

**Der Aktivierungsmechanismus von Rhodopsin -  
Untersuchungen zur Rolle der siebenten und achten Helix  
sowie des  $\beta$ -Ionon-Rings**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biophysik

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Dipl.-Ing. Olaf Fritze  
geboren am 13.10.1970 in Pasewalk

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:           1. Prof. Dr. Klaus Peter Hofmann  
                          2. Prof. Dr. Peter Hegemann  
                          3. PD Dr. Oliver Ernst

Tag der mündlichen Prüfung:   15.09.2006



## Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) werden von ca. 3-4 % des humanen Genoms kodiert und nehmen eine herausragende Stellung in der Leitung und Verstärkung zellulärer Signale ein. Die Visuelle Kaskade in retinalen Photorezeptorzellen stellt ein umfangreich untersuchtes und biophysikalisch gut zugängliches Modell-System einer G-Protein-gekoppelten Signalkaskade dar. Von Palczewski *et al.* wurde 2000 die erste hochaufgelöste Röntgenstruktur-Analyse eines GPCR, des Rhodopsins, veröffentlicht. Über Sequenzhomologievergleiche der Primärstruktur von GPCRs wurden Motive gefunden, die in GPCRs hochkonserviert und von übergeordneter funktioneller Bedeutung sind. Neben verschiedenen Aminosäuren und Motiven, deren Funktion bekannt ist, existiert am cytoplasmatischen Ende der Helix VII ein hochkonserviertes NPxxY Motiv (Aminosäuresequenz Asn-Pro-X-X-Tyr), dessen Funktion noch nicht geklärt werden konnte. Die Seitenkette des in diesem Motiv enthaltenen Tyr bildet eine hydrophobe Brücke zu einem ebenfalls in GPCRs hoch konservierten Phe, welches sich in der parallel zur Membran liegenden achten Helix befindet (daher NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F Motiv genannt). Die Rolle dieser Proteinregion bei der Rezeptor-Aktivierung und der G-Protein-Aktivierung sowie die Funktion der Ringstruktur des Retinals stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Hierzu wurden verschiedene Aminosäurereste im Rhodopsin mittels sequenzspezifischer Mutagenese ausgetauscht und die so veränderten Pigmente mit biophysikalischen und proteinchemischen Methoden charakterisiert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die konservierten Aminosäurereste des NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F Motivs eine direkte Rolle bei der Ausbildung der aktiven Rezeptorkonformation spielen. Bei einer Störung der hydrophoben Interaktion mit der achten Helix (Helix-8) wurde einerseits beobachtet, dass die für die Ausbildung der aktiven Rezeptorkonformation nötigen Protonierungsschritte erleichtert werden, andererseits hat dies jedoch eine gleichzeitige Einschränkung der Bindung und Aktivierung des retinalen G-Proteins Transducin (Gt) zur Folge. Offensichtlich ist diese Region an der Gt-Interaktion beteiligt und die Ergebnisse verdeutlichen, dass konformative Veränderungen in diesem Proteinbereich an den gesamten Aktivierungsmechanismus von Rhodopsin gekoppelt sind.

Auf eine Rolle der achten Helix bei der Interaktion mit dem G-Protein wurde bereits in verschiedenen Studien hingewiesen. Diesbezüglich wurden Untersuchungen an Rezeptor-Chimären weitergeführt, bei denen Teile der Helix-8 des Rhodopsins durch homologe Aminosäuresequenzen des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors ersetzt wurden. Auch bei dieser Studie wurde deutlich, dass die korrekte Faltung bzw. Positionierung der Helix-8 eine notwendige Voraussetzung für die Fähigkeit des Rezeptors ist, Gt zu aktivieren. Überdies sprechen die Ergebnisse für einen übergeordneten Mechanismus bei der Interaktion zwischen GPCRs und dem G-Protein, da eine bezüglich der Gt-Aktivierung funktionsfähige Chimäre mit der achten Helix vom  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor gefunden wurde.

Bei der Erforschung des Aktivierungsmechanismus von Rhodopsin wurde dem Retinal neben der Rolle als „stereochemischer Schalter“ auch die Funktion eines Gerüsts zugewiesen, an welchem sich das Opsin sowie dessen Protonentransfergruppen während der Aktivierung ausrichten. Analog zu den Studien am partiellen Agonisten 11-*cis*-9-demethyl Retinal (9-dm-Retinal) wurde in dieser Arbeit ein Retinal untersucht, bei welchem Teile des  $\beta$ -Ionon-Rings fehlten, das sogenannte "azyklische Retinal" (azykl.-Retinal). Diesem azykl.-Retinal können Eigenschaften eines partiellen Agonisten zugeschrieben werden. Trotz kleiner Unterschiede zur Aktivierung von Pigmenten mit 11-*cis*-Retinal, ist die initiale Energieaufnahme durch die Retinal-Isomerisierung sowie die Weiterleitung der Lichtenergie ins Protein für beide Pigmente im Wesentlichen gleich. Allerdings wird die Energie schlechter auf das Protein übertragen, wodurch wesentlich weniger der aktiven G-Protein bindenden Rezeptorkonformation gebildet wird. Als wichtige Funktion des Retinal-Rings wurde zudem die Aufrechterhaltung der aktiven Meta-II-Konformation identifiziert.



Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Fritze O., Filipek S., Kuksa F., Palczewski K., Hofmann K.P., Ernst O.P.: „Role of the conserved NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F motif in the rhodopsin ground state and during activation“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 2290-2295 (2003).

