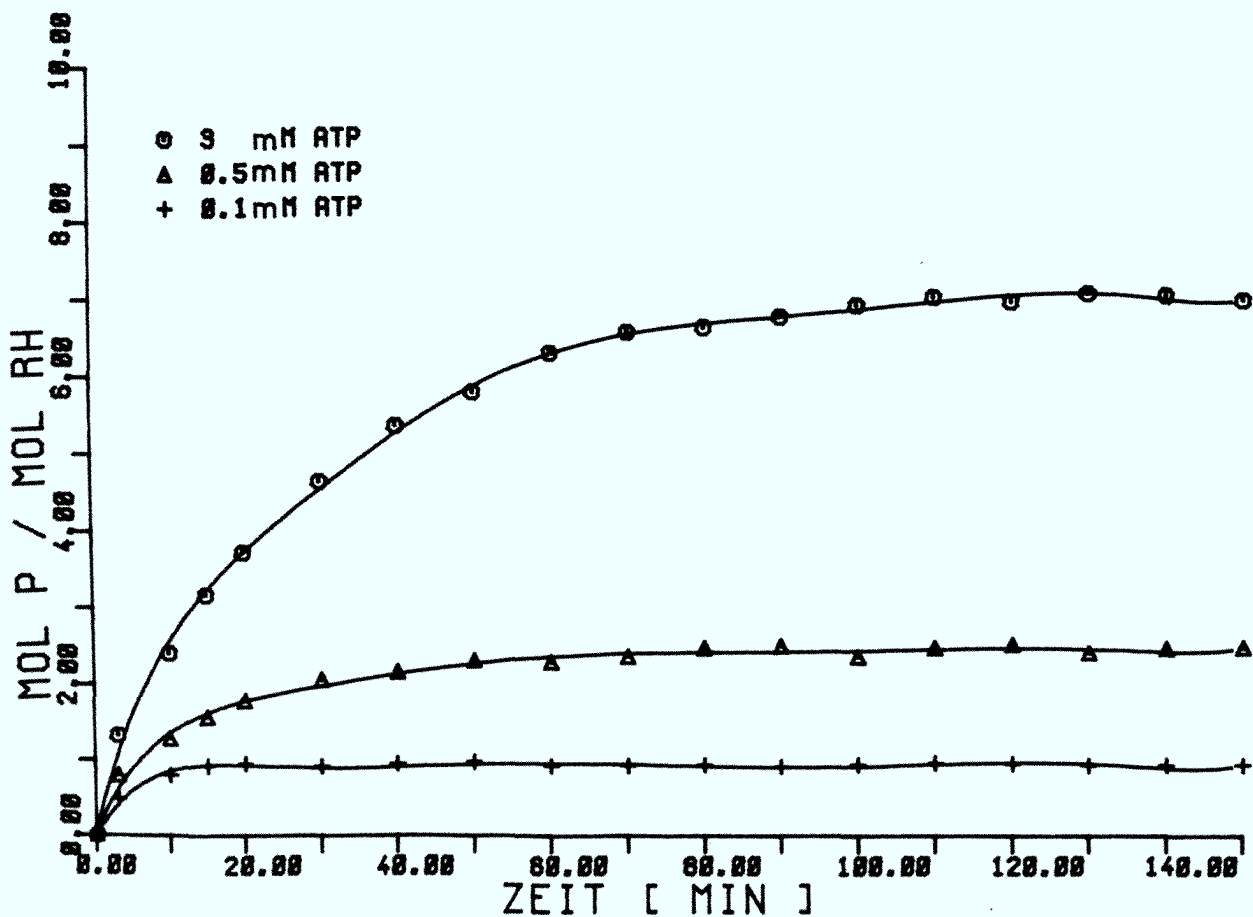


Abb. 7 Einfluß der ATP-Konzentration auf Initialgeschwindigkeit und Endwert der Phosphorylierung. Inkubationsmedium: 100 mM NaPP, 1 mM $MgCl_2$, pH 7,4.

3.2 Einfluß verschiedener Reaktionsbedingungen

3.2.1 Der Einfluß einer Prä-Inkubation bei 30° C auf die Phosphorylierbarkeit

Wenn Rinder-ROS-Suspensionen vor dem Einsetzen der Belichtung in der Inkubationslösung ohne ATP 1-3 Std. im Dunkeln gehalten werden, geht die Anfangsgeschwindigkeit der Phosphorylierung nach Einsetzen der Belichtung deutlich zurück (Abb. 6). Die Pfeile zeigen jeweils den Beginn der Belichtung und die ATP-Zugabe an. Die Verlangsamung der Phosphorylierungsreaktion ist wohl auf Abbau oder Inaktivierung der Kinase zurückzuführen. Vermutlich fehlt unter Inkubationsbedingungen ein die Kinase stabilisierender Faktor. Rhodopsin selbst wird innerhalb von 3 Std. bei 30° C kaum angegriffen, solange es sich in seiner natürlichen Phospholipid-Umgebung befindet und solange die

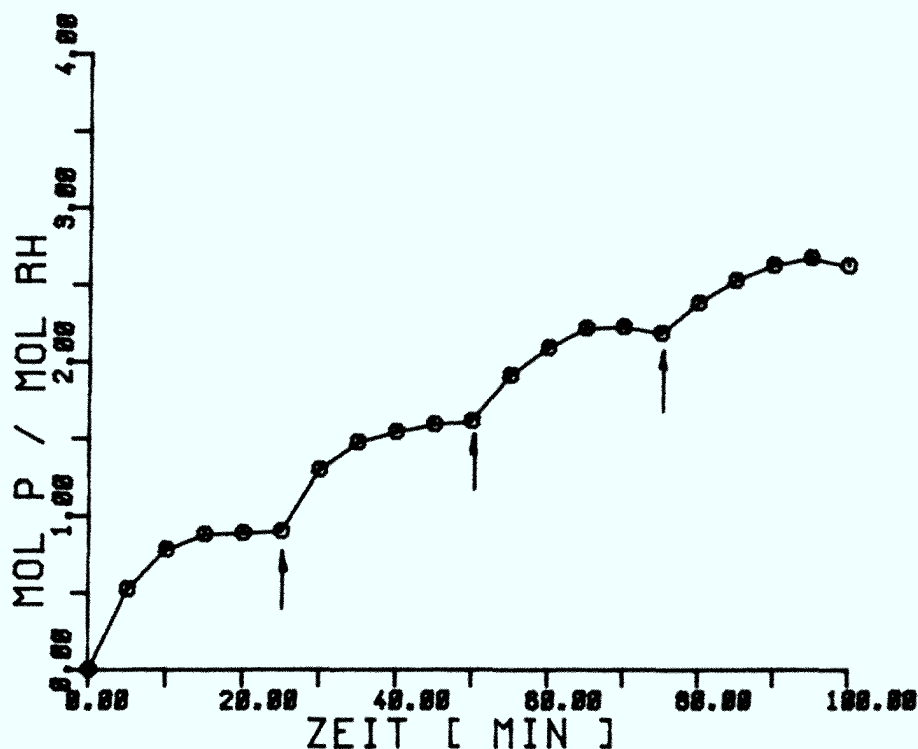


Abb. 8 Phosphorylierungsversuch mit 0,1 mM ATP. Alle 25 min wurde erneut 0,1 mM ATP zugeben. Die Pfeile zeigen jeweils die ATP-Zugabe an.

Ionenstärke des Mediums einigermaßen physiologisch ist.

3.2.2 Der Einfluß der ATP-Konzentration

Wie Abb. 7 zeigt, sind Phosphorylierungsgeschwindigkeit und Endwert der Phosphorylierung in hohem Grade von der ATP-Konzentration abhängig. Ferner ist aus Abb. 7 zu sehen, daß bei niedriger ATP-Konzentration die Reaktion schon nach kurzer Inkubationszeit beendet ist, obwohl der maximal mögliche P.-Grad noch lange nicht erreicht ist. Das läßt darauf schließen, daß nicht mehr genügend ATP vorhanden ist. Für die Phosphorylierung des Rhodopsins kann es jedoch nicht ausschließlich verbraucht worden sein, denn schon bei einer ATP-Konzentration von nur 0,1 mM liegt ATP in 8-fachem molaren Überschuß über Rhodopsin vor. Vermutlich hat eine ROS-eigene ATPase-Aktivität das meiste ATP verbraucht. In der Tat haben einige Autoren (Uhl

et al, 1979, Thacher 1978, Berman et al, 1977) in gereinigten Rinder-ROS-Suspensionen eine hohe Mg-ATPase-Aktivität nachgewiesen.

Um die Vermutung, daß das ATP verbraucht worden ist, zu überprüfen, wurde die gleiche Präparation wie in Abb. 7 mit 0,1 mM ATP inkubiert und alle 25 min erneut mit 0,1 mM ATP versetzt. Abb. 8 zeigt, daß tatsächlich nach jeder ATP-Zugabe die Reaktion wieder einsetzt, allerdings mit jedem Mal etwas schwächer. Die Abnahme ist wahrscheinlich auf eine allmähliche Inaktivierung der Kinase zurückzuführen.

3.2.3 Der Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration

Sowohl Reaktionsgeschwindigkeit als auch der maximale P.-Grad sind bei gegebener ATP-Konzentration stark von der Mg^{2+} -Konzentration abhängig. Abb. 9 zeigt diese Abhängigkeit bei einer ATP-Konzentration von 3 mM mit 0,1, 1,0 und 10 mM Mg^{2+} . Das Inkubationsmedium ist hier 100 mM Tris-HCl, pH 7,4. Die Reaktion verläuft hier wesentlich rascher und bis zu einem viel höheren Endwert mit 1,0 mM Mg^{2+} als mit 0,1 mM Mg^{2+} . Ist dagegen die ATP-Konzentration nur 0,1 mM, dann liegen die Verhältnisse eher umgekehrt, wie Abb. 10 zeigt: Hier wirken höhere Mg^{2+} -Konzentrationen inhibitorisch. Die höchsten P.-Grade werden allgemein erzielt, wenn die Mg^{2+} -Konzentration etwa 1/3 der ATP-Konzentration ist (Kühn und Wilden, 1981).

3.2.4 Der Einfluß von Na^+ und K^+

Nach Shichi und Somers (1978) soll eine Na^+ -Konzentration von 100 mM die Phosphorylierung zu 90 % hemmen, während K^+ keinen Einfluß ausüben soll. Nun arbeiten Shichi und Somers aber mit Inkubationsbedingungen, die zu einem P.-Grad von höchstens 0,8 - 1,0 P/Rh führen. Um festzustellen, ob sich eine ähnliche Hemmwirkung von Na^+ auch bei für die Phosphorylierung optimalen Bedingungen nachweisen läßt, wurde eine ROS-Präparation in drei Teile geteilt. Der 1. Teil wurde mit 150 mM Tris-HCl, der 2. Teil mit 50 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, der 3. Teil mit 50 mM Tris-HCl + 100 mM KCl phosphoryliert. Die Zeitverläufe wurden aufgezeichnet und verglichen (Abb. 11). Bis auf die bereits erwähnte Tatsache, daß in Tris-HCl ein wenig schneller

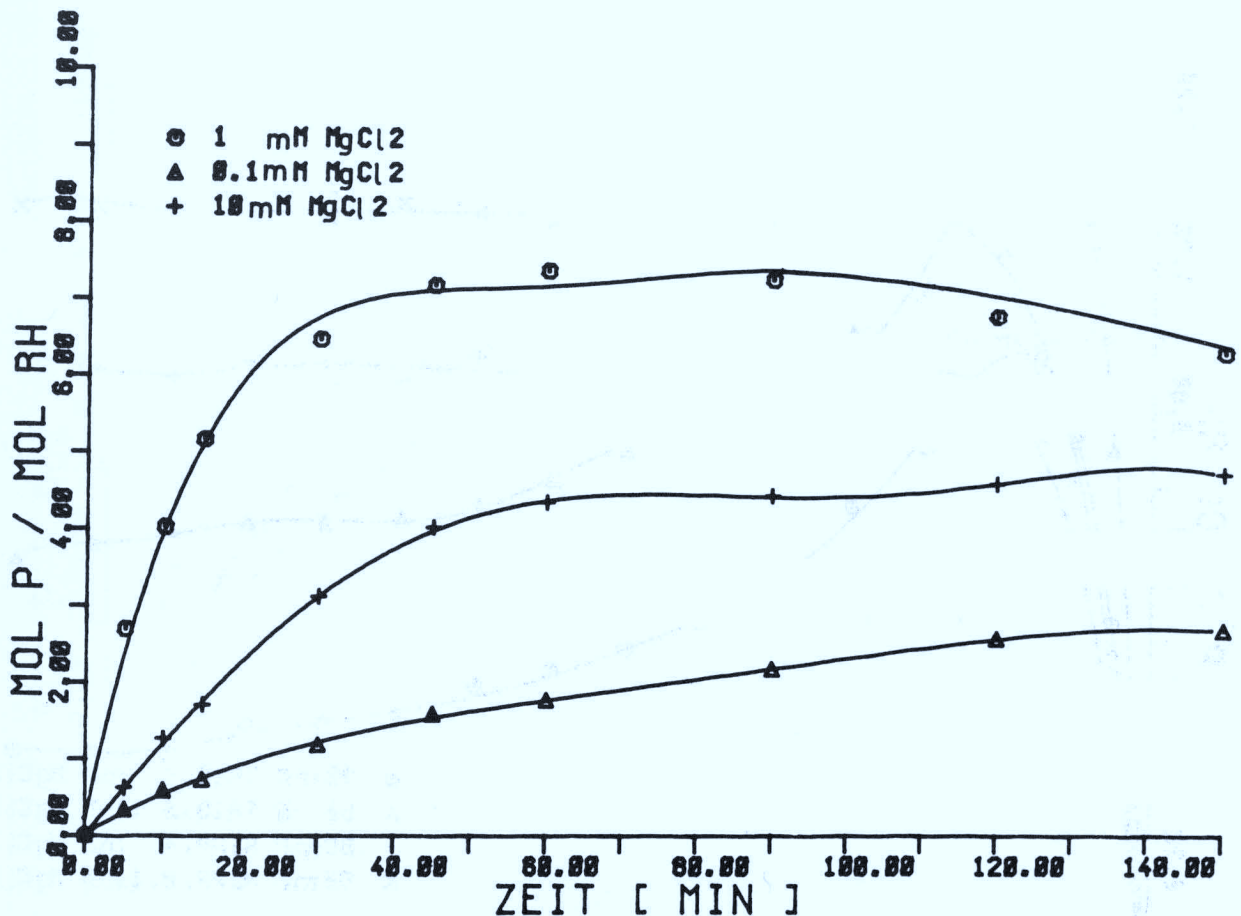


Abb. 9 Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf Initialgeschwindigkeit und Endwert der Phosphorylierung. Inkubationsmedium: 100 mM Tris-HCl, 3 mM ATP, pH 7,4.

phosphoryliert wird, war kein Unterschied festzustellen (4 Versuche). Daraufhin wurde der gleiche Versuch noch einige Male unter Shichi's Inkubationsbedingungen (0,1 mM ATP, 4 mM $MgCl_2$) wiederholt. Diesmal zeigte sich eine geringe Hemmwirkung von Na^+ (Abb. 12), die jedoch nicht größer war als 10-20 % (5 Versuche). Worauf dieser Unterschied zwischen Shichi's und meinen Ergebnissen beruht, ist unklar.

3.2.5 Verlauf der Phosphorylierung mit GTP

Mit 3 mM GTP verläuft die lichtinduzierte Phosphorylierung sehr viel langsamer als mit ATP. Ferner zeigt sich mit GTP eine höhere Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Inkubationsmedium als mit ATP (Abb. 13). Auffallend ist dabei,

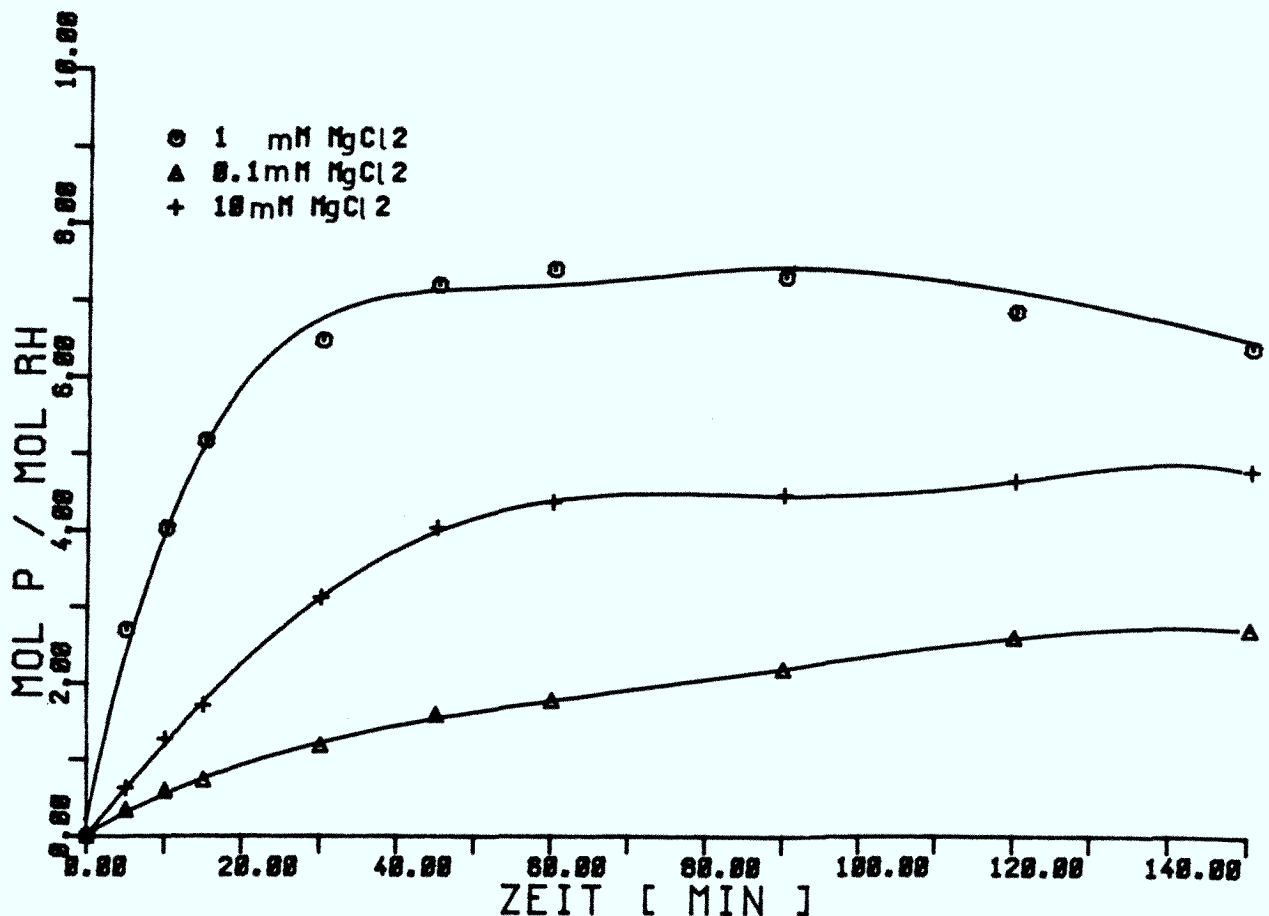


Abb. 9 Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf Initialgeschwindigkeit und Endwert der Phosphorylierung. Inkubationsmedium: 100 mM Tris-HCl, 3 mM ATP, pH 7,4.

phosphoryliert wird, war kein Unterschied festzustellen (4 Versuche). Daraufhin wurde der gleiche Versuch noch einige Male unter Shichi's Inkubationsbedingungen (0,1 mM ATP, 4 mM $MgCl_2$) wiederholt. Diesmal zeigte sich eine geringe Hemmwirkung von Na^+ (Abb. 12), die jedoch nicht größer war als 10-20 % (5 Versuche). Worauf dieser Unterschied zwischen Shichi's und meinen Ergebnissen beruht, ist unklar.

