

Abstract

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

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

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

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

Zusammenfassung

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

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

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

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