Bartl F.J., Fritze O., Ritter E., Herrmann R., Kuksa V., Palczewski K., Hofmann K.P., Ernst O.P.: „Partial agonism in a G protein-coupled receptor: role of retinal's ring structure in rhodopsin activation“, J. Biol. Chem. **280**(40), 34259-67 (2005).



INHALTSVERZEICHNIS	Seite
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Liste der Abkürzungen</b>	<b>8</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Rhodopsin, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Die visuelle Kaskade der Stäbchenzelle</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Struktur und Photoaktivierung des Rhodopsins</b>	<b>15</b>
1.3.1. Struktur des Rhodopsins	15
1.3.2. 11- <i>cis</i> -Retinal – der Chromophor des Rhodopsins	18
1.3.3. Photoaktivierung des Rhodopsins	18
1.3.4. Die Bedeutung des hochkonservierten D(E)RY-Motivs	21
<b>1.4. Das G-Protein Transducin und seine Interaktion mit Rhodopsin</b>	<b>22</b>
1.4.1. Transducin, ein heterotrimeres G-Protein	22
1.4.2. Struktur von Transducin	22
1.4.3. Interaktion zwischen Transducin und Rhodopsin	24
<b>1.5. Ziel der Arbeit</b>	<b>28</b>
1.5.1. Die Rolle des NPxxY(x) <sub>5,6</sub> F-Motivs bei der Rhodopsinaktivierung	28
1.5.2. Die Rolle der achten Helix von Rhodopsin bei der Transducinbindung	29
1.5.3. Die Rolle des Retinal-Rings bei der Rhodopsinaktivierung	30
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Materialien und Chemikalien</b>	<b>31</b>
2.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen	31
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	32
2.1.3. COS-1 Zellen	32
2.1.4. Retinale	32
<b>2.2. Geräte</b>	<b>33</b>
<b>2.3. Proteinchemische Methoden</b>	<b>33</b>
2.3.1. Präparation von Außensegmenten der Stäbchenzelle	33
2.3.2. Präparation gereinigter Diskmembranen	34
2.3.3. Transducin-Präparation aus Stäbchenaußensegmenten	35

2.3.4.	Präparation von Transducin-Untereinheiten	36
2.3.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.3.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
<b>2.4.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>37</b>
2.4.1.	Klonierung der Opsin-Mutanten	37
2.4.2.	Annealing von Oligonukleotiden	38
2.4.3.	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	38
2.4.4.	Restriktionsverdau von DNA-Plasmiden	38
2.4.5.	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
2.4.6.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	39
2.4.7.	Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.4.8.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen (RbCl-Methode)	39
2.4.9.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	40
2.4.10.	Isolierung präparativer Mengen Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.4.11.	Reinheit und Konzentration der Plasmid-DNA	40
2.4.12.	DNA-Sequenzierung	41
<b>2.5.</b>	<b>Präparation von Rhodopsin-Mutanten</b>	<b>41</b>
2.5.1.	Transiente Transfektion von COS-1 Zellen mittels DEAE-Dextran-Methode	41
2.5.2.	Ernte der transfizierten COS-1 Zellen	42
2.5.3.	Rekonstitution von rekombinantem Opsin mit Retinal	42
2.5.4.	Herstellung des 1D4-Immuno-Affinitätsgels	42
2.5.5.	Reinigung der Pigmente mittels Immuno-Affinitätschromatographie	43
2.5.6.	Opsin-Reinigung	44
2.5.7.	Knüpfung von Disulfidbrücken durch Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen	45
2.5.8.	Quantifizierung der Sulfhydryl-Gruppen	45
<b>2.6.</b>	<b>Methoden zur biophysikalischen Charakterisierung der Pigmente</b>	<b>46</b>
2.6.1.	UV/Vis-Spektroskopie	46
2.6.2.	Fluoreszenzspektroskopische Messung der Transducin-Aktivierung	46
2.6.3.	Messung des Meta-II-Zerfalls mittels Fluoreszenz-Spektroskopie	48
2.6.4.	FTIR-Spektroskopie	49
<b>3.</b>	<b>DIE NPXXY(X)<sub>5,6</sub>F-REGION</b>	<b>51</b>
<b>3.1.</b>	<b>Sequenz-Vergleich</b>	<b>52</b>
<b>3.2.</b>	<b>Untersuchung der rekombinanten Pigmente mittels UV/Vis-Spektroskopie</b>	<b>53</b>
<b>3.3.</b>	<b>Auswirkung einer zusätzlichen E134Q-Mutation im hochkonservierten D(E)RY-Motiv</b>	<b>55</b>