3.2.5 Verlauf der Phosphorylierung mit GTP

Mit 3 mM GTP verläuft die lichtinduzierte Phosphorylierung sehr viel langsamer als mit ATP. Ferner zeigt sich mit GTP eine höhere Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Inkubationsmedium als mit ATP (Abb. 13). Auffallend ist dabei,

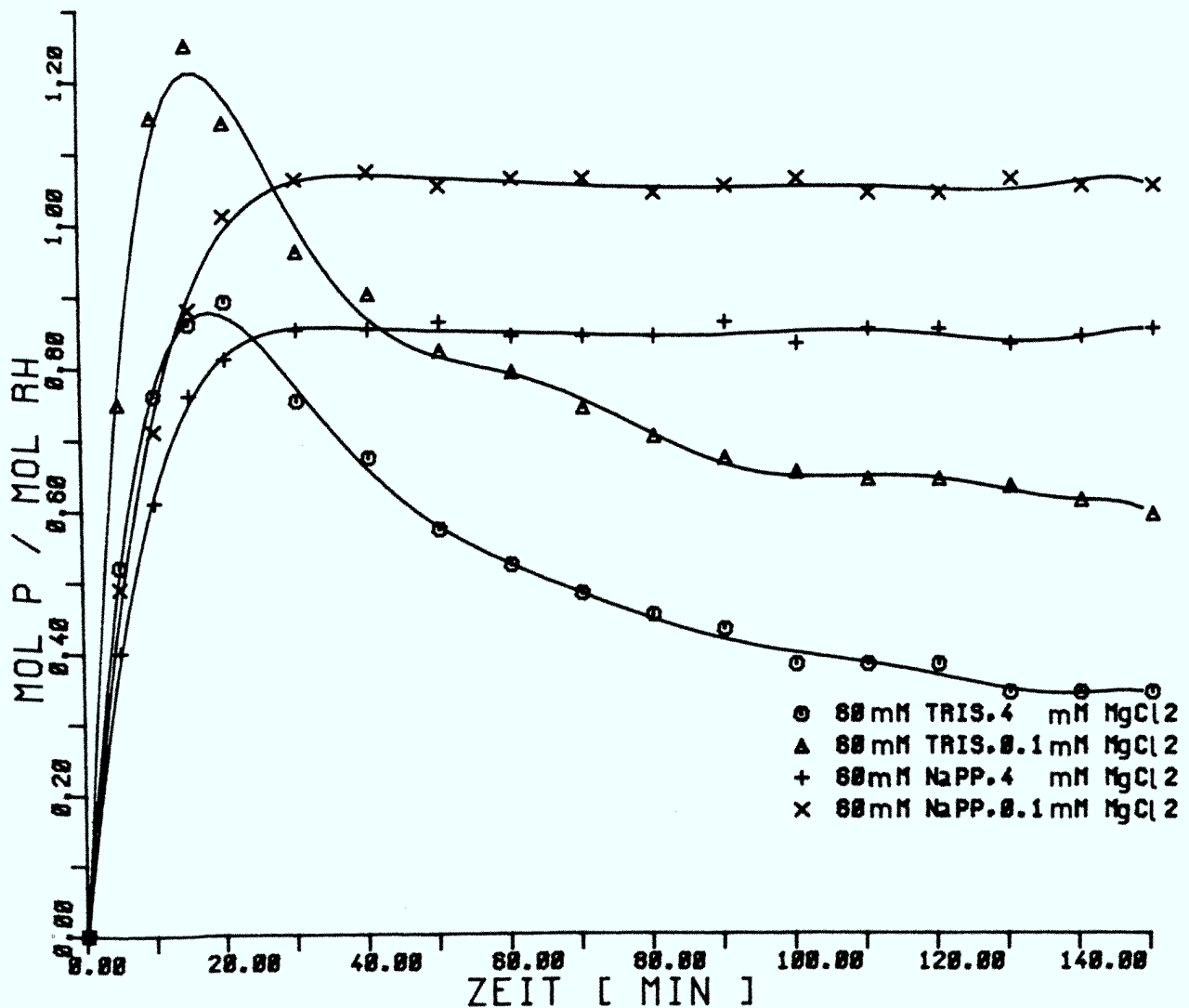


Abb. 10 Abhängigkeit der Phosphorylierung von der Mg^{2+} -Konzentration in 60 mM Tris-HCl und in 60 mM NaPP, ATP-Konzentration jeweils 0,1 mM, pH 7,4.

daß der Verlauf über mehrere Stunden nahezu linear bleibt, obwohl, wie an anderer Stelle demonstriert, die Aktivität der ATP-Kinase während dieser Zeit stark abnimmt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, daß ATP-Kinase und GTP-Kinase vielleicht nicht miteinander identisch sind.

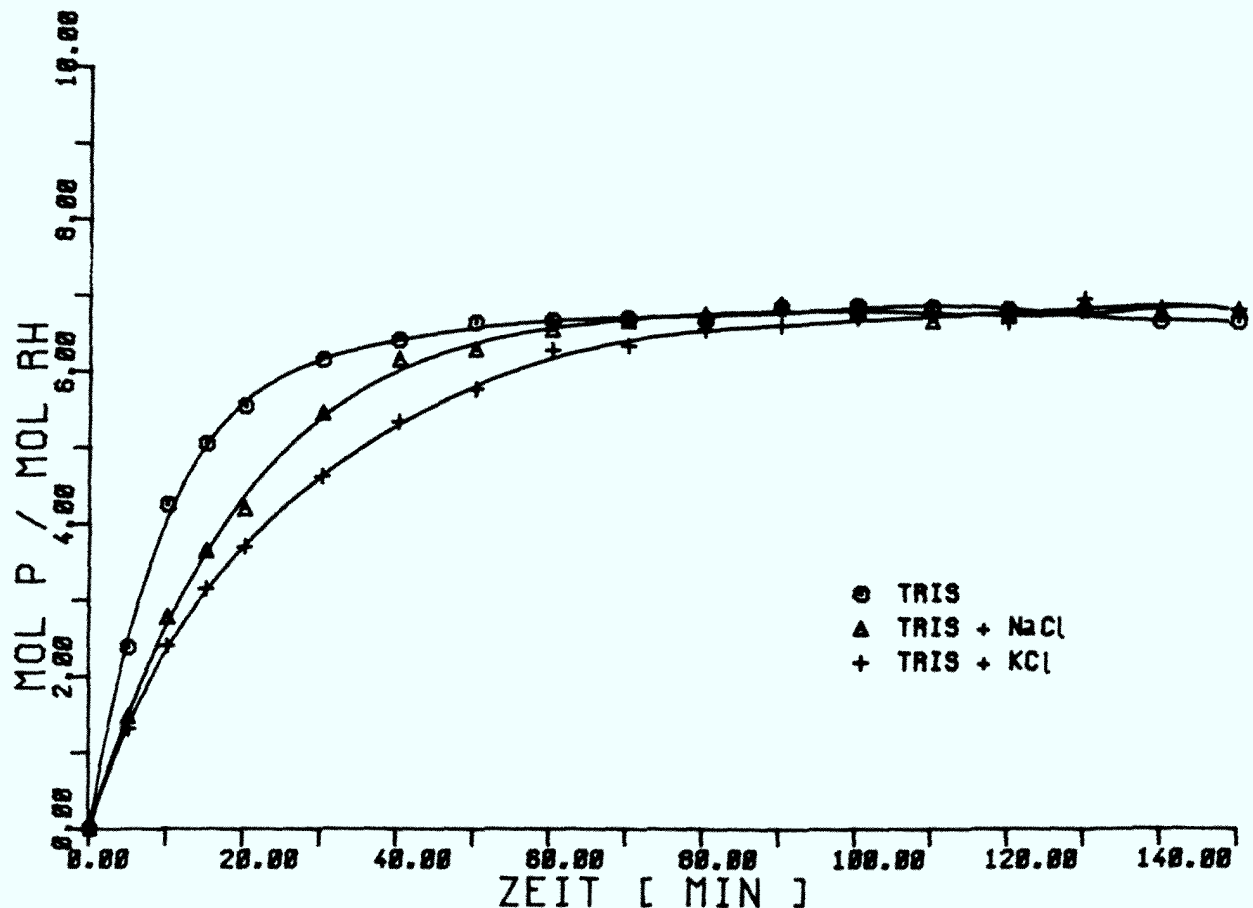


Abb. 11 Einfluß von Na^+ und K^+ auf die Phosphorylierung unter optimalen Bedingungen. (ATP-Konzentration 3 mM, Mg^{2+} -Konzentration 1 mM, pH 7,4) 1. 150 mM Tris-HCl, 2. 50 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, 3. 50 mM Tris-HCl + 100 mM KCl.

3.2.6 Die Phosphorylierung mit Orange-Licht

Bei Belichtung mit weißem Licht kann freies all-trans-Retinal durch den Anteil an Blaulicht mit Wellenlängen unter 400 nm zu 11-cis-Retinal photoisomerisiert werden und anschließend mit freiem Opsin zu Rhodopsin regenerieren. Dies regenerierte Rhodopsin kann dann aufs neue gebleicht werden. Um dieses "Recycling" (McDowell und Kühn, 1977) auf ein Minimum zu reduzieren, wurde in einigen Versuchen ein Filter aus orangem Plexiglas zwischen Lichtquelle und Probe angebracht. Das Filter hält alle Wellenlängen unter 530 nm zurück.

Den Zeitverlauf der Phosphorylierung mit Orange-Licht zeigt Abb. 14. Der maximale P.-Grad liegt unter diesen Bedingungen

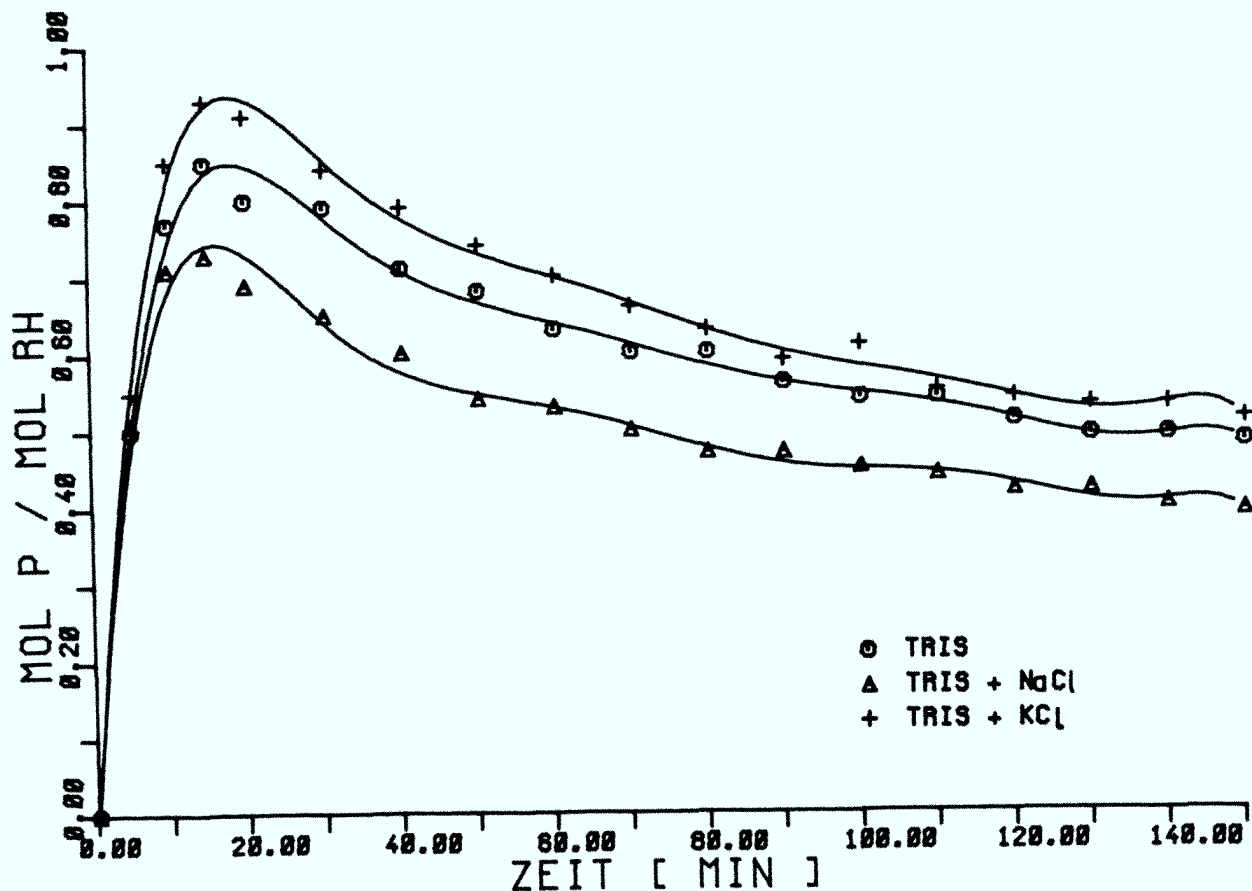


Abb. 12 Einfluß von Na^+ und K^+ auf Phosphorylierung und Dephosphorylierung unter nicht optimalen Bedingungen. Inkubationsmedium: 1. 160 mM Tris-HCl, 2. 60 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, 3. 60 mM Tris-HCl + 100 mM KCl, MgCl_2 jeweils 4 mM, ATP 0,1 mM, pH 7,4.

nur bei 6,0 P/Rh.

3.3 Auftrennung nach verschiedenen P.-Graden

Bisher wurden nur durchschnittliche P.-Grade beschrieben, ohne Aufschluß darüber, wie hoch einzelne Rhodopsin-Moleküle phosphoryliert sind. Deshalb wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie herauszufinden, ob bei einem bestimmten durchschnittlichen P.-Grad die einzelnen Rhodopsin-Moleküle unterschiedliche P.-Grade aufweisen.

