

Karin Abarca Heidemann: Biochemische und biophysikalische Charakterisierung des GARP2-Proteins aus Sehtäbchen der Rindernetzhaut. 2003

GARP2 ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in ROS, und wird nur in dieser exprimiert. Verteilung und Häufigkeit von GARP2 deuten auf eine wichtige Rolle innerhalb des Sehsystems hin, die physiologische Funktion ist jedoch unbekannt. Bisherige Untersuchungen zur Identifizierung von Interaktionspartnern und der physiologischen Funktion der GARP-Proteine lieferten zum Teil uneindeutige Resultate (Körschen et al., 1999; Poetsch et al., 2001). Experimente mit rekombinanten GARP2 deuteten auf eine mögliche Inhibierung der PDE hin. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig erfolgreich natives GARP2 aus ROS des Rindes gereinigt. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche rekombinante GARP2-Proteine hergestellt, exprimiert und gereinigt. Detaillierte Untersuchungen zu den strukturellen und biochemischen Eigenschaften der gereinigten GARP2-Proteine zeigte, dass das abnorme Laufverhalten von GARP2 in der SDS-PAGE nicht auf einer Dimerisierung des Proteins beruht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass GARP2 ein nicht-globuläres Protein ist. Durch CD konnte zudem die Sekundärstruktur der Proteine aufgeklärt werden. Das Wissen über die biochemische und biophysikalische Eigenschaften von GARP2 stellen eine fundierte Grundlage für zukünftige Kristallisations- Experimente dar. Die Überprüfung der Interaktion von GARP2 mit anderen Proteinen in ROS durch verschiedene Methoden, wie Gelfiltration, Affinitätschromatographie und kovalenter Quervernetzung, zeigten ferner, dass GARP2 mit RDS/Peripherin und möglicherweise auch mit RGS9 interagiert. Ebenfalls konnte eine Wechselwirkung mit Proteinen mit einem apparenten Mw von ~18 kDa, ~30 kDa bzw. ~70 kDa gezeigt werden. Eine Interaktion zu der GC, der PDE und dem ABCR konnte nicht eindeutig bestätigt werden. Der Einfluss des gereinigtes, natives GARP2 auf die PDE-Aktivität hat, wurde vergleichend zu dem der rekombinanten GARP2-Proteine ebenfalls untersucht. Hier konnte keine durch natives GARP2 verursachte Inhibierung der PDE- Aktivität gezeigt werden. Die zuvor beobachtete Inhibierung (Körschen et al., 1999) der PDE-Aktivität wurde durch den Fusionsanteil des HT-GARP2 verursacht. Durch die Herstellung monoklonaler Antikörper wurde zusätzlich in dieser Arbeit die Basis geschaffen, weitere biochemische und immunhistochemische Analysen durchzuführen.

The GARP proteins of rods have been localized exclusively at the disc incisures and rims that are in close proximity to the plasma membrane. GARP2 is the most abundant GARP species, and a major protein in ROS. The localization and the amount of GARP2 indicate that it may have an important role in rod phototransduction. Studies focusing on the protein/protein interactions involving GARP proteins have revealed contradictory results (Körschen et al., 1999; Poetsch et al., 2001). The present work describes the purification of native GARP2 from bovine ROS. Furthermore this work describes the cloning, expression and purification of two different recombinant GARP2 proteins. A detailed analysis of the structural and biochemical characteristics of the purified proteins shows that the unusual running behavior of GARP2 is not due to dimerisation. The results also strongly suggest that GARP2 is not a globular protein. Moreover the GARP2 secondary structure was analyzed by CD. The interaction of GARP2 with proteins was studied by gel filtration, affinity chromatography, and crosslinking. These experiment show that GARP2 interacts with RDS/peripherin and possibly also with RGS9. Besides, an interaction to unknown proteins with an apparent Mw of ~18 kDa, ~30 kDa and ~70 kDa could be detected. The interactions with the PDE, the GC, and the ABCR could not be proven. Using the purified GARP2 proteins, the effect on the activated PDE was examined. The previously shown powerful inhibition of PDE by the recombinant HT-GARP2 could be reproduced, but using native GARP2 no inhibition was observed. These results suggest that the fusion part of the HT-GARP2 is responsible for the inhibitory effect. These findings and the monoclonal antibodies against the different GARP proteins, provide a solid basis to perform further biochemical, immunohistochemical and cristallographic studies.