<b>3.4. Fluorometrische Messung der Transducin-Aktivierung</b>	<b>56</b>
3.4.1. Optimierung des fluorometrischen Gt-Aktivierungsassays	56
3.4.2. Modifizierung des Gt-Aktivierungsassays zur Messung der Rhodopsinaktivität im Grundzustand	58
3.4.3. Effekte der Mutationen auf die Transducin-Aktivierung	59
<b>3.5. Erhöhung der Gt<math>\beta\gamma</math> / R* Affinität durch die P303A-Mutation</b>	<b>61</b>
<b>3.6. pH-abhängiges Meta-I/Meta-II Gleichgewicht der Pigmente mit 9-dm-Retinal</b>	<b>62</b>
<b>3.7. Meta-I/Meta-II Gleichgewicht der 9-dm-Pigmente in Anwesenheit von Transducin bzw. Transducin-Peptiden</b>	<b>64</b>
<b>3.8. Meta-II-Zerfall in Apoprotein und Retinal</b>	<b>67</b>
<b>3.9. Glykosylierung der Opsine</b>	<b>68</b>
<b>3.10. Disulfidbrücke zwischen Y306 und F313</b>	<b>70</b>
<b>3.11. FTIR-Spektroskopische Untersuchung der rekombinanten Pigmente</b>	<b>74</b>
<b>3.12. Weitere untersuchte Mutationen in der NPxxY-Region</b>	<b>79</b>
<b>3.13. Diskussion</b>	<b>81</b>
<b>4. DIE ROLLE DER ACHTEN HELIX DES RHODOPSINS BEI DER INTERAKTION MIT DEM G-PROTEIN</b>	<b>87</b>
4.1. pH-abhängiges Meta-I/Meta-II Gleichgewicht der untersuchten 9-dm-Pigmente	88
4.2. Bindungsassay mit Gt $\alpha$ (340-350)HAA Peptid und Transducin-Aktivierung	89
4.3. Diskussion	91
<b>5. ROLLE DES RETINAL-RINGS BEI DER RHODOPSIN-AKTIVIERUNG</b>	<b>95</b>
5.1. UV/Vis-Spektroskopie zum Einfluss des Retinals auf das Meta-I/Meta-II Gleichgewicht	97
5.2. FTIR-Spektroskopie	101
5.2.1. Meta-Intermediate von Rhodopsin mit azyklischem Retinal	101
5.2.2. Meta-II mit reprotonierter Schiffbase bei Rhodopsin mit azyklischem Retinal	103
5.2.3. Erleichterte Bildung von Meta-II durch die E134Q Mutation im Pigment mit azyklischem Retinal	104
5.3. Katalytische Aktivität bezüglich des Nukleotidaustausches im Transducin	106

<b>5.4.</b>	<b>Beschleunigte Abnahme der Transducin-Aktivierung bei Pigmenten mit azyklischem Retinal</b>	<b>107</b>
<b>5.5.</b>	<b>Beschleunigter Meta-II-Zerfall der Pigmente mit azyklischem Retinal</b>	<b>108</b>
5.5.1.	Untersuchung der Rhodopsin-Regeneration und des Rhodopsin-Zerfalls an solubilisierten Opsin-Membranen	108
5.5.2.	Untersuchung des Zerfalls rekombinanter solubilisierter Pigmente	111
5.5.3.	Untersuchung der Schiffbase-Hydrolyse von solubilisierten rekombinanten Pigmenten	112
<b>5.6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>115</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>123</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung einer Stäbchenzelle .....	11
Abb. 2: Signaltransduktion der visuellen Kaskade .....	13
Abb. 3: Kristallstruktur von Rhodopsin (2,2 Å).....	16
Abb. 4: Modell der Sekundärstruktur des Rinderrhodopsins .....	16
Abb. 5: Lichtinduzierte Isomerisierung des 11- <i>cis</i> -Retinals zu all- <i>trans</i> -Retinal .....	18
Abb. 6: Modell zur Aktivierung von Rhodopsin durch Lichtabsorption .....	19
Abb. 7: Dreidimensionales Modell der ERY-Region .....	21
Abb. 8: Darstellung der GDP-gebundenen sowie der aktiven Form der Gt $\alpha$ -Untereinheit.....	23
Abb. 9: Interaktionsstellen zwischen dem heterotrimeren G-Protein Transducin und seinem Rezeptor Rhodopsin.....	24
Abb. 10: Struktur der verwendeten Retinale .....	32
Abb. 11: Der eukaryotische Expressionsvektor pMT4 .....	37
Abb. 12: Der Klonierungsvektor pLITMUS-38.....	37
Abb. 13: Modell des Rinderrhodopsins.....	51
Abb. 14: Aminosäure-Sequenz-Vergleich der NPxxY Region von bovinem Rhodopsin mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse A (Rhodopsin-ähnliche GPCRs).....	52
Abb. 15: Spektren der gereinigten rekombinanten Pigmente.....	53
Abb. 16: Effekt der zusätzlichen E134Q-Mutation auf das Meta-I/Meta-II-Gleichgewicht der Alanin-Austauschmutanten.....	55
Abb. 17: Titration der Rhodopsin-Konzentration im fluorometrischen Gt-Aktivierungsassay .....	57
Abb. 18: Graphische Darstellung der Gt-Aktivierungsrate in Abhängigkeit von der Rhodopsinkonzentration .....	57
Abb. 19: Optimierung des Transducin-Aktivierungsassays zur Bestimmung eventueller Aktivität der Pigmente im Dunkelzustand.....	58
Abb. 20: Aktivität der Pigmente im Dunkelzustand am Beispiel der E113Q-Mutante mit einem 11- <i>cis</i> -Retinalanalogon, das nicht um die C <sub>11</sub> -C <sub>12</sub> Bindung isomerisieren kann. ....	58
Abb. 21: Transducin-Aktivierungsassay mit rekombinanten Pigmenten.....	59
Abb. 22: Lichtabhängige Transducin-Aktivierungsraten der rekombinanten Pigmente .....	59
Abb. 23: Effekt der zusätzlichen E134Q-Mutation auf die lichtabhängigen Transducin- Aktivierungsraten der rekombinanten Pigmente .....	60
Abb. 24: Aktivierungsraten der Pigmente bei verschiedenen Stöchiometrien der Transducin- Untereinheiten.....	61
Abb. 25: UV/Vis-Spektren zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Meta-I/Meta-II-Gleich- gewichts von gereinigten 9-dm-Pigmenten .....	63