Bei pH 6,0, dem isoelektrischen Punkt des unphosphorylierten Rhodopsins (Kühn und McDowell, 1977) bindet Ecteola-Cellulose phosphoryliertes Rhodopsin, während unphosphoryliertes Rhodopsin

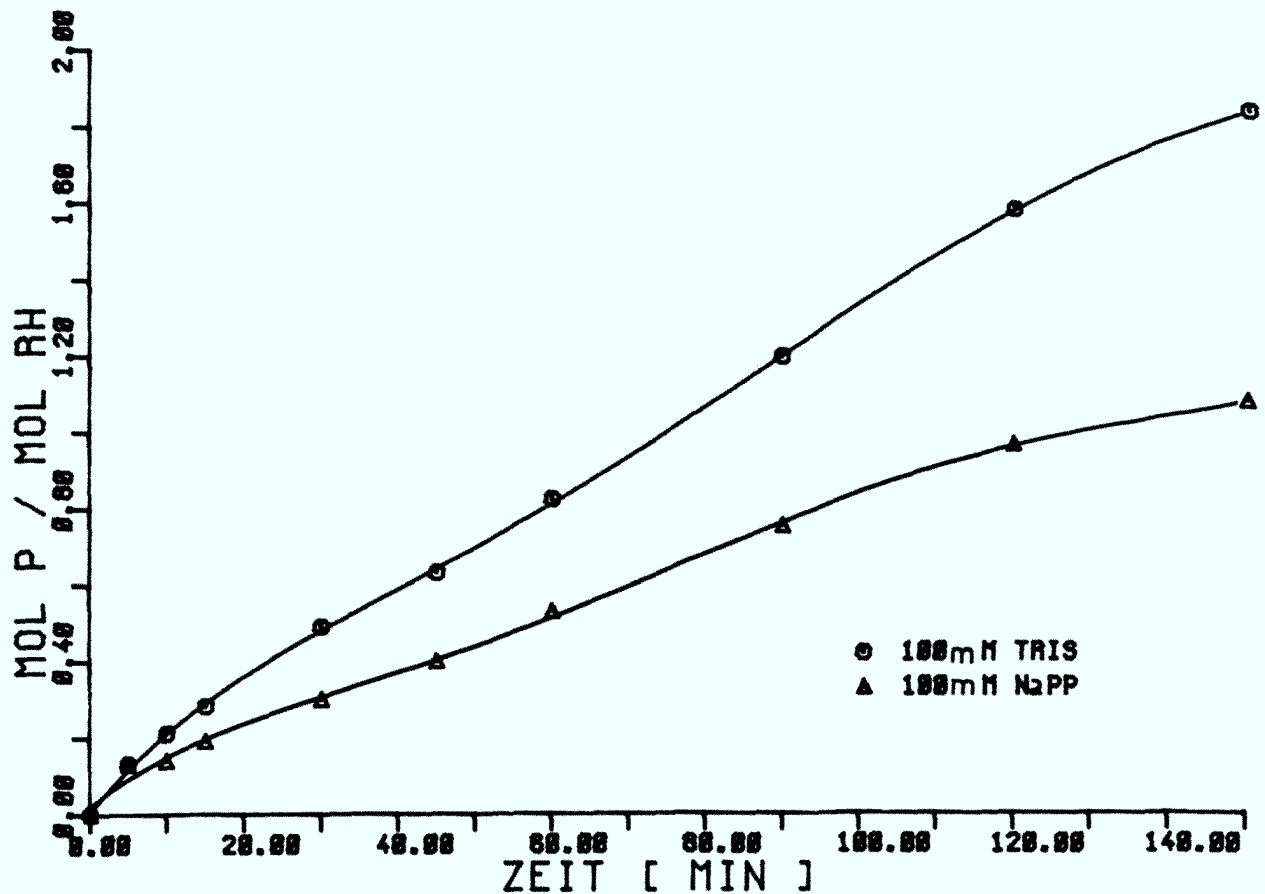


Abb. 13 Zeitverlauf der Phosphorylierung mit GTP in 100 mM Tris-HCl und in 100 mM NaPP. GTP jeweils 3 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,4.

die Säule frei passiert. Darüber hinaus werden unterschiedlich hoch phosphorylierte Rhodopsine, da sie unterschiedliche Netto-ladungen tragen, vermutlich unterschiedlich fest an Ecteola-Cellulose gebunden. Daher sollten sie unter geeigneten Elutionsbedingungen voneinander trennbar sein.

Shichi und Somers (1978) versuchten mit Hilfe einer Ecteola-Cellulose-Säule phosphoryliertes Rhodopsin vom unphosphorylierten abzutrennen. Der durchschnittliche P.-Grad ihrer ROS-Präparationen war 0,7 - 0,8 P/Rh. Sie fanden den größten Teil des Rhodopsin (84 %) unphosphoryliert, während der Rest von 16 % 5-fach phosphoryliert sein sollte.

Ich habe versucht, Rhodopsin mit durchschnittlichen P.-Graden zwischen 1 und 7 P/Rh auf die gleiche Weise aufzutrennen. Im

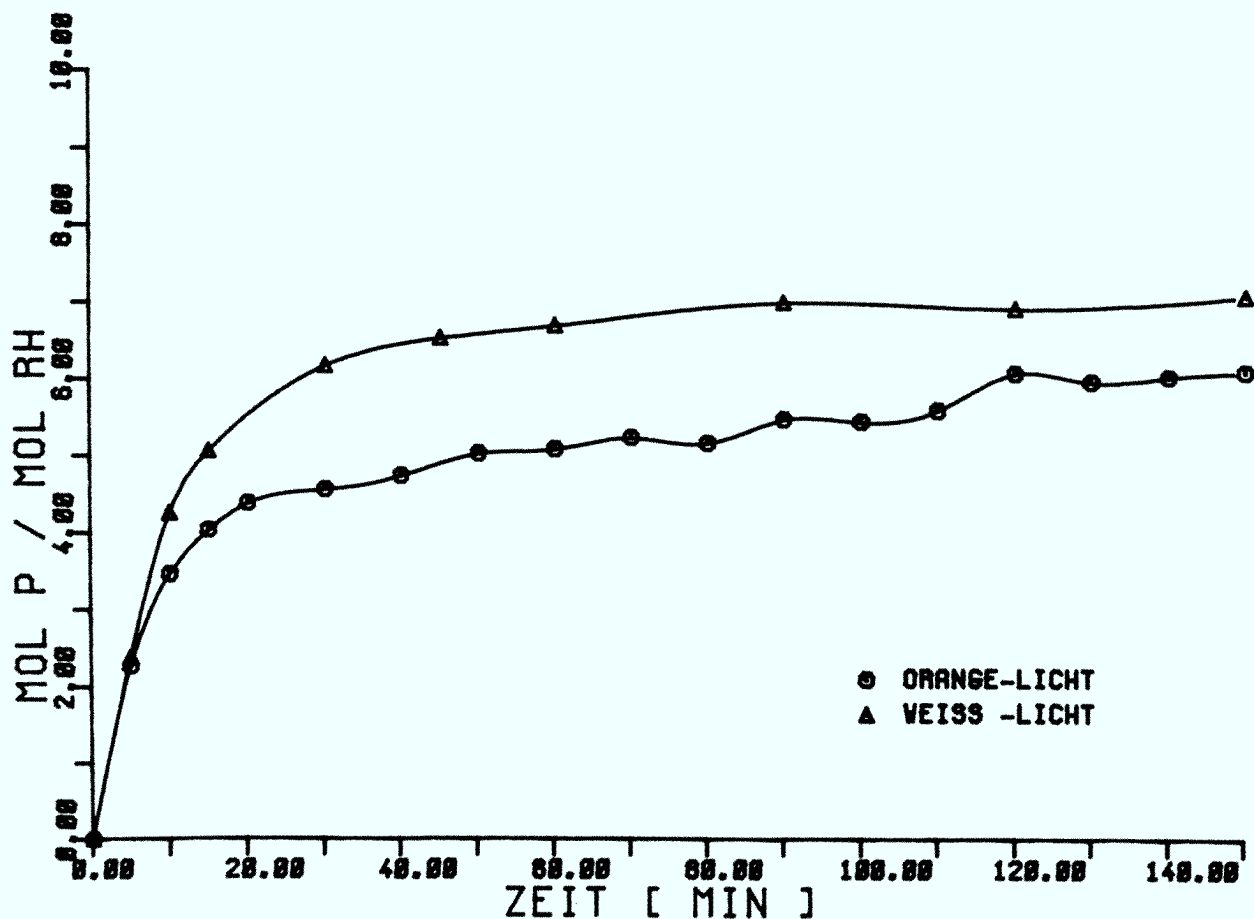


Abb. 14 Vergleich des Zeitverlaufs der Phosphorylierung unter kontinuierlichem Weiß- oder Orangelicht. Bei Orange-Licht ist das "Recycling" (s. Text) stark vermindert. Inkubationsmedium: 100 mM NaPP, 3 mM ATP, 1 mM MgCl_2 , pH 7,4.

Gegensatz zu Shichi und Somers habe ich das phosphorylierte und regenerierte Rhodopsin vorher auf einer Concanavalin-A-Sephrose-Säule gereinigt, um Lipide, überschüssiges 11-cis-Retinal und vor allem evtl. vorhandene Rest nicht inkorporierter Radioaktivität (AT^{32}P oder $^{32}\text{P}_i$) zu entfernen. Dadurch wird die Trennung auf der Ecteola-Cellulose-Säule klarer, und die Kapazität für Rhodopsin wird erhöht, weil kein Phospholipid mitgebunden wird. Weiterhin wird die spektrale Auswertung genauer (kein störendes freies Retinal) und die Bestimmung des P.-Grades sicherer. Das Eluat von der Concanavalin-A-Sephrose-Säule wurde nach Bestimmung der Rhodopsin-Konzentration, des P.-Grades und des Koeffizienten $\text{E}_{280/500}$ (meist

1,65 - 1,80) direkt auf die Ecteola-Cellulose-Säule aufgetragen. Es ging dabei vor allem um die Frage, ob es am einzelnen Rhodopsin-Molekül tatsächlich nur zwei Möglichkeiten gibt: entweder voll durchphosphoryliert oder unphosphoryliert. Da in Rhodopsin-Suspensionen durchschnittliche P.-Grade von bis zu 7 P/Rh erreicht werden konnten, hätten die beiden möglichen Stufen der Phosphorylierung nicht 0 und 5 P/Rh, sondern 0 und mindestens 7 P/Rh sein müssen.

Es erwies sich als äußerst schwierig, mit einer einzigen langen Ecteola-Säule, wie Shichi und Somers sie benutzten, wirklich gute und saubere Trennungen zu erzielen. Das Rhodopsin blieb auf der Säule nicht stabil. Häufig war ein großer Teil des eingesetzten Rhodopsins (bis zu 50 %) im Eluat nicht mehr spektralphotometrisch erfaßbar, während die Radioaktivität zu 90 - 95 % im Eluat wiedergefunden wurde. Vor allem hochphosphoryliertes Rhodopsin, das zuletzt eluiert wird und daher am längsten im Elutionspuffer auf der Säule verweilt, war meist schon denaturiert. Oft war in den letzten Fraktionen, obwohl sie noch hohe Radioaktivität zeigten, überhaupt keine Absorption bei 500 nm mehr meßbar. Dagegen zeigte eine deutliche Gelbfärbung das Vorhandensein von freiem Retinal an. Trotz dieser Einschränkungen wiesen die Ergebnisse mit der Einzelsäule deutlich darauf hin, daß es

1. am einzelnen Rhodopsin-Molekül zumindest mehrere Zwischenstufen der Phosphorylierung gibt und daß
2. der P.-Grad von 7 P/Rh nicht der höchst mögliche ist.

Mit einer verbesserten Trennmethode (Ecteola-Säulen-Kaskade, s. Methoden) konnte dann gezeigt werden, daß Rhodopsin-Moleküle mit allen P.-Graden zwischen 0 und 9 P/Rh existieren. Das Ergebnis war unerwartet, vor allem der hohe P.-Grad von 9 P/Rh. In der Literatur finden sich kaum Angaben über vergleichbar hoch phosphorylierte Proteine. Deshalb wurde sorgfältig überprüft, ob die P.-Grade von 8 und 9 P/Rh nicht etwa durch denaturiertes Rhodopsin vorgetäuscht wurden. Wenn auf der Säulen-Kaskade Rhodopsin zerfallen wäre, müßte die eingesetzte Aktivität zu einem höheren Prozentsatz wiedergewonnen werden als das eingesetzte Rhodopsin. Das war nicht der Fall. Rhodopsin und Radioaktivität wurden zu je 90 - 95 % in

den Rhodopsin-Fraktionen wiedergefunden. Der berechnete durchschnittliche P.-Grad aller Rhodopsin-Fraktionen war nicht signifikant von dem durchschnittlichen P.-Grad der auf die Säulen aufgetragenen Probe verschieden. Daraus ist zu schließen, daß auf der Säulen-Kaskade kein Rhodopsin zerfallen sein kann. Der Koeffizient $E_{280}/500$ läßt sich für die Rhodopsin-Fraktionen von der Ecteola-Säulen-Kaskade leider nicht als Reinheitskriterium heranziehen, da von Ecteola-Cellulose immer eine Substanz miteluiert wird, die bei 280 nm sehr stark absorbiert. Aus diesem Grunde wurden einige Rhodopsin-Fraktionen mit den P.-Graden 8 und 9 P/Rh auf einer Concanavalin-A-Sephrose-Säule von diesen unbekannten, UV-absorbierenden Substanzen befreit. Nun ließ sich das Verhältnis $E_{280}/500$ exakt bestimmen. Es lag bei allen untersuchten Proben zwischen 1,65 und 1,75. Der P.-Grad lag nach der Concanavalin-A-Säule unverändert bei 8 oder 9 P/Rh. Es dürfte damit ganz sicher sein, daß Rhodopsin bis zu 9-fach phosphorylierbar ist.

Um zu überprüfen, ob die in den einzelnen Fraktionen beobachteten P.-Grade von 1 bis 8 P/Rh nicht etwa Gemische aus den beiden P.-Graden 0 und 9 darstellten, wurde einige Male eine Fraktion mit dem P.-Grad 9 P/Rh mit der gleichen Menge unphosphorylierten Rhodopsins gemischt und die Mischung nach Reinigung auf einer Concanavalin-A-Säule erneut über eine Ecteola-Säulen-Kaskade gegeben. Dabei wurden nur Rhodopsin-Fraktionen mit den P.-Graden 0 und 9 P/Rh gefunden, d. h. die beiden Komponenten wurden wieder vollständig getrennt.

Je nach dem durchschnittlichen P.-Grad der untersuchten Rhodopsin-Probe sind die P.-Grade in den einzelnen Fraktionen von der Säulen-Kaskade unterschiedlich verteilt (s. Abb. 15 und 16). Bei einem durchschnittlichen P.-Grad von 1 P/Rh sind nur die P.-Grade von 0 bis 5 P/Rh zu finden, während bei einem durchschnittlichen P.-Grad von 7 P/Rh alle P.-Grade von 0 bis 9 P/Rh auftreten. Der P.-Grad in den einzelnen Fraktionen ist - wie zu erwarten - zumeist nicht ganzzahlig, denn dazu müßte jede einzelne Säule zufällig genau richtig dimensioniert sein (s. Methoden). Die aufgetrennten Fraktionen sind also immer noch Gemische aus mehreren - vermutlich hauptsächlich 2 - P.-Graden. Um festzustellen, ob eine Fraktion von der Ecteola-

Säulen-Kaskade mit einem nicht ganzzahligen P.-Grad im wesentlichen nur ein Gemisch aus den beiden angrenzenden ganzzahligen P.-Graden darstellt, wurden einige der fraglichen Fraktionen mit Hilfe einer Concanavalin-A-Säule von NaCl gereinigt und erneut über einer Reihe von 4-5 kleinen Ecteola-Säulen aufgetrennt. Dabei wurden jedesmal annähernd nur die beiden angrenzenden P.-Grade gefunden, und wiederum Gemische aus beiden (s. Abb. 15 und 16, inset). Kleine Verunreinigungen mit Rhodopsinen anderer P.-Grade, die unterhalb der Meßgenauigkeit liegen, sind nicht auszuschließen. Ich halte es sogar für sehr wahrscheinlich, daß sie vorkommen. Der aus Rhodopsinkonzentration und Radioaktivität der Probe berechnete P.-Grad ist auf etwa $\pm 2\%$ genau zu bestimmen. Ein P.-Grad von z. B. 5,0 P/Rh bedeutet also, der Wert liegt zwischen 4,9 und 5,1 P/Rh (jeweils 3-4 Messungen). In dieser Probe könnten somit unmerklich bis zu 10 % Rhodopsin mit dem P.-Grad 4 oder 6 P/Rh vorhanden sein, oder bis zu 5 % mit dem P.-Grad 3 oder 7 P/Rh usw. Wenn solche kleinen Beimischungen aus Rhodopsinen anderer P.-Grade vorhanden sind, dann wahrscheinlich in allen Fraktionen, so daß sie sich teilweise wieder ausgleichen.

Wenn man aus den oben dargelegten Gründen annimmt, daß die Rhodopsin-Fraktionen von der Ecteola-Säulen-Kaskade in erster Näherung Gemische aus nur 2 P.-Graden sind, dann kann man für jeden dieser P.-Grade die zugehörige Rhodopsin-Menge leicht aus dem mittleren P.-Grad jeder Fraktion errechnen. Auf diese Weise läßt sich in % ausrechnen, wie hoch die Anteile der Rhodopsine mit den P.-Graden von 0 bis 9 P/Rh in der untersuchten Probe insgesamt gewesen sind. Hier ein Beispiel zur Verdeutlichung:

(PG = P.-Grad)

PG der untersuchten Probe: 2,9 P/Rh

						<u>insgesamt:</u>
Fraktion:	1	:	0,153 mg,	PG 6,9 = 0,138 mg	PG 7,0	
				+0,015 "	" 6,0	0,174 mg PG 7
"	2	:	0,120 "	" 6,3 = 0,036 "	" 7,0	0,263 " " 6
				+0,084 "	" 6,0	0,432 " " 5
"	3	:	0,102 "	" 6,0 = 0,102 "	" 6,0	0,962 " " 4
						0,426 " " 3
"	4	:	0,123 "	" 5,4 = 0,049 "	" 6,0	0,214 " " 2
				+0,074 "	" 5,0	0,232 " " 1
"	5	:	0,134 "	" 5,1 = 0,013 "	" 6,0	<u>0,907</u> " " 0
				+0,121 "	" 5,0	3,610 " " 2,8
"	6	:	0,169 "	" 4,8 = 0,135 "	" 5,0	
				+0,034 "	" 4,0	<u>also:</u>
"	7	:	0,247 "	" 4,3 = 0,074 "	" 5,0	4,8% PG 7
				+0,173 "	" 4,0	7,3% " 6
"	8	:	0,278 "	" 4,1 = 0,028 "	" 5,0	12,0% " 5
				+0,250 "	" 4,0	26,7% " 4
"	9	:	0,288 "	" 3,9 = 0,259 "	" 4,0	11,8% " 3
				+0,029 "	" 3,0	5,9% " 2
"	10	:	0,279 "	" 3,7 = 0,195 "	" 4,0	<u>25,1%</u> " 0
				+0,084 "	" 3,0	100,0%
"	11	:	0,255 "	" 3,2 = 0,051 "	" 4,0	
				+0,204 "	" 3,0	
"	12	:	0,273 "	" 2,4 = 0,109 "	" 3,0	
				+0,164 "	" 2,0	
"	13	:	0,168 "	" 1,3 = 0,050 "	" 2,0	
				+0,118 "	" 1,0	
"	14	:	0,114 "	" 1,0 = 0,114 "	" 1,0	

nicht gebunden: 0,907 mg, PG 0,0

berechneter durchschnittlicher P.-Grad des gesamten eluierten und frei durchgelaufenen Rhodopsin: 2,8 P/Rh, der durchschnittliche PG hat sich also auf den Säulen kaum verändert.