Abb. 26: UV/Vis Spektren der gereinigten 9-dm-Pigmente in Anwesenheit des $G\alpha(340-350)$ HAA Peptids .....	65
Abb. 27: UV/Vis Spektren der gereinigten 9-dm-Pigmente in Anwesenheit von Transducin .....	66
Abb. 28: Anregungs- und Emissionsspekten von Rhodopsin und Opsin/all- <i>trans</i> -Retinal .....	67
Abb. 29: Fluorometrische Messung des Meta-II Zerfalls .....	68
Abb. 30: Halbwertszeiten des Meta-II Zerfalls der untersuchten Pigmente .....	68
Abb. 31: SDS-Page zum Nachweis der Glykosylierung der mutierten Pigmente des NPxxY <sub>5,6</sub> F-Motivs .....	69
Abb. 32: SDS-Page Wildtyp-Rhodopsin nach Verdau mit N-Glykosidase F .....	70
Abb. 33: Schematische Darstellung der Einführung von Cystein-Resten an Position 306 und 313 für Untersuchungen des Rezeptors bei geöffneter und geschlossener Disulfidbrücke .....	70
Abb. 34: Verschiebung des Absorptionsmaximums der 9-dm-Pigmente mit Y306C und F313C nach Bildung der Disulfidbrücke .....	71
Abb. 35: Reversible Knüpfung der Disulfidbrücke beobachtet im UV/Vis-Spektrum von 9-dm-Y306C/F313C/C316S .....	72
Abb. 36: Bestimmung der Anzahl freier Sulfhydrylgruppen beim Wildtyp, 9-dm-Wildtyp sowie zwei Mutanten, die eine zusätzliche Disulfidbrücke ausbilden können .....	72
Abb. 37: $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid stabilisiert Meta-II bei 9-dm-Wildtyp, nicht aber bei 9-dm-Y306C/F313C/C316S unabhängig von der Ausbildung der Cys306-Cys313 Disulfidbrücke .....	73
Abb. 38: Transducin-Aktivierungsassay mit Y306C/F313C/C316S im reduzierten und oxidierten Zustand .....	74
Abb. 39: FTIR-Differenzspektren von Wildtyp sowie E134Q, Y306A, F313A, P303A und N302A mit 11- <i>cis</i> -Retinal in Detergens .....	75
Abb. 40: FTIR-Differenzspektren von Wildtyp sowie E134Q, Y306A, F313A, P303A und N302A mit 11- <i>cis</i> -9-dm-Retinal in Detergens .....	77
Abb. 41: UV/Vis-Spektren der mit FTIR-Spektroskopie untersuchten Pigmente: Wildtyp, E134Q, Y306A, F313A, P303A und N302A mit 11- <i>cis</i> -9-dm-Retinal in Detergens .....	78
Abb. 42: Dreidimensionales Modell der Region am cytoplasmatischen Ende der Helix-VII .....	79
Abb. 43: UV/Vis Spektren von Rezeptoren mit anderen Mutationen in der NPxxY-Region .....	80
Abb. 44: Lichtabhängige Transducin-Aktivierungsraten von Wildtyp, Y306F, Y306W, I307A, M309A und N310A mit 11- <i>cis</i> -Retinal und 9-dm-Retinal .....	80
Abb. 45: Aminosäure-Sequenz der Helix 8 von bovinem Rhodopsin und der rekombinanten CTr-Pigmente .....	87
Abb. 46: UV/Vis-Spektren zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Meta-Gleichgewichts bei den CTr-Pigmenten mit 9-dm-Retinal .....	88
Abb. 47: UV/Vis Spektren der Pigmente 9-dm-Wildtyp, 9-dm-CTr1, 9-dm-CTr2 und 9-dm-CTr4 in Anwesenheit von $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid .....	89