Auf diese Weise wurden je 2 ROS-Präparationen mit Serien verschiedener durchschnittlicher P.-Grade zwischen 1 und 7 P/Rh untersucht. Dabei wurde angestrebt, möglichst ganzzahlige durchschnittliche P.-Grade in den Ausgangsproben für die Säulentrennung zu haben. Zu diesem Zweck wurde von jeder der beiden ROS-Präparationen ein Zeitverlauf der Phosphorylierung aufgenommen. Aus diesen Kurven wurde für jede Präparation abgelesen, zu welchem Zeitpunkt die Reaktion gestoppt werden mußte, um den jeweils gewünschten P.-Grad zu bekommen. Abb. 17 zeigt die berechnete Prozentuale Verteilung der einzelnen P.-Grade von 0 bis 9 P/Rh bei den verschiedenen durchschnittlichen P.-Graden von 1 bis 7 P/Rh.

Da von jedem durchschnittlichen P.-Grad 2 Proben aufgetrennt wurden (nämlich je eine von den beiden Präparationen a u. b, s. Tabelle II), bildet jeder %-Wert in der Abb. 17 einen Mittelwert aus diesen zwei Werten, die teilweise bis zu 40 % differieren, wie aus Tabelle II ersichtlich. Die Tabelle zeigt die errechnete prozentuale Aufteilung der P.-Grade von 0 bis 9 P/Rh in jeder der beiden Präparationen a und b bei allen 7 durchschnittlichen P.-Graden.

Um zu prüfen, ob der P.-Grad von 9 P/Rh kein in vitro-Artefakt ist, zurückzuführen auf Zerstörung der Ordnung in der Diskmembran durch ganz unphysiologisch starke Bleichungen, wurden auch schwächer gebleichte Proben (13-23 % Bleichung) phosphoryliert und der Auftrennung auf der Säulen-Kaskade unterzogen. Auch hier fanden sich bis zu 9-fach phosphorylierte Rhodopsin-Fraktionen, obwohl der durchschnittlich pro gebleichtes Rhodopsin erreichte P.-Grad niedriger war als 7 P/Rh.

Auch bei Phosphorylierungsversuchen mit Orange-Licht, welches das Recycling stark vermindert, fanden sich nach Auftrennung auf der Ecteola-Säulen-Kaskade P.-Grade von 8 und 9 P/Rh (Abb. 17).

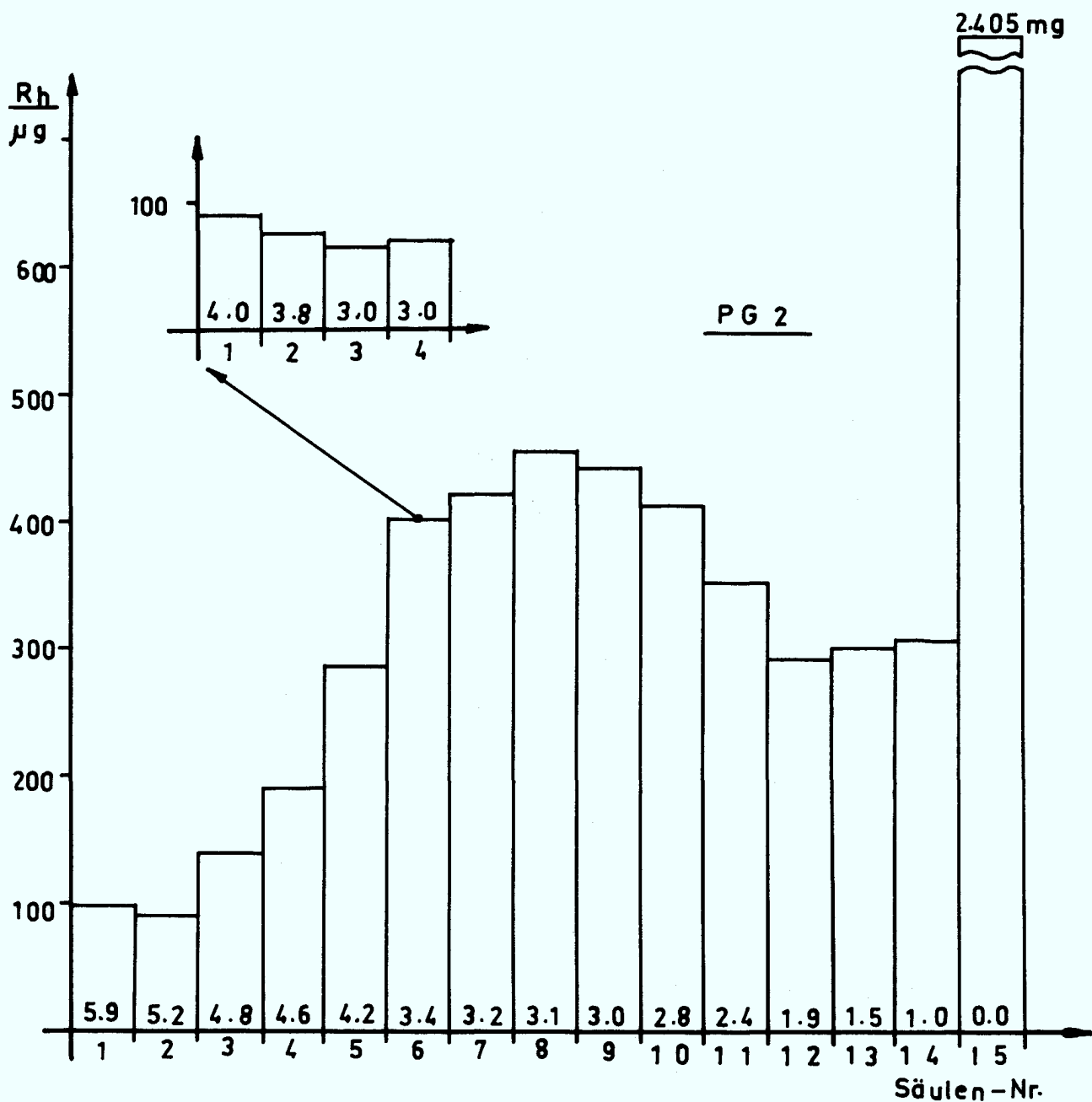


Abb. 15 Auftrennung einer Rhodopsin-Probe mit dem Durchschnitts-P.-Grad 2 P/Rh in Rhodopsin-Fractionen mit verschiedenen P.-Graden mit Hilfe der Ecteola-Säulen-Kaskade. Die Zahlen unter der x-Achse geben die Säulen-Nr. (= Fraktions-Nr.) an, die Zahlen über der x-Achse den P.-Grad der betreffenden Rhodopsin-Fraktion. Die Fraktion von Säule Nr. 6 (P.-Grad 3,4 P/Rh) wurde nach Reinigung auf einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule einer weiteren Auftrennung auf einer zweiten Ecteola-Säulen-Kaskade unterzogen (inset). Einzelheiten s. Text.

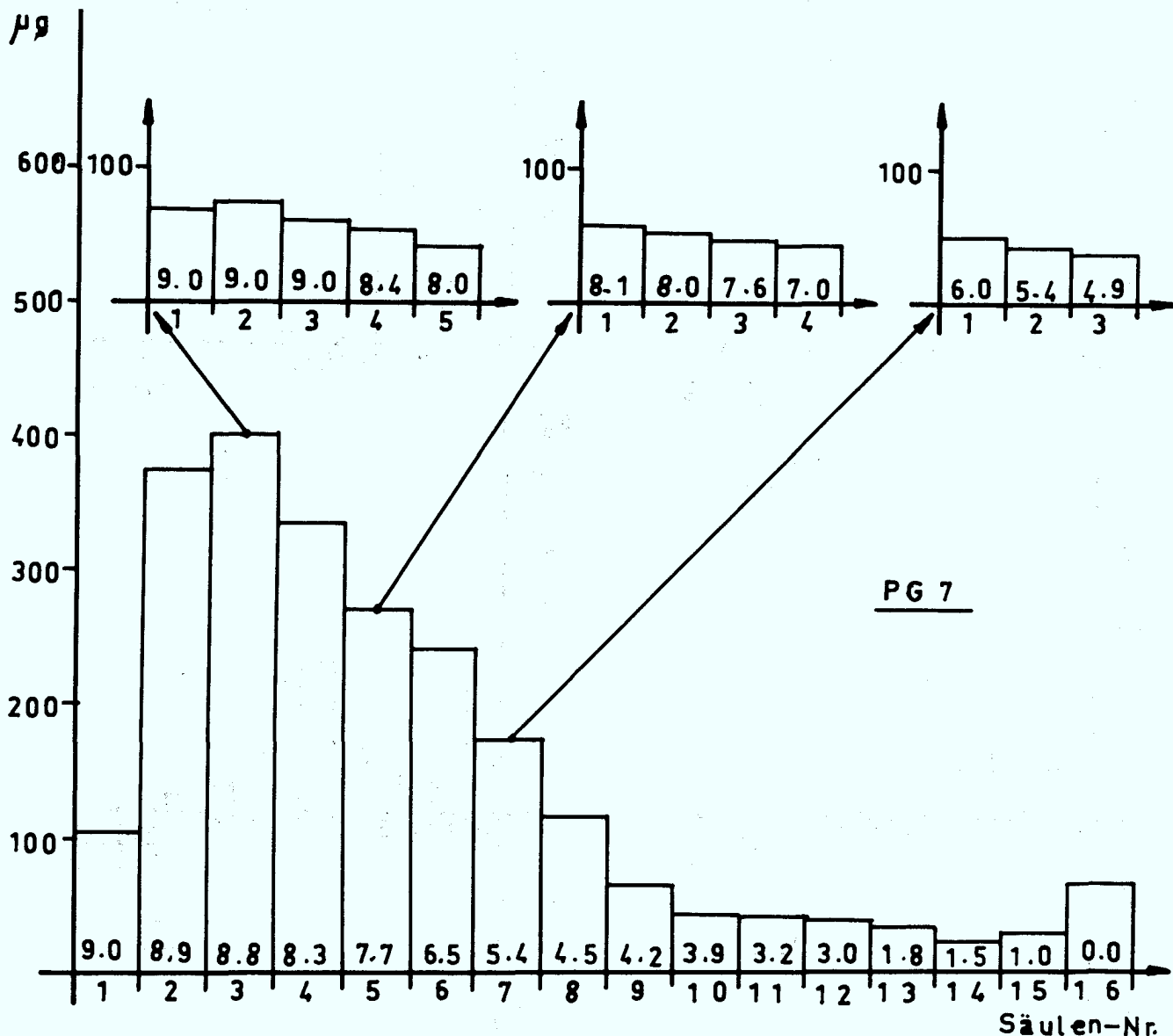


Abb. 16 Auftrennung einer Rhodopsin-Probe mit dem Durchschnitts-P.-Grad 7 P/Rh in Fraktionen mit verschiedenen P.-Graden auf der Ecteola-Säulen-Kaskade. Die Zahlen unter der x-Achse geben die Säulen-Nr. an, die Zahlen über der x-Achse den P.-Grad der zugehörigen Rhodopsin-Fraktion. Die Fraktionen von den Säulen Nr. 3, 5 und 7 wurden nach Reinigung auf einer Concanavalin-A-Sepharose-Säule einer weiteren Auftrennung auf 3 weiteren Ecteola-Säulen-Kaskaden unterzogen (inset). Einzelheiten s. Text.

Abb. 17 s. S. 48 Prozentuale Verteilung der einzelnen P.-Grade von 0 bis 9 P/Rh in Rhodopsin-Proben mit allen Durchschnitts-P.-Graden zwischen 1 und 7 P/Rh. (PG = P.-Grad) Erläuterungen im Text.

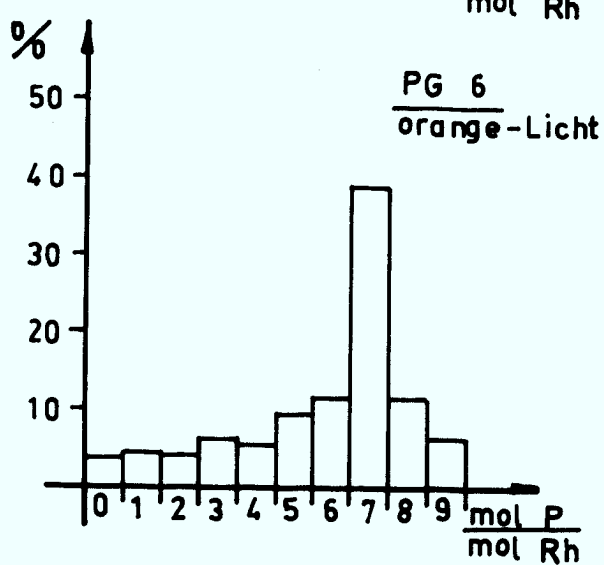
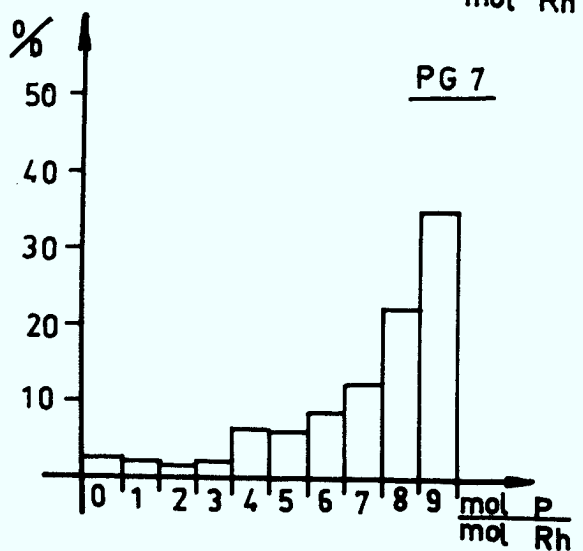
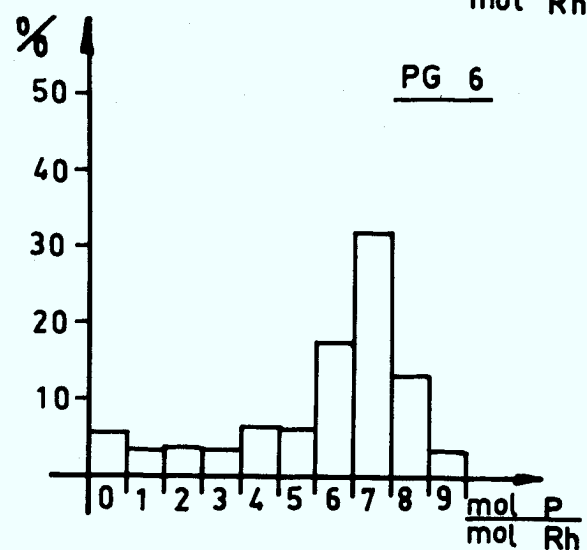
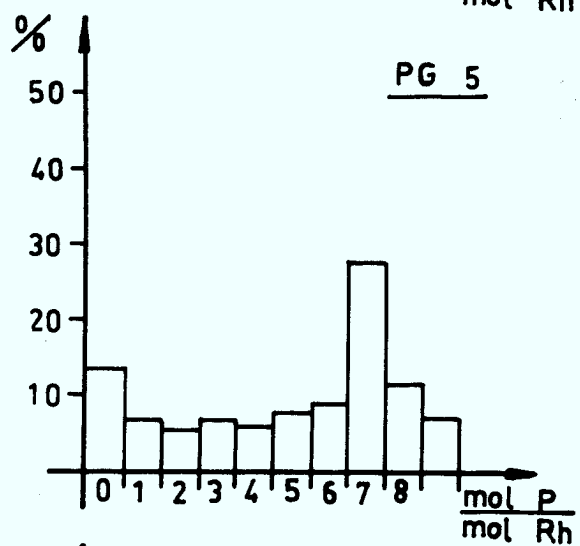
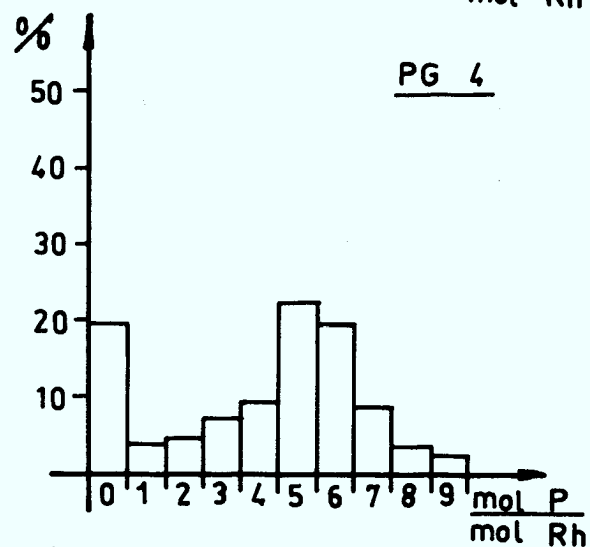
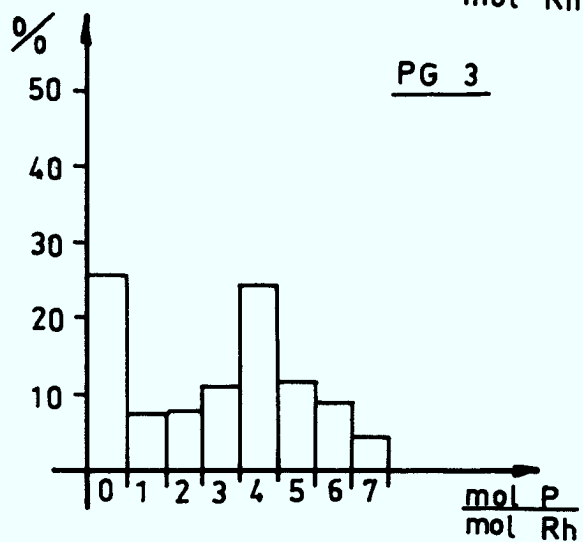
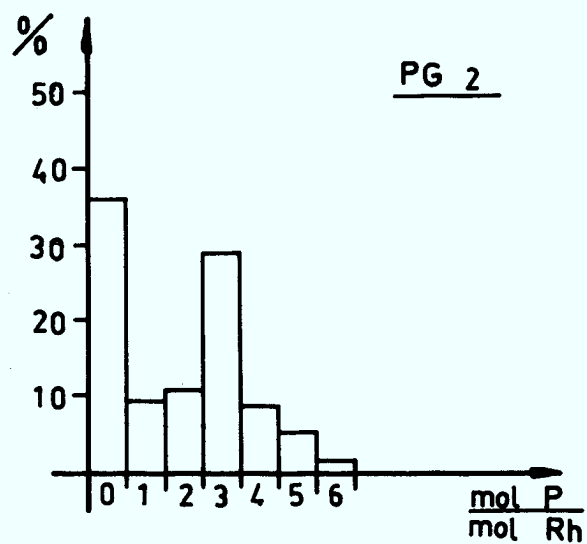
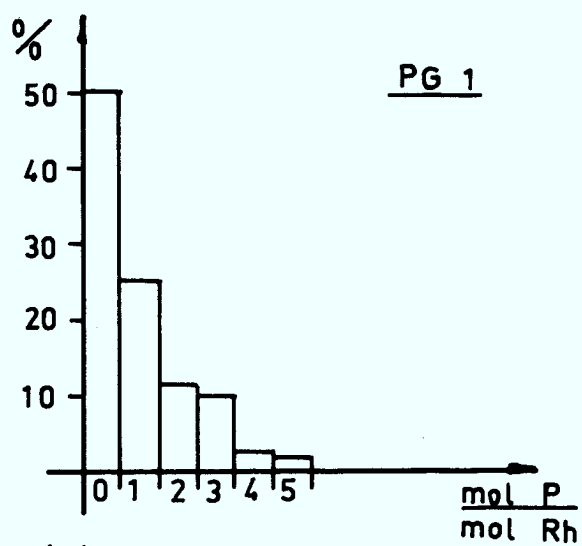


Abb. 17

Tabelle II

Prozentuale Verteilung der P.-Grade von 0 bis 9 P/Rh in Rhodopsin-Proben mit allen Durchschnitts-P.-Graden zwischen 1 und 7 P/Rh. Untersucht wurde je eine Serie der Präparationen a und b.