Abb. 48: Lichtabhängige Transducin-Aktivierungsraten der CTr-Pigmente .....	90
Abb. 49: Dreidimensionales Modell der Region der Helix-8 von bovinem Rhodopsin .....	92
Abb. 50: Struktur der azyklischen Retinale im Vergleich zu 11- <i>cis</i> -Retinal .....	95
Abb. 51: Dreidimensionales Modell der Retinal-Bindungstasche .....	96
Abb. 52: UV/Vis-Spektren von Wildtyp-Rhodopsin und der E134Q-Mutante mit 11- <i>cis</i> -Retinal, 9- <i>dm</i> -Retinal, 9- <i>cis</i> -azyklischem und 11- <i>cis</i> -azyklischem Retinal.....	97
Abb. 53: UV/Vis-Spektren zum Einfluss des azyklischen Retinals auf das Meta-I/Meta-II- Gleichgewicht bei Wildtyp und E134Q.....	98
Abb. 54: UV/Vis-Spektren zu azyklischem Meta-II mit reprotonierter Schiffbase .....	100
Abb. 55: FTIR-Differenzspektren der Meta-Zustände von mit azyklischem Retinal regenerierten Opsin-Membranen im Vergleich zu Rhodopsin .....	101
Abb. 56: Infrarotspektroskopische Charakterisierung von Meta-II mit reprotonierter Schiffbase bei azyklischem Retinal .....	103
Abb. 57: FTIR-Differenzspektrum zur Verschiebung des Meta-Gleichgewichts in Richtung Meta-II-ähnlicher Konformation bei azykl.-E134Q .....	104
Abb. 58: Transducin-Aktivierungsassay und lichtabhängige Transducin-Aktivierungsraten von Wildtyp und E134Q mit 11- <i>cis</i> -azyklischem Retinal .....	106
Abb. 59: Modifizierter Transducin-Aktivierungsassay zur Messung des schnellen Aktivitätsverlustes des lichtaktivierten Wildtyp-Rezeptors mit 11- <i>cis</i> -azyklischem Retinal.....	107
Abb. 60: Zeitlicher Verlauf der Aktivität der belichteten Pigmente und einhergehende Änderung der Trp-Fluoreszenz.....	108
Abb. 61: Fluoreszenzspektroskopische Verfolgung der Regeneration von solubilisierten Opsin- Membranen und Zerfall des Rhodopsins nach Belichtung .....	109
Abb. 62: Zerfall des aktivierten Rhodopsinzustandes in Gegenwart von Gt $\alpha$ (340-350)HAA Peptid .....	110
Abb. 63: Fluorometrische Messung des R*-Zerfalls bei solubilisierten Disk-Membranen , regeneriert mit 11- <i>cis</i> -Retinal, 11- <i>cis</i> -azyklischem Retinal oder 11- <i>cis</i> -9- <i>dm</i> -Retinal .....	111
Abb. 64: Fluorometrische Messung des R*-Zerfallssignals für gereinigtes Wildtyp-Rhodopsin mit 11- <i>cis</i> -Retinal, azyklischem Retinal und 9- <i>dm</i> -Retinal sowie die E134Q-Mutante mit 11- <i>cis</i> -Retinal .....	111
Abb. 65: Bestimmung der Schiffbasen-Hydrolyse-Rate von rekombinanten solubilisierten Rhodopsinen mittels Säuredenaturierung .....	113

## Liste der Abkürzungen

9-dm-Retinal	11- <i>cis</i> -9-demethyl-Retinal
9-dm-Rhodopsin	mit 11- <i>cis</i> -9-demethyl-Retinal regeneriertes Rhodopsin
azykl.-Retinal	11- <i>cis</i> -azyklisches Retinal (4- <i>cis</i> -3,7-Dimethyl-10-Ethyl-2,4,6,8-Dodecatetraenal)
azykl.-Rhodopsin	mit 11- <i>cis</i> -azyklischem Retinal regeneriertes Rhodopsin
BTP	1,3-Bis-[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]-propan
DEAE	Diethylaminoethyl
DM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GDP, GTP	Guanosin-5'-diphosphat, Guanosin-5'-triphosphat
G-Protein	Guanin-Nukleotid bindendes regulatorisches Protein
Gt	Transducin; heterotrimeres G-Protein der visuellen Kaskade
Gt $\alpha$	$\alpha$ -Untereinheit des Transducins
Gt $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Untereinheit des Transducins
GTP $\gamma$ S	Guanosin-5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphat; nicht hydrolysierbares GTP-Analogon
HOOP	C-H-Biegeschwingungen aus der Ebene, englisch: <i>hydrogen out of plane</i>
kDa	Kilodalton
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
Meta-I, Meta-II	Metarhodopsin-I, Metarhodopsin-II
PDE	cGMP-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.17)
R*	Aktive Konformation des Rhodopsins
ROS	Stäbchenzellaußensegment, englisch: <i>rod outer segment</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WM	Hypotonisch gewaschene Diskmembranen, englisch: <i>washed membranes</i>
w/v	Gewicht/Volumen

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Rhodopsin, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor

Spezifische membranständige Rezeptoren detektieren extrazelluläre Reize, wie Licht, Hormone, Neurotransmitter, Geruchs- und Geschmacksstoffe und leiten ein entsprechendes Signal durch die Membran ins Innere der Zelle. Die Fähigkeit lebender Zellen, physikalische oder chemische Änderungen der Umgebung wahrzunehmen und auf sie zu reagieren, ist Voraussetzung für die Koordination von Vorgängen innerhalb eines Organismus sowie für die Anpassung an sich ändernde Lebensbedingungen.

Der Aktivierung des Rezeptors folgt eine Kette biochemischer Reaktionen, wodurch das Signal intrazellulär weitergeleitet wird. Rezeptoren, die Reizinformationen über ein Guanin-Nukleotid-bindendes regulatorisches Protein (G-Protein) weitergeben, bilden die große Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ("*G-protein-coupled receptors*", GPCRs). Durch Sequenzanalysen des humanen Genoms wurden Gene von 1200-1300 GPCRs identifiziert (3-4 % des humanen Genoms, Schöneberg et al., 2002). Die GPCRs bilden somit die größte Gruppe von Membranproteinen.

Anhand eines Vergleichs der Aminosäuresequenz von GPCRs wird angenommen, dass fast alle GPCRs durch sieben weitgehend  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen in der Membran verankert sind. Diese sind alternierend durch extrazelluläre und intrazelluläre Polypeptidketten miteinander verbunden. Der N-Terminus dieser heptahelikalen Rezeptoren befindet sich im extrazellulären Raum, während der C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert ist (Gudermann et al., 1996).