Durchschnitts-P.-Grad (P/Rh)

diskrete P.-Grade	1,00		2,00		3,00		4,00		5,00		6,00		7,00		theoretisch praktisch
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
0	51,2%	48,8%	36,6%	35,7%	25,1%	25,6%	20,0%	18,8%	13,5%	13,4%	6,4%	5,3%	2,8%	2,6%	
1	25,7%	24,1%	7,4%	10,7%	6,4%	7,8%	3,4%	4,4%	7,8%	5,9%	3,3%	3,0%	1,6%	2,5%	
2	10,3%	12,2%	10,7%	10,8%	5,9%	9,7%	3,2%	5,4%	3,8%	6,5%	5,0%	2,4%	1,5%	2,2%	
3	9,5%	10,3%	28,8%	28,6%	11,8%	10,2%	6,5%	7,8%	5,5%	8,1%	4,0%	3,1%	3,2%	1,4%	
4	1,7%	2,5%	9,4%	8,3%	26,7%	21,6%	10,6%	7,6%	6,0%	5,3%	7,2%	5,3%	6,7%	5,9%	
5	1,5%	2,2%	5,5%	4,7%	12,0%	10,7%	22,5%	22,8%	6,8%	8,5%	4,8%	7,2%	7,4%	5,2%	
6			1,6%	1,3%	7,3%	10,2%	17,3%	21,0%	11,5%	6,2%	16,8%	18,0%	8,1%	9,7%	
7					4,8%	3,3%	10,1%	7,3%	24,6%	29,9%	28,1%	35,8%	8,6%	16,2%	
8							4,0%	2,7%	13,4%	9,3%	15,3%	10,7%	23,0%	21,3%	
9							2,4%	1,8%	7,2%	6,7%	9,0%	9,3%	36,9%	33,0%	

3.4 Versuche zur Phosphorylierungsgeschwindigkeit unter physiologischeren Bedingungen

3.4.1 Der Zeitverlauf der Phosphorylierung bei kleinen (13 - 23 %) Bleichungen

Der Zeitverlauf der Phosphorylierung in vitro bei 100 %iger Bleichung vermittelt den Eindruck, daß die Phosphorylierung eine sehr langsame Reaktion sei. Aber 100 %ige Bleichungen sind in hohem Grade unphysiologisch, möglicherweise wird hier die Kinasemenge zum limitierenden Faktor. Um zu prüfen, ob die Phosphorylierung unter Bedingungen, die der physiologischen Situation ein wenig näher kommen, ebenso langsam ist, wurde der Zeitverlauf der Phosphorylierung auch bei kleineren Bleichungen (13 - 23 %) untersucht. Es zeigte sich, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Phosphorylierung bei kleinen Bleichungen sehr viel höher ist als bei 100 %iger Bleichung. Der maximale durchschnittliche P.-Grad ist jedoch bei 100 %iger Bleichung höher, wahrscheinlich deshalb, weil hier unter Dauerbelichtung inkubiert wurde, so daß wiederholtes Recycling möglich war.

Abb. 18 zeigt den Verlauf der Reaktion mit der gleichen Präparation bei 23 % und bei 100 %iger Bleichung. Mit der hier verwendeten ROS-Präparation beträgt die Halbwertszeit der Phosphorylierung bei 100 %iger Bleichung ca. 18 min, bei 23 % Bleichung dagegen nur 2 - 3 min. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß bei 23 % Bleichung etwa die 4-fache Menge an Kinase pro mol gebleichten Rhodopsins zur Verfügung steht. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde der Zeitverlauf der Phosphorylierung auch bei 100 %iger Bleichung unter Kinase-Anreicherung untersucht.

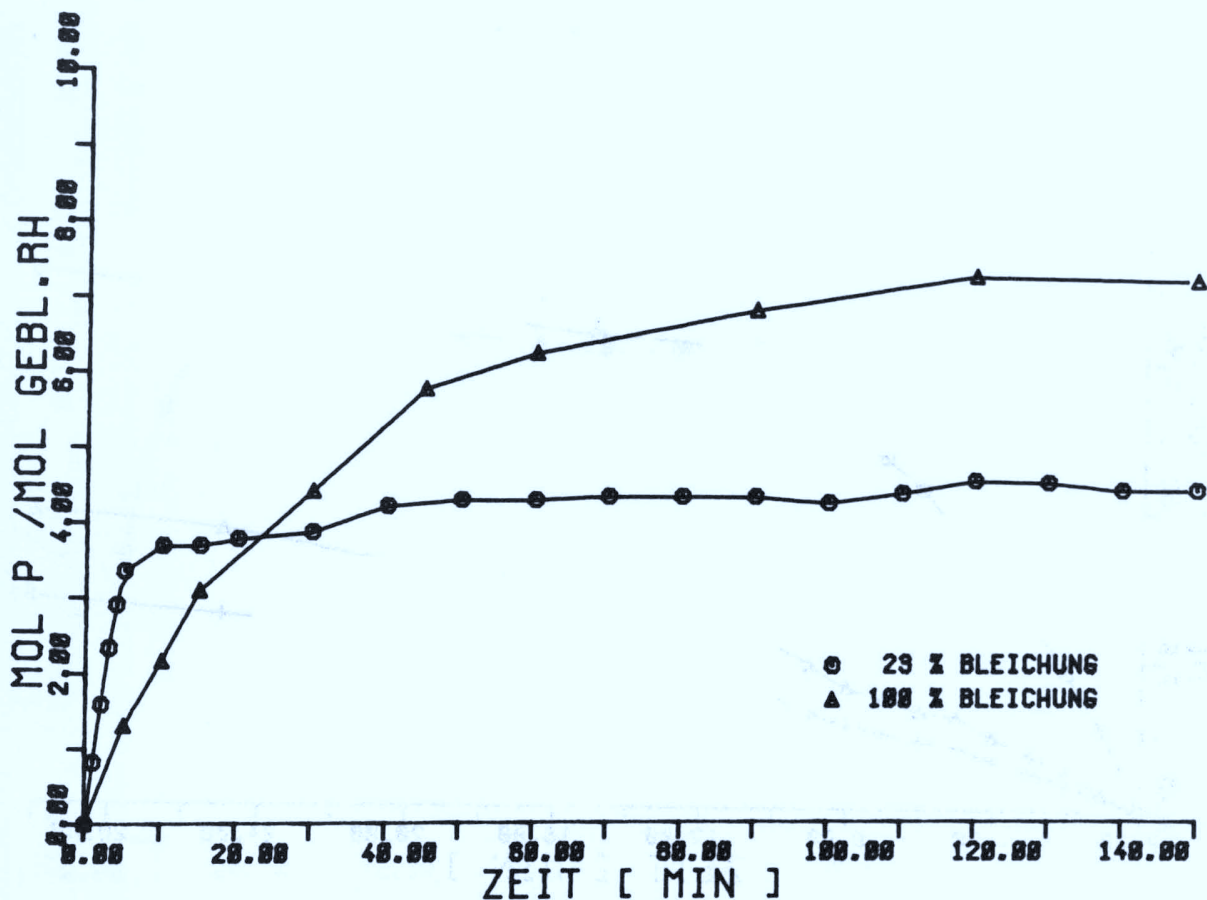


Abb. 18 Zeitverlauf der Phosphorylierung mit der gleichen Rinder-ROS-Präparation bei 23 % und 100 % Bleichung. Inkubationsmedium: 100 mM NaPP, 3 mM ATP, 1 mM MgCl_2 , pH 7,4.

3.4.2 Der Zeitverlauf der Phosphorylierung unter Kinase-Anreicherung

Hierfür wurde von 12 mg einer relativ langsam phosphorylierenden Präparation ein Teil der Kinase extrahiert (s. Methoden). Der Kinase-Extrakt von diesen 12 mg Rh wurde einer unextrahierten 2 mg-Portion der gleichen Präparation zugegeben. Diese mit Kinase angereicherte Probe wurde gleichzeitig mit einer nicht angereicherten 2 mg-Probe unter ansonsten gleichen Bedingungen phosphoryliert und der Zeitverlauf der Reaktion während der ersten 30 min aufgenommen.

Das Resultat zeigt Abb. 19. Es ist deutlich zu sehen, daß die Phosphorylierung unter Kinase-Anreicherung sehr viel schneller verläuft (oberste Kurve) als bei der unbehandelten Probe (mittlere Kurve). Die Halbwertszeit beträgt hier statt 25 min nur noch 5 min.

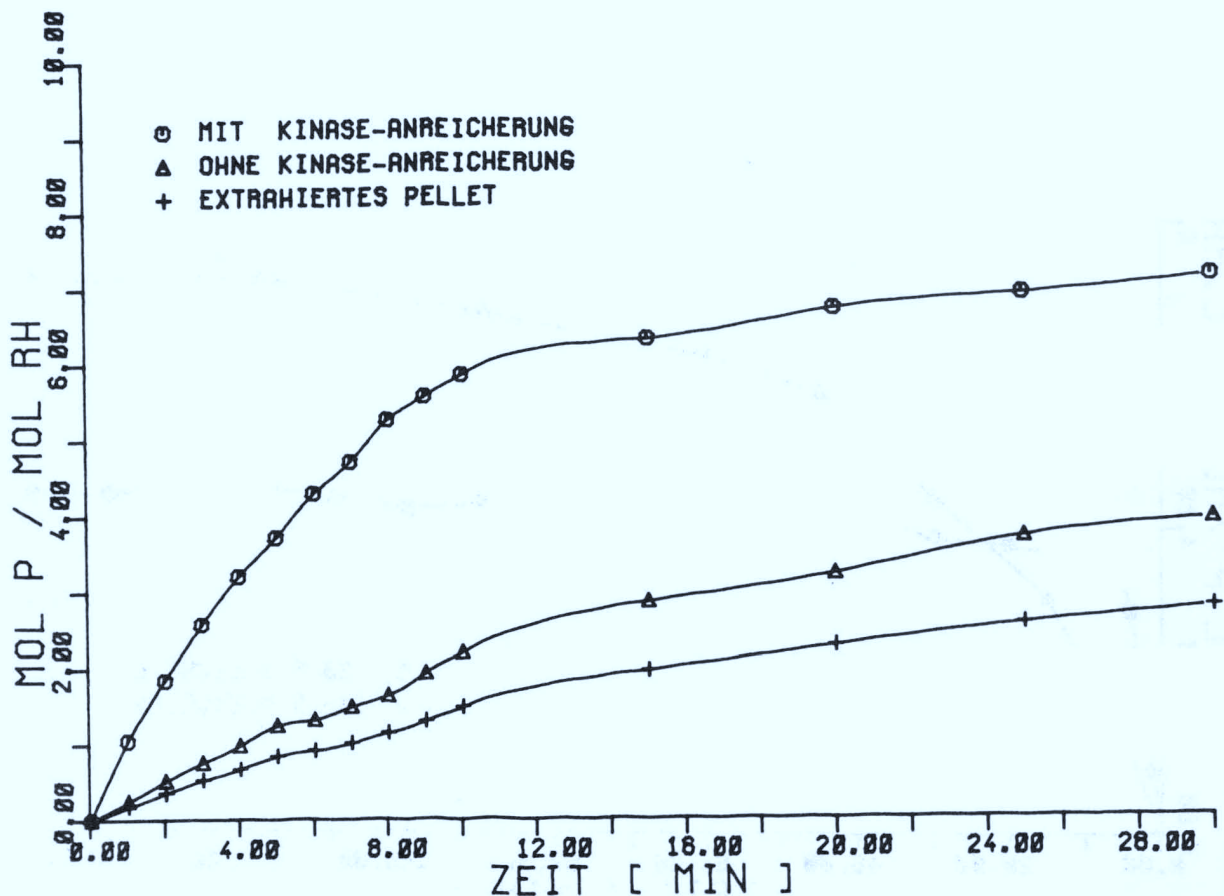


Abb. 19 Vergleich der Phosphorylierungsgeschwindigkeit der gleichen ROS-Präparation 1. mit Kinase-Anreicherung, 2. ohne Kinase-Anreicherung und 3. des extrahierten Pellets. Die aus einer ROS-Suspension mit 12 mg Rhodopsin extrahierte Kinase wurde einer 2 mg-Probe zugefügt. Die angereicherte 2 mg-Probe wurde gleichzeitig mit einer unbehandelten 2 mg-Probe und einer 2 mg-Probe des extrahierten Pellets inkubiert. Inkubationsmedium: 100 mM NaPP, 3 mM ATP, 1 mM MgCl_2 , pH 7,4. Die Abb. zeigt den Zeitverlauf der Reaktion während der ersten 30 min.

Das extrahierte Pellet (unterste Kurve) enthielt noch immer ca. 70 % der Kinase-Aktivität. In der mit Kinase angereicherten Probe muß die Aktivität also um einen Faktor von ca. 2,8 angereichert worden sein; vorausgesetzt, daß bei der Extraktion keine Kinase-Aktivität verloren gegangen ist.

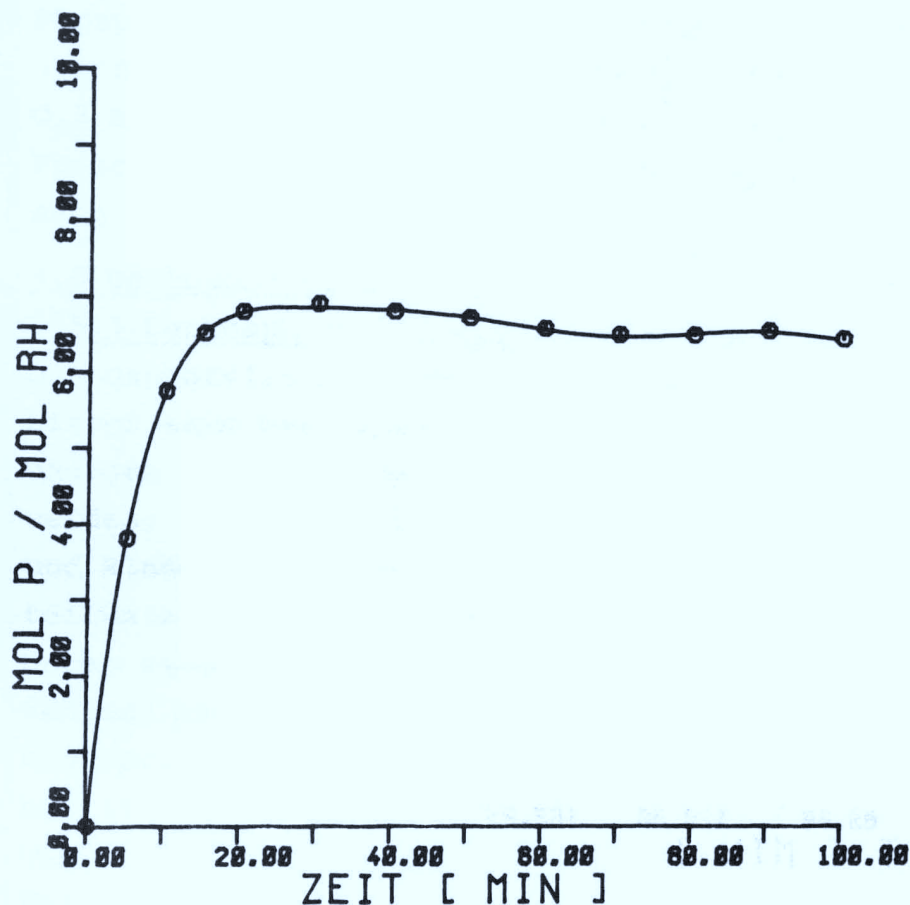


Abb. 20 Zeitverlauf der Phosphorylierung mit Frosch-Rhodopsin. Inkubationsmedium: Hepes-Puffer pH 7,4, 3 mM ATP, 1 mM $MgCl_2$.

3.4.3 Phosphorylierungsversuche mit Frosch-Rhodopsin

Hierzu wurden nur ungereinigte Frosch-ROS-Suspensionen verwendet. Die ROS wurden einfach von der Froschretina abgeschüttelt, von groben Geweberesten abfiltriert und von feineren Zelltrümmern sowie von löslichen Proteinen, die nicht aus den Außensegmenten stammen, abzentrifugiert. Sicher geht bei dieser Prozedur auch ein Teil der löslichen Außensegment-Proteine verloren, aber die meisten der auf diese Weise erhaltenen Außensegmente scheinen zumindest lichtmikroskopisch intakt zu sein. Dafür spricht auch die Tatsache, daß bei der Phosphorylierung von Frosch-ROS große Unterschiede zwischen beschallten und nicht beschallten Suspensionen bestehen. Bei hochgereinigten Rinder-ROS sind diese Unterschiede zwar auch vorhanden, aber in viel geringerem Ausmaß. Die ungereinigten

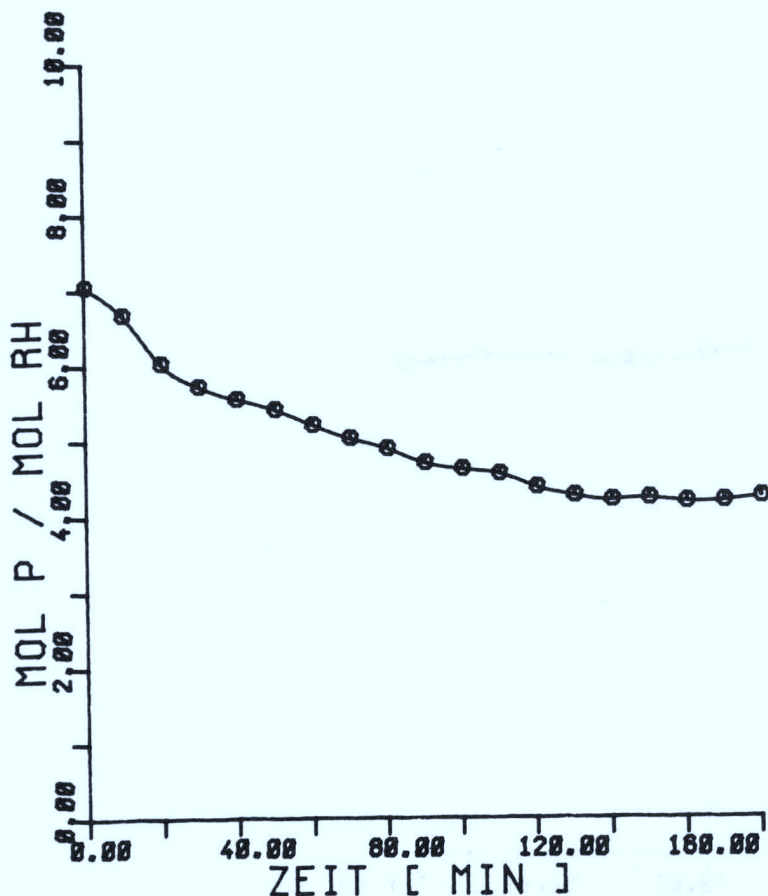


Abb. 21 Dephosphorylierung von hochphosphoryliertem Rinder-Rhodopsin. Erklärung im Text.

Frosch-Außensegment-Suspensionen enthalten auch noch andere Zellbestandteile, vor allem vermutlich Mitochondrien aus dem Ionensegment.

Da die Präparation von genügend Frosch-Rhodopsin für einen Versuch (ca. 12 Retinen) nicht länger als etwa 1 1/2 Std. dauert und da Frösche jederzeit zur Verfügung stehen, kann für jeden Versuch eine frische Präparation hergestellt werden. Es steht also Material zur Verfügung, das nicht die Prozedur von Einfrieren und Auftauen durchlaufen muß, wie das beim Rinder-Rhodopsin der Fall ist. Phosphorylierungsversuche mit Frosch-Rhodopsin zeigen denn auch einen wesentlich rascheren Zeitverlauf, obwohl diese Versuche bei nur 20° C durchgeführt wurden, anstatt bei 30° C, wie beim Rinder-Rhodopsin. Abb. 20 zeigt einen solchen typischen Zeitverlauf der Phosphorylierung mit Frosch-Rhodopsin. Die Halbwertszeit beträgt

hier nur 5 min, und bereits nach 30 min ist die Reaktion abgeschlossen (max. P.-Grad $7 \pm 0,4$ P/Rh). Auch hier ist die Phosphorylierung streng lichtabhängig. Im Dunkeln wird nach 1-stündiger Inkubation nur etwa ein Phosphorylierungsgrad von 0,3 mol Ph/mol Rh erreicht. Leider reicht das Material der Frosch-ROS-Präparationen nicht aus, um damit eine Auftrennung nach verschiedenen Phosphorylierungsgraden zu versuchen.

3.5 Dephosphorylierungsversuche

3.5.1 Dephosphorylierungsversuche mit Rinder-Rhodopsin

Dephosphorylierung von Rhodopsin in vitro ist in der Literatur bisher kaum beschrieben worden. An lebenden Fröschen konnte dagegen vollständige Dephosphorylierung (Kühn 1974) gemessen werden; an Frosch-ROS-Suspensionen (Miller und Paulsen, 1975) und Rinder-ROS-Suspensionen (Weller et al, 1974) wurde eine teilweise Dephosphorylierung beobachtet.

Unter geeigneten Bedingungen (kein Phosphat im Inkubationsmedium, niedrige ATP-Konzentration) ist jedoch auch an Rinder-Rhodopsin in vitro eine bis zu 60 %ige Dephosphorylierung zu beobachten (Abb. 10). Die Dephosphorylierung zeigt keine Abhängigkeit von den Belichtungsverhältnissen; sie erfolgt unter Weißlicht mit dem gleichen Zeitverlauf wie bei Dunkelheit. Auch EDTA in einer Konzentration von 10 mM zeigt keinen Einfluß auf die Dephosphorylierung; 2-wertige Kationen scheinen demnach nicht erforderlich zu sein.

Deutlich abhängig ist die Dephosphorylierung dagegen von der Ionenstärke des Inkubationsmediums: Sie verläuft schneller und vollständiger mit abnehmender Ionenstärke. Eine 100 %ige Dephosphorylierung konnte in vitro noch nicht erzielt werden. Da bei 0,1 mM ATP nicht höher als 0,8 - 1,2-fach phosphoryliert wird, bedeutet eine 50-60 %ige Dephosphorylierung hier eine Freisetzung von nicht mehr als nur 0,4 - 0,6 mol Ph/mol Rh. Um zu prüfen, ob auch voll phosphoryliertes Rinder-Rhodopsin in vitro einer Dephosphorylierung zugänglich ist, wurde ein weiterer Versuch unternommen: Eine ROS-Suspension wurde hoch phosphoryliert und anschließend durch Abzentrifugieren und mehrmaliges Waschen vom überschüssigen ATP und von nicht incorporierter Radioaktivität gereinigt. Dies hochphosphorylierte Opsin wurde dann mit etwa der gleichen Menge einer frischen

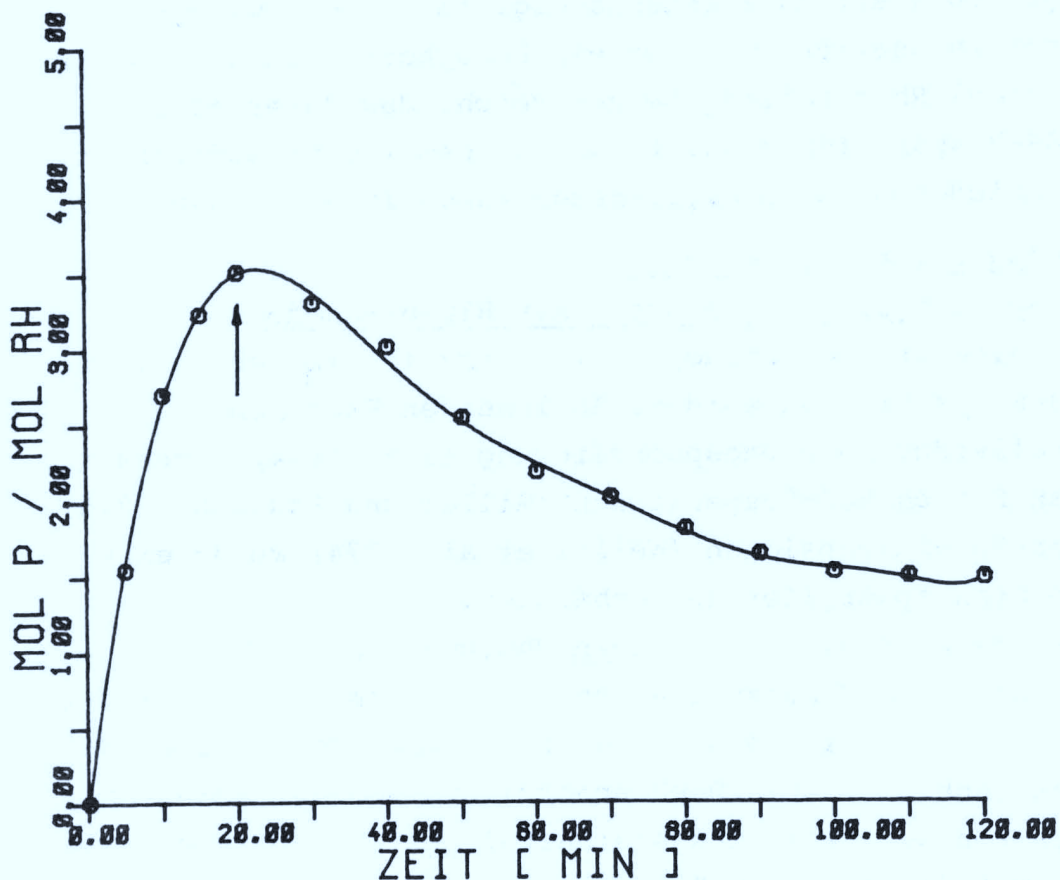


Abb. 22 Dephosphorylierung von Frosch-Rhodopsin.
Der Pfeil zeigt die Zugabe von Apyrase und $MgCl_2$ an. Einzelheiten s. Text.

Rinder-ROS-Suspension gemischt und 3 Std. bei $30^{\circ}C$ ohne ATP inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden der Mischung Aliquots entnommen, präzipitiert und gewaschen wie üblich und anschließend im Szintillationszähler die verbliebene Aktivität gemessen. Auch hier erfolgt gut reproduzierbar eine Dephosphorylierung, die aber nie (5 Versuche) über 40 % hinausgeht. Immerhin bedeuten 40 % in diesem Falle eine Freisetzung von 2,8 mol Ph/mol Rh (Abb. 21).

3.5.2 Dephosphorylierungsversuche mit Frosch-Rhodopsin

Auch mit Frosch-Rhodopsin waren Dephosphorylierungsversuche leider nur zum Teil erfolgreich. In keinem Falle wurde eine Dephosphorylierung von mehr als 40 - 60 % erreicht. Abb. 22 zeigt einen dieser Versuche mit Frosch-Rhodopsin. Die ATP-Konzentration lag hier bei 0,5 mM, belichtet wurde nur 5 min

mit Weißlicht, die Versuchstemperatur war 20° C. Nach 20 min Inkubation wurden 20 mM MgCl₂ zugegeben, um die Kinase zu hemmen, und Apyrase (0,12 units/100 nmol ATP) ein Enzym, das ATP hydrolysiert. Auf diese Weise sollte die Phosphorylierung gestoppt werden. Die Dephosphorylierung erfolgt verhältnismäßig schnell im Vergleich zu ähnlichen Versuchen mit Rinder-Rhodopsin, aber sie bleibt auch hier bei durchschnittlich etwa 50 % stehen.

4. Diskussion

Reversible, kovalente Modifikationen von Proteinen (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung usw.) werden in fast allen tierischen Geweben beobachtet und werden als mögliche Regulationsmechanismen von Proteinfunktionen diskutiert (Krebs und Beavo, 1977, Review). Unter diesen Modifikationen scheint die Phosphorylierung die am weitesten verbreitete und am besten untersuchte zu sein. In einigen Fällen weiß man, daß die Phosphorylierung maßgeblich an der Regulation der Funktion der betreffenden Proteine beteiligt ist, es handelt sich in diesen Fällen fast ausschließlich um Enzyme. Die meisten dieser Enzyme werden durch Phosphorylierung entweder aktiviert (Fructose-1,6 Diphosphatase, Glykogen-Phosphorylase) oder inaktiviert (Pyruvat-Kinase, Acetyl-Co A-Carboxylase), (Krebs und Beavo, 1977, Review). Bei Enzymen mit nur einer Phosphatbindungsstelle scheinen die Verhältnisse somit recht überschaubar zu sein. Komplizierter wird es, wenn ein Enzym mehr als ein Phosphat pro Molekül bindet. Die Pyruvat-Dehydrogenase z. B. besitzt drei Bindungsstellen für Phosphat, aber die Besetzung einer einzigen scheint für die volle Aktivierung ausreichend zu sein. Die Funktion der beiden anderen ist noch unbekannt (Krebs und Beavo, 1977, Review).

Bei einem anderen Enzym, der Phosphorylase-Kinase, ist die Funktion einer mehrfachen Phosphorylierung dagegen besser bekannt. Die Phosphorylase-Kinase besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten α , β und γ mit der Formel $(\alpha\beta\gamma)_4$. Eine c-AMP-abhängige Protein-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von zwei Untereinheiten der Phosphorylase-Kinase: Zuerst wird die β -Untereinheit sehr schnell phosphoryliert, was einen ca. 40-fachen Anstieg der Enzymaktivität zur Folge hat. Sobald mindestens 2 β -Untereinheiten phosphoryliert sind, setzt eine langsame Phosphorylierung der α -Untereinheit ein. Die Phosphorylierung der α -Untereinheit hat keinen Einfluß auf die Enzymaktivität, aber sie scheint die Konformation des Enzymmoleküls so zu verändern, daß die β -Untereinheit dephosphoryliert werden kann (Cohen 1976, Review). Für derartig komplexe Regulierung durch mehrere Phosphatbindungsstellen gibt es noch einige weitere Beispiele (Cohen 1976, Krebs und Beavo, 1977),

die zeigen, wie wichtig und schwierig es ist, solche Mehrfach-Phosphorylierungsreaktionen im Detail zu studieren.

Bei einem Enzym, bei dem die verschiedenen Phosphatbindungsstellen an verschiedenen Untereinheiten liegen, ist eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Phosphorylierungszustände allerdings einfacher als beim Rhodopsin, wo mindestens 7 von den 9 Phosphatbindungsstellen sehr nahe beieinander liegen (Hargrave et al, 1980). Außerdem katalysiert ein Enzym zumeist nur eine einzige, definierte Reaktion, während die Funktion des Rhodopsins noch nicht im Detail bekannt ist und komplexer sein dürfte als eine einfache Enzym-Reaktion.

Rhodopsin ist bei weitem nicht das einzige Nicht-Enzym-Protein, das einen Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Cyclus durchläuft. Vor allem im Nervensystem gibt es eine ganze Reihe von Membranproteinen, deren Phosphorylierungszustand von Hormonen, Neurotransmittern und/oder Membranpotentialen gesteuert werden soll (Maeno und Greengard, 1972; Maeno et al, 1975; Williams und Rodnight, 1977; Teichberg et al, 1977; Uno et al, 1977; Gordon et al, 1977; Williams 1979; Schoffeniels und Dandrifosse, 1980). Die entsprechenden Kinasen sind meist cAMP- und/oder Ca^{2+} -abhängig. Über Phosphatasen und Dephosphorylierung ist sehr viel weniger veröffentlicht worden, sie scheinen, ebenso wie im Falle des Rhodopsins, einer Untersuchung schwerer zugänglich zu sein.

Über die physiologische Funktion dieser neuronalen Membranproteine ist verhältnismäßig wenig bekannt, obwohl es Hinweise dafür gibt, daß der Phosphorylierungszustand subsynaptischer Membranproteine an der Regulierung der Permeabilität für verschiedene Ionen, vor allem Na^+ , beteiligt sein könnte (Gordon et al, 1977; Krueger et al, 1977; Meelian und Matus, 1979; Schoeffeniels und Dandrifosse, 1980). Lichtabhängige Phosphorylierung von Membranproteinen wird nicht nur an Photorezeptoren höherer Tiere beobachtet, sondern auch z. B. an Halobakterien (Spudich und Stoeckenius, 1980) und sogar an Thylokaid-Membranen in den Chloroplasten höherer Pflanzen (Béliveau und Bellemare, 1979).

Alles in allem scheinen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen in der Regulation biochemischer Reaktionen sowie

von Membraneigenschaften eine hervorragende Rolle zu spielen. Allerdings ist diese Rolle bisher nur in sehr wenigen Fällen im Detail bekannt.

In den wenigsten Fällen werden auch quantitative Aussagen gemacht über die Stöchiometrie der Phosphat-Inkorporation.

Über Phosphorylierungsgrade, vergleichbar mit den in dieser Arbeit für Rhodopsin beschriebenen, wird in der Literatur bisher nur für Glykogen-Synthase berichtet, die in der 90000-Dalton-Untereinheit 6 Phosphatreste binden soll (Smith et al, 1971, zitiert nach Krebs und Beavo, 1977).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen klar, daß Rinder-Rhodopsin nach Belichtung bis zu 9 Phosphatgruppen inkorporiert, und daß mindestens 97 % der Rhodopsin-Moleküle phosphorylierbar sind. Die Inkorporation bei Belichtung ist ca. 50 - 100 mal höher als im unbelichteten Rhodopsin, was auf eine hohe Spezifität der Kinase-Reaktion und auf eine Rolle beim Sehvorgang schließen läßt. Der durchschnittliche Phosphorylierungsgrad ist 7 P/Rh, reproduzierbar bei einer großen Anzahl von ROS-Präparationen. Daß praktisch alles Phosphat tatsächlich an Rhodopsin gebunden ist, zeigt die Phosphatbestimmung an chromatographisch gereinigtem, lipidfreiem Rhodopsin; der gleiche hohe P.-Grad (7 P/Rh) wie in den Membranen wurde auch in diesen hochgereinigten Rhodopsin-Präparationen gefunden, und zwar mit zwei voneinander unabhängigen Methoden (chemische Phosphatbestimmung und Messung der aus AT^{32}P inkorporierten Radioaktivität).