In der aktivierten Form kann die cytoplasmatische Domäne des GPCR an das aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) bestehende G-Protein binden und den Nukleotidaustausch in der  $\alpha$ -Untereinheit katalysieren. Ein GPCR vermag viele G-Proteine zu aktivieren, was einer Signalverstärkung entspricht. Die so aktivierten G-Proteine fungieren als *Transducer*, die das Signal an Effektoren, wie z.B. Enzyme, Ionenkanäle und Transporter, übermitteln. Durch die veränderte Aktivität der Effektoren wird die Konzentration sekundärer Botenstoffe wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen reguliert. Eine solche mehrstufige Signalleitung ermöglicht eine sehr sensible Regulation, die bei einem direkten Mechanismus nicht gegeben wäre.

Die Diversität innerhalb der großen Familie der GPCRs ist ein Resultat eines langen evolutionären Prozesses. Es gibt Hinweise, dass es bereits vor mehr als 750 Millionen Jahren GPCRs gab (Peroutka und Howell, 1994). Trotz ihrer Vielfältigkeit werden sie in fünf Klassen unterteilt, die jeweils eine Sequenzhomologie von mehr als 20 % aufweisen. (zur Klassifizierung von GPCRs siehe <http://www.gpcr.org/7tm/> sowie Schöneberg et al. 2002). 90 % der GPCRs gehören zur Klasse A, welcher auch Rhodopsin zugeordnet wird. Nicht weniger divers sind die entsprechenden Liganden, zu denen Geruchs- und Geschmacksstoffe, Aminosäuren, Peptidhormone, Neuropeptide, Nukleotide sowie Lipidverbindungen und Ionen zählen (Dohlman et al., 1991; Elling et al., 1999). Die Mehrheit

der Liganden binden an extrazelluläre Domänen des Rezeptors. Im Fall des Rhodopsins fungiert der Chromophor 11-*cis*-Retinal als Ligand. Dieser ist als prosthetische Gruppe kovalent mit dem Rezeptor verbunden und fixiert sehr effizient den inaktiven Zustand von Rhodopsin. Durch eine lichtinduzierte Isomerisierung des Chromophors in die *all-trans* Konformation wird der Rezeptor aktiviert. Dabei fungiert das Retinal nicht nur als Lichtsensor, sondern auch als klassischer Agonist bei der Aufrechterhaltung der aktiven Rezeptorkonformation, was die funktionale Einordnung von Rhodopsin in die große Familie der GPCRs verdeutlicht.

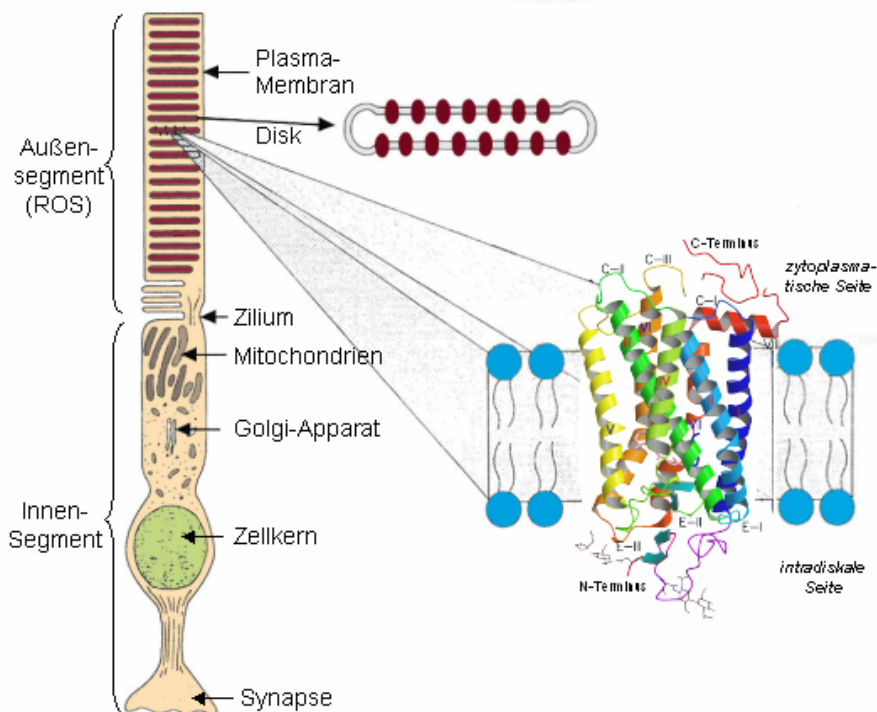
Nicht zuletzt ist die detaillierte Erforschung des Rhodopsins von großem Interesse, da es ein Modell eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors darstellt. Der primäre Sehvorgang in den Sehzellen der Netzhaut wird seit der Entdeckung des Sehpigments („Sehpurpur“) vor 120 Jahren (Kühne, 1878) intensiv erforscht. Strukturelle und funktionelle Analogien in der großen Familie der GPCRs geben Grund zur Annahme, dass sich am Rhodopsin gewonnene Erkenntnisse auch auf andere GPCRs übertragen lassen.



## 1.2. Die visuelle Kaskade der Stäbchenzelle

In der Netzhaut von Wirbeltieren gibt es zwei Arten von spezialisierten Photorezeptorzellen, die nach dem Erscheinungsbild ihres Außensegmentes benannt wurden. Die Zapfenzellen vermitteln das Farbsehen (photopisches Sehen) und befinden sich innerhalb der Retina im Bereich des schärfsten Sehens (beim Menschen: *Fovea centralis*). Die etwa 300-mal sensitiveren Stäbchen sind für das Dämmerungssehen (skotopisches Sehen) verantwortlich und finden sich vor allem außerhalb der *Fovea*. In der humanen Retina gibt es ca. 3-5 Mio. Zapfen gegenüber 100 Mio. Stäbchen (zur Übersicht siehe Muller und Kaupp, 1998; Rodieck, 1998).

In Abb. 1 ist ein Modell einer Stäbchenzelle abgebildet.



**Abb. 1: Schematische Darstellung einer Stäbchenzelle**

Das Außensegment der Stäbchenzelle enthält stapelförmig angeordnete Disk-Membranen in deren Lipid-Doppelschicht das Rhodopsin, der Rezeptor der visuellen Kaskade, lokalisiert ist. Der heptahelikale Rezeptor durchspannt die Membran, wobei die N-terminale Region zur intradiskalen Seite und die C-terminale zur cytoplasmatischen Oberfläche exponiert ist (aus Hargrave et al., 1993, leicht verändert).

Die Photorezeptorzellen der Retina sind aus einem Außensegment (ROS, „rod outer segment“), einem Innensegment und einer synaptischen Region aufgebaut. Die Synapse stellt die Verbindung mit den nachgeschalteten Neuronen dar. Die Zellorganellen (Mitochondrien, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum) und der Zellkern sind im Innensegment lokalisiert. Letzteres ist mittels Zilium mit dem Außensegment verbunden, in welchem sich die Elemente der Signalkaskade befinden. In der Stäbchenzelle werden am Zilium durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran sogenannte Disks gebildet und im Außensegment dicht gestapelt. In der humanen Stäbchenzelle befinden sich bis

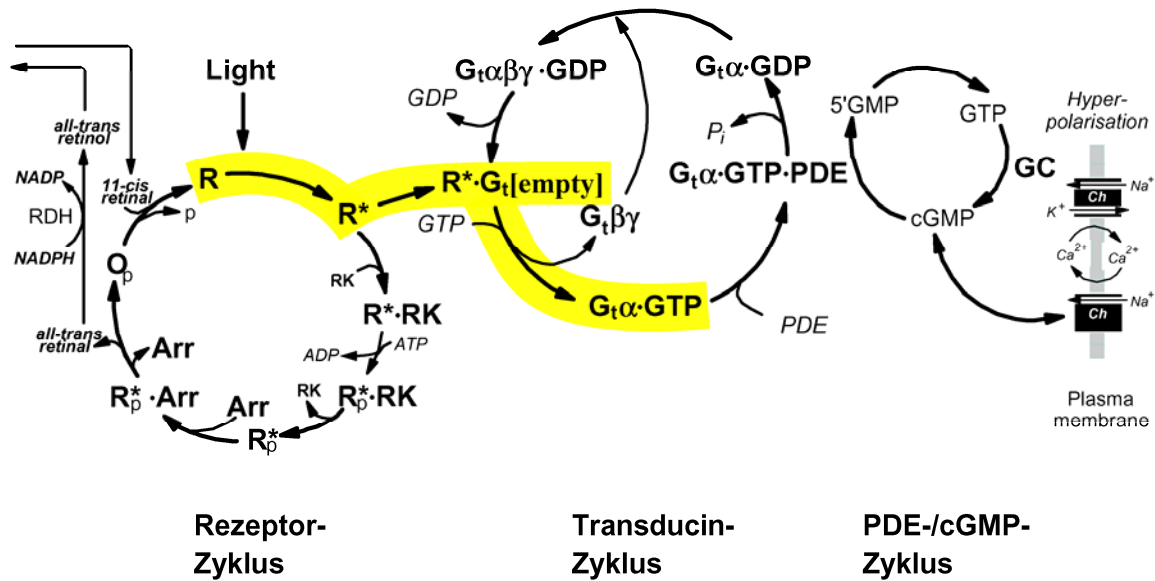
zu 1000 solcher Disks, die etwa die Hälfte des ROS-Volumens einnehmen. Jede Disk enthält ca. 50000 Rhodopsinmoleküle, ist etwa 100 Å hoch und der Abstand zwischen den Diskmembranen beträgt etwa 20 Å. Zwischen den Disks und der Zellmembran befindet sich ein Abstand von 15 Å (Hubbell et al., 2003).

Stäbchenzellen sind in der Lage, einzelne Photonen zu detektieren. Hierin wird die enorme Leistungsfähigkeit des visuellen Systems deutlich. Einerseits muss dazu das auf die Netzhaut und die Stäbchen einfallende Licht mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Signal auslösen, was durch die hohe Rezeptordichte gewährleistet wird. Andererseits darf die Aktivierung eines Rhodopsinmoleküls durch ein einzelnes Photon nicht von unspezifischen Rezeptoraktivitäten überlagert sein, was eine geringe Dunkelaktivität (Basalaktivität) voraussetzt (näheres zur Realisierung dieser Effizienz unter 1.3.2). Das Signal von den Photorezeptorzellen wird zum Teil durch Horizontalzellen verschaltet. Des Weiteren werden Bipolarzellen durch die Photorezeptorzellen angeregt. Von den Bipolarzellen werden wiederum die Amakrinen Zellen innerviert, welche, ähnlich wie vorher die Horizontalzellen für eine laterale und vertikale Verschaltung des neuronalen Netzwerkes. Den Bipolar- und Amakrinen Zellen sind die Ganglienzellen nachgeschaltet, die den Lichtreiz über den Sehnerv (*Nervus opticus*) zu den visuellen Zentren des Gehirns weiterleiten. (Schiller, 1992; Smith et al., 1986).