Die bisher in der Literatur beschriebenen P.-Grade für Frosch- und Rinder-Rhodopsin sind recht unterschiedlich, aber alle viel niedriger als 7 P/Rh, z. B. 0,5 P/Rh (Goridis und Weller, 1976 (Rind)), 0,7 - 0,8 P/Rh (Shichi und Somers, 1978 (Rind)), 0,6 P/Rh (Miller und Paulsen, 1975 (Frosch)), 3,6 P/Rh (Miller und Paulsen, 1977 (Frosch)), 2,4 P/Rh (Kühn und McDowell, 1977 (Rind)). Keiner dieser Autoren arbeitete unter den in Kap. 3 angegebenen optimalen Bedingungen.

Da die Mg-Konzentration im Stäbchenaußensegment nach Szuts und Cone (1977) bei etwa 4 mM liegt, bei einer ATP-Konzentration von etwa 2-5 mM (Robinson et al, 1975), müßten in vivo auch ungefähr die Bedingungen für die Phosphorylierung herrschen, die

sich in vitro als die günstigsten erwiesen haben.

Andererseits haben andere Autoren für Mg und ATP auch andere Konzentrationen gemessen. Für Mg geben Hendriks et al (1974) eine Konzentration von 15 Mg/Rhodopsin an, was bei einer Rhodopsin-Konzentration von $\sim 3,5$ mM (Stone und Dratz, 1977; Uhl und Abrahamson, 1979, Review) etwa 52.5 mM entspräche. Salceda (Vortrag im Institut für Neurobiologie, 1980) gibt für ATP eine Konzentration von nur 180 μ M an. Verbunden mit 52.5 mM MG (Hendriks et al) wäre die Situation für die Phosphorylierung in vivo sehr viel weniger günstig.

Die Feststellung, daß der höchste P.-Grad in vitro erreicht wird, wenn Rhodopsin in einer Konzentration von ca. 0,5 mg/ml = 13 μ M vorliegt, war zunächst überraschend. Die in vivo-Konzentration des Rhodopsins liegt bei ca. 3,5 mM (Stone und Dratz, 1977), also etwa 250 x so hoch wie in vitro bei der Inkubation. Wenn man allerdings eine physiologische Bleichungsrate von 0,001 %/sec annimmt (was wahrscheinlich noch zu hoch gegriffen ist, s. Chabre 1976), dann ist das jeweils frisch gebleichte Rhodopsin unter Inkubationsbedingungen etwa 500-fach konzentrierter als in vivo. Die Kinase ist dafür um einen Faktor von mindestens 250 verdünnt. So gesehen könnte die Zahl der Zusammenstöße Kinase-gebleichtes Rhodopsin in etwa der in vivo-Zahl gleichkommen. Dies ist allerdings nur eine Spekulation; die Diffusionsverhältnisse in intakten ROS sind sicher komplizierter als in einer verdünnten Membran-Suspension. Nach Shichi und Somers (1978) soll der größte Teil des Rhodopsins (84 %) nicht phosphoryliert werden, während sie den Rest von 16 % "sehr hoch" ca. 5-fach, phosphoryliert fanden. Diese Autoren erzielten jedoch nur Durchschnitts-Phosphorylierungsgrade von 0,7 - 0,8 P/Rh, weil sie unter inhibitorischen Bedingungen arbeiten: relativ niedrige Ionenstärke (60 mM Tris), niedrige ATP-Konzentration (0,1 mM), im Verhältnis zur ATP-Konzentration zu hohe Mg-Konzentration (4 mM). Unter diesen Inkubationsbedingungen erhalte ich auch einen P.-Grad von höchstens 1,0 P/Rh.

Sie schlossen ferner aus Versuchen mit ^3H -markiertem Leucin (1978 u. 1979), daß die Plasmamembran und die mit ihr noch strukturell verbundenen neugebildeten Disks bevorzugt phos-

phoryliert werden. Bei einem durchschnittlichen P.-Grad von 7 P/Rh würde das jedoch bedeuten, daß ein gebleichtes Rhodopsin-Molekül ca. 35 - 40 Phosphatgruppen binden müßte. Das erscheint sehr unwahrscheinlich, zumal das gesamte Rhodopsin-Molekül nur 40 Serin- und Threoninreste enthält. Außerdem zeigen die Trennversuche mit der Ecteola-Säulen-Kaskade sehr deutlich, daß mindestens 97 % des Rhodopsins phosphorylierbar sind und daß schon bei einem durchschnittlichen P.-Grad von nur 1 P/Rh ca. 50 % des Rhodopsins phosphoryliert sind (Abb. 17).

Ähnliches folgt aus Experimenten von Paulsen und Schürhoff (1979). Sie zeigten mit Hilfe der Mikroautoradiographie an isolierten Frosch-ROS, daß lichtabhängig inkorporiertes radioaktives Phosphat sich gleichmäßig über das ganze Disk-Membran-System verteilt, ohne bevorzugte Phosphorylierung der basisnahen Disks.

Unter den günstigsten Inkubationsbedingungen werden zwar manche Rhodopsin-Moleküle 9-fach phosphoryliert, aber niemals alle. Das könnte ein Hinweis auf eine gewisse Heterogenität des Rhodopsins sein. Diese Heterogenität könnte entweder im Rhodopsin-Molekül selbst liegen, oder in seiner Anordnung innerhalb der Diskmembran, oder in Unterschieden zwischen ganzen Disks, z. B. durch Alterung. Nach den Ergebnissen der Ecteola-Cellulose-Chromatographie bleibt anscheinend immer ein Rest von 2-3 % unphosphoryliert, von der Menge her könnte das die Plasma-Membran sein.

85 % des inkorporierten Phosphats werden am Carboxylende des Rhodopsins gefunden (Hargrave et al, 1980), und zwar in einem Peptid, das durch Spaltung mit Bromcyan und anschließende Trypsin-Behandlung gebildet wurde und das die endständigen 23 Aminosäuren enthält. In diesem Peptid finden sich 3 Serin- und 4 Threoninreste, also 7 Phosphatbindungsstellen. Da aber die Trennungsergebnisse von der Ecteola-Säulen-Kaskade zeigen, daß das einzelne Rhodopsin-Molekül bis zu 9 Phosphatreste tragen kann, müssen noch 2 weitere Bindungsstellen existieren. Unter den 40 C-terminalen Aminosäuren, die an der cytoplasmatischen Oberfläche aus der Diskmembran herausragen, finden sich keine weiteren phosphorylierbaren Serin- oder Threonin-

reste (Hargrave, pers. Mitteilung)). Die 2 unbekannten Phosphatbindungsstellen müssen also von den 7 bekannten durch mindestens einen Abschnitt hydrophober α -Helices, welcher die Diskmembran 2 x durchspannt, getrennt sein (s. Rhodopsin-Modell Hargrave, 1980). Rhodopsin ist also wahrscheinlich an 2 in der Aminosäuresequenz weit auseinanderliegenden Stellen phosphorylierbar. Möglicherweise kommen der Phosphorylierung an diesen verschiedenen Stellen auch verschiedene Funktionen zu.

Da Shichi und Somers (1978) mit Ecteola-Säulen-chromatographischen Versuchen zu dem Schluß gekommen waren, daß nur die beiden P.-Grade von 0 und 5 P/Rh existieren, erhob sich die Frage, ob es tatsächlich ein "Alles- oder Nichts-Gesetz" der Phosphorylierung gibt. Man könnte sich dabei vorstellen, daß die Kinase an einem Rhodopsin-Molekül solange bleibt, bis es voll durchphosphoryliert ist und erst dann auf das nächste übergeht. Die beiden möglichen P.-Grade könnten dann allerdings nicht 0 und 5 P/Rh sein, sondern 0 und mindestens 7 P/Rh. Leider erwiesen sich die Verhältnisse als sehr viel komplizierter. Es existieren tatsächlich alle Stufen der Phosphorylierung von 0 bis 9 P/Rh.

Die Ecteola-Cellulose-Chromatographie nach der Original-Methode von Shichi und Somers (1978) führt nach meiner Erfahrung zu Denaturierung des ^{32}P -Rhodopsins, besonders der hoch phosphorylierten Fraktionen (s. auch Kapitel 2.6.3 und 3.3). Ein großer Teil des aufgetragenen Rhodopsins (E 500) bleibt nach der Elution unauffindbar, während die aufgetragene Radioaktivität nahezu quantitativ eluiert wird. Dadurch werden zu hohe P.-Grade vorge-täuscht. Dies gilt auch für ^{32}P -Rhodopsin mit durchschnittlich nur 1 P/Rh, das ich durch vorzeitiges Abstoppen der Phosphorylierung herstellte und der gleichen Säulenprozedur wie bei Shichi und Somers beschrieben, unterwarf. Leider geben Shichi und Somers nie die Bilanz aus aufgetragenem und wiedergewonnenem ^{32}P -Rhodopsin an, so daß sich ihre Versuche nicht quantitativ nachvollziehen und interpretieren lassen. Einen großen Teil des ^{32}P erhalten Shichi und Somers in einer Fraktion, die sie als ^{32}P -Phospholipide bezeichnen, ohne auf die Art der Identifizierung als Phospholipide einzugehen. Meine Versuche zeigen eindeutig, daß unter den verwendeten Inkubationsbedingungen keine ^{32}P -Phospholipide entstehen (gleicher P.-Grad vor und nach Reinigung auf der Concanavalin-A-Säule, die gesamte Radioaktivität kommt mit der Rhodopsin-Fraktion). ^{32}P -Wenn Shichi's "hochphosphorylierte" Säulenfraktionen Gemische aus ^{32}P -Rhodopsin und ^{32}P -Opsin sein sollten, dann würde sich damit auch erklären, warum er in diesen Fraktionen eine Anreicherung von ^3H -Leucin pro Rhodopsin (E 500) findet.

Leider läßt sich mit den Daten aus der Zeitverlaufsmessung keine präzise Kinetik im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik aufstellen. Wie man aus den Auftrennungsergebnissen

sieht, läuft hier ja nicht nur eine Phosphorylierungsreaktion ab, sondern deren 9 nebeneinander; zwar nicht mit 9 verschiedenen Substraten, aber doch mit 9 verschiedenen Bindungsstellen am gleichen Substrat. Jede dieser Bindungsstellen könnte möglicherweise eine andere Affinität zum Enzym aufweisen, jede der 9 Phosphorylierungsreaktionen könnte im Prinzip nach einer anderen Kinetik ablaufen. Ferner läßt sich noch nichts darüber sagen, ob diese 9 Reaktionen unabhängig voneinander verlaufen oder ob die Besetzung einer Bindungsstelle die Besetzung weiterer Bindungsstellen in irgendeiner Weise beeinflußt.

Was man mit dem Zeitverlauf der Phosphorylierung mißt, ist nur das Resultat aus 9 Reaktionen, wobei noch erschwerend hinzukommt, daß die Aktivität der Kinase während der langen Reaktionszeit langsam abnimmt.

Mit Sicherheit läßt sich nur sagen, daß sich die einzelnen Bindungsstellen in ihrer Affinität zur Kinase nicht soweit voneinander unterscheiden, daß zuerst eine bestimmte Stelle an allen Rhodopsin-Molekülen besetzt wird, dann die nächste usw. Das dies nicht der Fall ist, geht aus den Trennergebnissen bei niedrigen durchschnittlichen P.-Graden klar hervor (s. Abb. 15 und 17, und Tabelle II). Ebenso geht daraus hervor, daß die Kinase nicht solange mit einem einzelnen Rhodopsin-Molekül verbunden bleibt, bis dieses voll durchphosphoryliert ist, sondern daß sie für höhere P.-Grade anscheinend mehrmals neu ansetzen muß.

Eine so komplexe Situation läßt darauf schließen, daß die Funktion der Rhodopsin-Phosphorylierung wahrscheinlich komplizierter und vielschichtiger ist als etwa nur eine einfache Ein-Aus-Funktion. Ein wenig leichter ließe sich hier spekulieren, wenn man wüßte, ob bei der Phosphorylierung der einzelnen Bindungsstellen eine bestimmte Reihenfolge eingehalten wird, mit anderen Worten, ob z. B. bei nur 1-fach phosphoryliertem Rhodopsin immer die gleiche Bindungsstelle besetzt ist.

Ein einziges Photon scheint auszureichen, um zu einer 9-fachen Phosphorylierung von Rhodopsin zu führen. Das geht aus der Tatsache hervor, daß auch bei kleinen Bleichungen von 13-23 %,

wo nur 10 - 20 sec belichtet wurde, der P.-Grad von 9 P/Rh zu finden ist (~ 5 % des gebleichten Rhodopsins ist hier 9-fach phosphoryliert). D. h. es ist wahrscheinlich für die 9-fache Phosphorylierung kein zweiter Bleichungsvorgang (Recycling) notwendig. Dies spricht dafür, daß der P.-Grad von 9 P/Rh auch in vivo vorkommt.

Bisher wurde der Zeitverlauf der Phosphorylierung immer unter unphysiologisch starker Belichtung aufgenommen. Die Messungen mit etwa 13-23 %iger Bleichung oder unter Kinase-Anreicherung zeigen jedoch, daß die Phosphorylierung unter diesen Bedingungen wesentlich schneller verläuft als bei 100 %iger Bleichung ohne Kinase-Zugabe. In vivo sind die Bleichungsraten noch wesentlich geringer und die Kinase-Aktivität im Verhältnis zum gebleichten Rhodopsin noch wesentlich höher als in vitro bei 13-23 % Bleichungen. Aus den bisherigen Ergebnissen ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß die Phosphorylierung der Bleichung in vivo mit einer Verzögerung folgen könnte, die nur im Sekunden - oder gar Millisekunden-Bereich - liegt. Die elektrische Antwort der Photorezeptormembran sättigt bereits bei Lichtintensitäten, die 0,001 % des Rhodopsins pro sec bleichen (Chabre 1976; Woodruff und Bouwnds, 1979; Fain 1976).

Wahrscheinlich erscheint die Phosphorylierung des Rhodopsins nur darum so langsam, weil hier innerhalb einer min soviel Substrat für die Kinase geschaffen wird, wie in vivo unter normalen Bedingungen in mehreren Tagen. Solange also noch keine Phosphorylierungs-Experimente mit physiologischen Bleichungsraten vorliegen, kann man noch keineswegs davon ausgehen, daß die Phosphorylierung zu langsam ist, um an der Entstehung oder Abschaltung der Erregung unmittelbar beteiligt zu sein.

Neben der Rhodopsin-Phosphorylierung wurden in ROS-Suspensionen noch einige andere biochemische Reaktionen gefunden, die ebenfalls lichtabhängig sind und deren Aktionsspektrum das Absorptionsspektrum des Rhodopsins widerspiegelt. Licht (bzw. gebleichtes Rhodopsin) aktiviert eine GTPase (Wheeler und Bitensky, 1977; Bitensky et al, 1978; Godchaux und Zimmermann, 1979; Kühn 1980), welche ihrerseits im licht-aktivierten Zu-

stand eine Phosphodiesterase aktiviert (Caretta et al, 1979; Yee and Liebman, 1978; Liebman und Pugh, 1979; Baehr et al, 1979). Diese Phosphodiesterase hydrolysiert c-GMP, so daß unter Belichtung der c-GMP-Spiegel im ROS absinkt. Viele Protein-Kinasen werden durch cyclische Nukleotide reguliert, daher wäre es denkbar, daß die Kinase-Aktivität über die c-GMP-Konzentration gesteuert wird. Es ist jedoch gezeigt worden, daß c-GMP in physiologischen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Rhodopsin-Phosphorylierung ausübt (Goridis und Weller, 1976 und eigene Versuche). Auch Versuche, über Inhibitoren der Phosphodiesterase die Phosphorylierung des Rhodopsins zu beeinflussen, blieben erfolglos (Goridis und Weller, 1976; Leser 1979). Umgekehrt zeigen Inhibitoren der Phosphorylierung, z. B. Adenosin, auch keinerlei Wirkung auf die Lichtaktivierung der Phosphodiesterase (Frank und Buzney, 1977).

Dennoch scheint ein Zusammenhang zwischen den beiden Reaktionen zu existieren. In Gegenwart von genügend GTP scheint die lichtabhängige Aktivierung der Phosphodiesterase in vitro irreversibel zu sein, Inaktivierung erfolgt erst nach Verbrauch des vorhandenen GTP durch die GTPase (Yee und Liebman, 1978). Liebman und Pugh (1980) stellten jedoch fest, daß Zugabe von ATP nach kleinen Bleichungen (1:50000) die Lichtaktivierung der Phosphodiesterase innerhalb weniger Sekunden rückgängig macht. Für diese Inaktivierung schien ATP-Hydrolyse erforderlich zu sein, denn das nicht hydrolysierbare AMP-PNP war nicht in der Lage, ATP zu ersetzen. Die Autoren vermuteten daher, daß es die Phosphorylierung des Rhodopsins ist, die zur Inaktivierung der Phosphodiesterase führt. Um diese Vermutung zu bestätigen oder zu widerlegen, sind noch einige weiterführende Versuche erforderlich. Es wäre z. B. zu prüfen, ob voll durchphosphorylierte und regenerierte ROS-Präparationen tatsächlich keine Lichtaktivierung der Phosphodiesterase mehr zeigen. Ferner wäre der Zeitverlauf der Phosphorylierung bei sehr kleinen Bleichungen zu untersuchen. Vorläufig stehen solche Versuche und damit ein direkter Nachweis für die Richtigkeit der Hypothese von Liebman und Pugh noch aus.

Bei allen bisherigen Dephosphorylierungsversuchen bleibt die Reaktion auf einem bestimmten Niveau stehen. Das kann nicht daran liegen, daß sich ein Gleichgewicht mit der Phosphorylierung einstellt. Die Dephosphorylierung verhält sich ebenso unter Bedingungen, unter denen keine Phosphorylierung stattfindet (ATP- oder Mg^{2+} -Mangel, EDTA-Überschuß). Bei voll durchphosphoryliertem Rhodopsin liegt dies Niveau reproduzierbar bei 40 % Dephosphorylierung. In vivo muß jedoch ein vollständiger Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Cyclus ablaufen, denn sonst wäre der gesamte Rhodopsin-Bestand bald voll phosphoryliert. Das legt die Vermutung nahe, daß verschiedene Phosphat-Bindungsstellen am Rhodopsin verschiedene Dephosphorylierungsbedingungen erfordern. Von den bisher bekannten Bindungsstellen sind 3 Serin- und 4 Threonin-Reste, die beiden anderen sind noch unbekannt (Hargrave et al, 1980). Möglicherweise wird unter den bisher versuchten Bedingungen nur Phospho-Serin oder nur Phospho-Threonin dephosphoryliert; oder die Bindungsverhältnisse für die Phosphatase sind am Rhodopsin-Molekül örtlich verschieden, erfordern verschiedene Co-faktoren. Theoretisch könnte auch die Regeneration des Opsins zu Rhodopsin ein solcher "Co-faktor" sein, aber dann müßte die Dephosphorylierung unter hellem Weißlicht durch "recycling" voranzutreiben sein, was nicht der Fall ist.

Leider ist noch so gut wie nichts über die Phosphatase bekannt. Sie ist weder identifiziert noch gereinigt worden, man weiß nicht einmal, ob sie membrangebunden oder löslich ist. Es könnten durchaus auch zwei oder mehrere Phosphatasen existieren, die auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Um hier präzisere Aussagen machen zu können, ist noch viel experimentelle Arbeit erforderlich.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die lichtabhängige Phosphorylierung des Rhodopsins wurde an Stäbchenaußensegment-Suspensionen von Rind und Frosch unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Für Frosch- sowie für Rinder-Rhodopsin wurde unter optimalen Bedingungen ein maximaler Durchschnitts-Phosphorylierungsgrad von $7,0 \pm 0,3$ mol Phosphat pro mol Rhodopsin gefunden. Zwei voneinander unabhängige Meßmethoden führten zum gleichen Ergebnis.
 2. Phosphorylierte Rinder-Rhodopsin-Proben wurden mit Hilfe der Ionenaustauscher-Chromatographie in Rhodopsin-Fractionen unterschiedlicher Phosphorylierungsgrade aufgetrennt, um ein Bild über die Verteilung der Phosphorylierungsgrade auf die verschiedenen Rhodopsin-Moleküle in einer Population mit bekanntem Durchschnitts-Phosphorylierungsgrad zu bekommen. Die Verteilung erwies sich als ziemlich ungleichmäßig. Immer wurde neben verschieden hoch phosphorylierten Rhodopsinen auch unphosphoryliertes Rhodopsin im Gemisch gefunden, selbst bei dem höchsten erreichbaren Durchschnitts-Phosphorylierungsgrad von 7,0 mol Phosphat pro mol Rhodopsin waren noch 2-3 % des Rhodopsins unphosphoryliert. Als höchster Phosphorylierungsgrad am einzelnen Rhodopsin-Molekül wurden 9 mol Phosphat pro mol Rhodopsin gefunden. Alle Phosphorylierungsgrade zwischen 0 und 9 mol Phosphat pro mol Rhodopsin können am einzelnen Rhodopsin-Molekül auftreten.
 3. Es wurde versucht, herauszufinden, ob die Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung unter etwas physiologischeren Bedingungen ebenso langsam ist wie bei der völlig unphysiologischen 100 %igen Bleichung. Versuche mit kleineren Bleichungen und mit Kinase-Anreicherung zeigten, daß die Phosphorylierung unter diesen Bedingungen wesentlich schneller verläuft.
 4. Dephosphorylierungsversuche mit Frosch- und Rinder-Rhodopsin führten zur Freisetzung von maximal etwa 60 % des inkorporierten Phosphats.
- Eine mögliche Rolle der Phosphorylierung bei der Steuerung lichtabhängiger Enzym-Reaktionen wird diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- B.N. Ames and D.T. Dubin (1960)
Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases.
J. Biol. Chem. 235, 769
- W. Baehr; M.J. Devlin and M.L. Applebury (1979)
Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments.
J. Biol. Chem. 254, 11669-11677
- R. Beliveau and G. Bellmare (1979)
Light-dependent phosphorylation of thylakoid membrane polypeptides.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 797-803
- A.L. Berman, A.M. Azimova and F.G. Gribakin (1977)
Localisation of Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺-activated Mg²⁺-dependent ATPase in toad retinal rod outer segments.
Biochemistry 17 (15), 3005-3011
- M.W. Bitensky, G.L. Wheeler, B. Aloni, S. Vetury and Y. Matuo (1978)
Light- and GTP-activated photoreceptor phosphodiesterase: Regulation by a light-activated GTPase and identification of rhodopsin as the phosphodiesterase binding site.
Adv. Cycl. Nucl. Res. 9, 553-572
- P.J.G.M. van Breugel, F.J.M. Daemen and S.L. Bonting (1977)
Biochemical Aspects of the visual process. XXXIII. A convenient purification procedure of rhodopsin by means of affinity chromatography.
Exp. Eye Res. 24, 581-585
- A. Caretta, A. Gavaggioni and R.T. Sorbi (1979)
Phosphodiesterase and GTPase in rod outer segments. Kinetics in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 583, 1-13
- M. Chabre and A. Cavaggioni (1975)
X-ray diffraction studies of retinal rods.
Biochim. Biophys. Acta 382, 336-343
- M. Chabre (1976)
Our present knowledge of calcium or hydrogen ions as transmitters in the vertebrate rod outer segments.
Biophys. Struct. Mechanism 3, 55-58
- P. Cohen (1976)
The regulation of protein function by multisite phosphorylation.
TIBS - February 1976, 38-40
- A.J. Cohen (1970)
Further studies on the question of the patency of saccules in outer segments of vertebrate photoreceptors.
Vis. Res. 10, 445-453
- F.J.M. Daemen (1973)
Vertebrate rod outer segment membranes.
Biochim. Biophys. Acta 300, 255-288

- G.L. Fain (1976)
Sensitivity of toad rods: dependence on wavelength and background illumination.
J. Physiol. 261, 71-101
- R.N. Frank and S.M. Buzney (1977)
Rhodopsin phosphorylation and retinal rod outer segment cyclic nucleotide phosphodiesterase: Lack of a causal relationship.
Exp. Eye Res. 25, 495-504
- W. Godchaux and W.F. Zimmermann (1979)
Membrane-dependent guanine nucleotide binding and GTPase activity of soluble proteins from bovine rod outer cell segments.
J. Biol. Chem. 254, 7874-7884
- A.S. Gordon, C.G. Davis and I. Diamond (1977)
Phosphorylation of membrane proteins at a cholinergic synapse.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1), 263-267
- C. Goridis and M. Weller (1976)
A role for cyclic nucleotides and protein kinase in vertebrate photoreception.
Adv. Biochem. Psychopharm. 15, 391-412
- W.A. Hagins, D.R. Penn and S. Yoshikami (1970)
Kinetics of the photocurrent of retinal rods.
Biophys. J. 12, 1073-1094
- P.A. Hargrave, S.L. Fong, J.H. McDowell, M.T. Mas, D.C. Curtis, J.K. Wang, E. Juszczak and D.P. Smith (1980)
The partial primary structure of bovine rhodopsin and its topography in the retinal rod cell disc membrane.
Neurochemistry 1, 231-244
- T. Hendriks, F.J.M. Daemen and S.L. Bonting (1974)
Biochemical aspects of the visual process XXV. Light-induced movements in isolated frog rod outer segments.
Biochim. Biophys. Acta 345, 468-473
- J.G. Hollyfield and M.E. Rayborn (1978)
Photoreceptor outer segment development - Light and dark regulate the rate of membrane addition and loss.
Invest. Ophthalmol. Visual 18 (2), 117-132
- W.L. Hubbell and D. Bownds (1979)
Visual transduction in vertebrate photoreceptors.
Ann. Rev. Neurosci. 2, 17-34
- L.Y. Jan and J.P. Revel (1975)
Hemocyanin - antibody labeling of rhodopsin in mouse retina for scanning electron microscope study.
J. Supramol. Struct. 3 (1), 61-66
- E.G. Krebs and J.A. Beavo (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.
Ann. Rev. Biochem. 48, 923-959
- B.K. Krueger, J. Forn and P. Greengard (1977)
Depolarization-induced phosphorylation of specific proteins, mediated by calcium ion influx, in rat brain synaptosomes.
J. Biol. Chem. 252 (8), 2764-2773

- H. Kühn (1974)
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin in living frogs.
Nature 250 (5467), 588-590
- H. Kühn (1978)
Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. Biochemistry 17, 4389-4395
- H. Kühn (1980)
Light- and GTP-regulated interactions of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes.
Nature 283, 587-589
- H. Kühn and S. Bader (1976)
The rate of rhodopsin phosphorylation in isolated retinas of frog and cattle.
Biochim. Biophys. Acta 428, 13-18
- H. Kühn, J.H. Cook and W.J. Dreyer (1973)
Phosphorylation of rhodopsin in bovine photoreceptor membranes. A dark reaktion after illumination. Biochemistry 12 (13), 2495-2502
- H. Kühn and W.J. Dreyer (1972)
Light-dependent phosphorylation of rhodopsin by ATP.
FEBS Letters 20 (1), 1-6
- H. Kühn, J.H. McDowell, K.H. Leser and S. Bader (1977)
Phosphorylation of rhodopsin as a possible mechanism of adaptation.
Biophys. Struct. Mechanism 3, 175-180
- H. Kühn and U. Wilden (1981)
Assay of phosphorylation of rhodopsin in vitro and in vivo.
In "Methods of Enzymology" Academic Press (im Druck)
- K.H. Leser (1979)
Vergleichende elektroretinographische und biochemische Untersuchungen zum Mechanismus des Sehvorganges an isolierten Frosch-Netzhäuten (Rana esculenta).
Dissertation am Institut für Neurobiologie der KFA Jülich
- P.A. Liebman and G. Entine (1968)
Visual pigments of frog and tadpole (R. Pipiens).
Vis. Res. 8, 761-775
- P.A. Liebman and E.N. Pugh (1979)
The control of phosphodiesterase in rod disc membranes - kinetics, possible mechanisms and significance for vision.
Vision Res. 19, 375-380
- P.A. Liebman and E.N. Pugh (1980)
ATP mediates rapid reversal of cyclic GMP phosphodiesterase activation in visual receptor membranes.
Nature 287, 734-735
- S.A. Lipton, S.E. Ostroy and J.E. Dowling (1977)
Electrical and adaptive properties of rod photoreceptors in Bufo marinus.
J. Gen. Physiol. 59, 747-770

- H. Maeno and P. Greengard (1972)
Phosphoprotein phosphatases from rat cerebral cortex.
J. Biol. Chem. 247 (10), 3269-3277
- H. Maeno, T. Ueda and P. Greengard (1975)
Adenosine 3', 5'-monophosphat-dependent protein phosphatase activity in synaptic membrane fractions.
J. Cyclic Nucleotide Res. 1, 37-48
- M. Makino, T. Hamanaka, Y. Orii and Y. Kito (1977)
Fractionation of rhodopsin and other components in the rod outer segment membrane by ammonium sulfate salting out.
Biochim. Biophys. Acta 495, 299-311
- J.A. Miller, A.E. Brodie and M.D. Bownds (1975)
Light-activated rhodopsin-phosphorylation may control light sensitivity in isolated rod outer segments.
FEBS Letters 59 (1), 20-23
- J.A. Miller and R. Paulsen (1975)
Phosphorylation and dephosphorylation of frog outer segment membranes as part of the visual process.
J. Biol. Chem. 250 (12), 4427-4432
- J.A. Miller, R. Paulsen and M.D. Bownds (1977)
Control of light-activated phosphorylation in frog photo-receptor membranes.
Biochemistry 16, 2633-2639
- M. Montal (1979)
Rhodopsin in model membranes.
Biochim. Biophys. Acta 559, 231-257
- J.H. McDowell and H. Kühn (1977)
Light-induced phosphorylation of rhodopsin in cattle photo-receptor membranes: substrate activation and inactivation.
Biochemistry 16, 4054-4060
- N.G. Meelien and A. Matus (1979)
Long duration phosphorylation of synaptic membrane proteins.
Neuroscience 4, 1265-1274
- R. Paulsen and K. Schürhoff (1979)
The localization of phosphorylated rhodopsin in the frog outer segments.
Euro. J. Cell. Biol. 19, 35-39
- R.D. Penn and W.A. Hagins (1972)
Kinetics of the photocurrent of retinal rods.
Biophys. J. 12, 1073-1094
- J.S. Pober and M.W. Bitensky (1979)
Light-regulated enzymes of vertebrate retinal rods.
Adv. Cycl. Nucl. Res. 11, 265-301
- W.E. Robinson, S. Yoshikami and W.A. Hagins (1975)
ATP in retinal rods.
Biophys. J. 15, 168a
- P.P.M. Schnetkamp (1980)
Ion selectivity of the cation transport system of isolated intact cattle rod outer segments. Evidence for a direct communication between the rod plasma membrane and the rod disk membranes.
Biochim. Biophys. Acta 598 (1), 66-90

- E. Schoffeniels and G. Dandrifosse (1980)
Protein phosphorylation and sodium conductance in nerve membranes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77 (2), 812-816
- H. Shichi and R.L. Somers (1978)
Light dependent phosphorylation of rhodopsin.
J. Biol. Chem. 253 (19), 7040-7046
- H. Shichi and Th.C. Williams (1979)
Rhodopsin phosphorylation suggests biochemical heterogeneities of retinal rod discs.
J. Supramol. Struct. 12, 419-424
- J.L. Spudich and W. Stoeckenius (1980)
Light-regulated retinal-dependent reversible phosphorylation of Halobacterium proteins.
J. Biol. Chem. 255, 5501-5503
- H. Stieve (1976)
Photorezeption und ihre molekularen Grundlagen.
Berichte der Kernforschungsanlage Jülich - Nr. 1313
- W.L. Stone and E.A. Dratz (1977)
Visual photoreceptors.
Photochem. Photobiol. 26, 79-85
- E. Szuts and R. Cone (1977)
Calcium content of frog rod outer segments and discs.
Biochem. Biophys. Acta 468, 194-208
- V.I. Teichberg, A. Sobel and J.-P. Changeux (1977)
In vitro phosphorylation of the acetylcholine receptor.
Nature 267, 540-542
- T. Tomita (1970)
Electrical activity of vertebrate photoreceptors.
Q. Rev. Biophys. 3, 179-222
- J. Toyoda, H. Hashimoto, H. Anno and T. Tomita (1970)
The rod response in the frog as studied by intracellular recording.
Vision Research 10, 1093-1100
- S.M. Thacher (1978)
Light-stimulated magnesium-dependent ATPase in toad retinal rod outer segments.
Biochemistry 17 (15), 3005-3011
- R. Uhl, T. Borys and W. Abrahamson (1979)
Evidence for structural changes in the photoreceptor disc membrane, enabled by magnesium-ATPase activity and triggered by light.
FEBS Letters 107 (2), 317-322
- I. Uno, T. Ueda and P. Greengard (1977)
Enzyme systems involved in phosphorylation and dephosphorylation of two endogenous phosphoproteins in neuronal membranes.
Arch. Biochem. Biophys. 183, 480-489

- M. Weller, N. Virmaux and P. Mandel (1974)
Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina:
the presence of a protein kinase that is specific for photo-
bleached rhodopsin.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 381-385
- G.L. Wheeler and M.W. Bitensky (1977)
A light-activated GTPase in vertebrate photoreceptors:
Regulation of light activated cyclic GMP phosphodiesterase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 14, 4238-4242
- M. Williams and R. Rodnight (1977)
Protein phosphorylation in nervous tissue: Possible involment
in nervous tissue function and relationship to cyclic nucleo-
tide metabolism.
Progress in Neurobiology 8, 183-250
- M. Williams (1979)
Protein phosphorylation in the mammalian nervous system.
TIBS - February 1979, 25-28
- M. Woodruff and D. Bownds (1979)
Amplitude, kinetics and reversibility of a light-iduced
decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in frog
photoreceptor membranes.
J. Gen. Physiol. 73, 629-653
- R. Yee and P.A. Liebman (1978)
Light-activated phosphodiesterase of the rod outer segment.
J. Biol. Chem. 253, 8902-8909

Mein Dank gilt all denen, die durch konstruktive Kritik und stetige Diskussionsbereitschaft am Zustandekommen dieser Arbeit mitgewirkt haben: Herrn Dr. H. Kühn, Herrn Prof. Dr. H. Stieve, Herrn Dr. P.-J. Bauer sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Neurobiologie. Besonders danke ich Herrn R. Esser für die Beschaffung der Rinderaugen vom Schlachthof und Herrn Overath für die Beschaffung der Frösche und ihre Betreuung in der Tierhaltung.

Vor allem habe ich Frau O. Mommertz zu danken für ihre hervorragende technische Assistenz bei den Versuchen 3.1.3.2, 3.2.4 und 3.5.1 und für die Herstellung des größten Teils der Rinder-ROS-Präparationen. Herrn Dr. W. Sperling danke ich für die freundliche Überlassung von 11-cis Retinal und meinem Mann, R. Wilden, für seine Hilfe bei der Anfertigung der graphischen Darstellungen.

Jülich, den 10. Dezember 1980

R. Wilden