Als visuelle Kaskade der Stäbchenzelle werden die durch Licht induzierten biochemischen Reaktionen in der Stäbchenzelle bezeichnet, beginnend mit der Absorption von Licht, der Umwandlung und Weiterleitung dieser Information bis hin zum elektrischen Impuls der Zelle (siehe Übersichtsartikel: Hargrave und McDowell, 1992; Hofmann und Ernst, 2001; Muller und Kaupp, 1998).

Die visuelle Kaskade ist schematisch in Abb. 2 dargestellt. Rhodopsin besteht aus einem Apoprotein Opsin und einer prosthetischen Gruppe, dem Chromophor 11-*cis*-Retinal. Nach Absorption eines Photons isomerisiert das Retinal in die all-*trans*-Konformation, gefolgt vom Übergang des Rhodopsins (R) zu einer aktiven Rezeptorkonformation (R\*). Dieser initiale Schritt der visuellen Kaskade wird im Abschnitt 1.3.3 detaillierter behandelt.

Das retinale G-Protein Transducin (Gt) besteht aus einer  $\alpha$ ,  $\beta$  und einer  $\gamma$ -Untereinheit, wobei die  $G\alpha$ -Untereinheit eine Nukleotidbindungstasche besitzt, in welcher im inaktiven Zustand GDP gebunden ist ( $G\alpha\beta\gamma\cdot\text{GDP}$ ). Lichtaktiviertes Rhodopsin katalysiert den Austausch des von der  $G\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP gegen GTP. Studien, bei welchen die Stabilisierung von Metarhodopsin-II (Meta-II) durch Bindung von Transducin („Extra Meta-II“ Effekt) in Abhängigkeit von GDP untersucht wurde, zeigten, dass der durch Meta-II katalysierte Nukleotidaustausch in der  $G\alpha$ -Untereinheit über einen stabilen Zwischenzustand mit leerer Nukleotidbindungstasche („empty site“,  $G\alpha[\text{empty}]$ ) erfolgt (Hofmann, 1985; Kahlert et al., 1990; Panico et al., 1990).



**Abb. 2: Signaltransduktion der visuellen Kaskade**  
 (aus Hofmann & Heck 1996, der in dieser Arbeit untersuchte Teil der Kaskade ist gelb hinterlegt)

Die Aufnahme von GTP bewirkt die Dissoziation des Transducin-Rhodopsin-Komplexes, sowie die Trennung der  $G_t\alpha$ - und  $G_t\beta\gamma$ -Untereinheiten (Heck und Hofmann, 2001). Die durch die Aufnahme von GTP aktivierte  $G_t\alpha$ -Untereinheit bindet an das Effektormolekül, eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase (PDE).

Die PDE besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, sowie zwei inhibitorischen Untereinheiten. Durch die Bindung von zwei  $G_t\alpha\cdot GTP$  an die katalytischen PDE-Untereinheiten ( $G_t\alpha\cdot GTP\cdot PDE$ ) werden die inhibitorischen Untereinheiten von deren Bindungsstellen verdrängt. Die so aktivierte PDE katalysiert die Hydrolyse von cGMP (sekundärer Botenstoff) zu Guanosin-5'-monophosphat (5'GMP) (Pugh und Lamb, 1993). Die Abnahme der cGMP-Konzentration im Cytosol bewirkt die Schließung von Natrium- ( $Na^+$ ) und Kalzium- ( $Ca^{2+}$ ) spezifischen Kationenkanälen des Außensegments. Durch die Unterbrechung des im Dunkeln ständig stattfindenden Einstroms von Natrium- und Kalzium-Ionen bei fortlaufender Kalzium-Extrusion über die  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher sinkt die elektrische Potenzialdifferenz über der Membran von -40 mV bis auf -70 mV ab. Diese Zellhyperpolarisierung wird passiv über das Innensegment zur Synapse weitergeleitet und führt zur Reduzierung der Glutamat-Ausschüttung in den synaptischen Spalt zur Bipolarzelle. In dieser Änderung der Transmitterkonzentration besteht das Lichtsignal, welches von nachgeschalteten Neuronen der Retina und im visuellen Zentrum des Gehirns verarbeitet wird (Rodieck, 1998).

Um die Signalübertragung der Stäbchenzelle zuverlässig zu beenden und erneute Anregung zu erlauben, muss jeder einzelne der in Abb. 2 gezeigten Zyklen auch wieder abgeschaltet werden. Die Inaktivierung des Rhodopsins erfolgt in mehreren Stufen. Dabei bindet zunächst die Rhodopsin-Kinase (RK) an das Rhodopsin (Wilden et al., 1986) und kompetiert somit gegen die Kopplung mit Gt. Die RK phosphoryliert Serin- und Threoninreste im C-terminalen Bereich des Rhodopsins,

wodurch die nachfolgende hochaffine Bindung des Proteins Arrestin (Arr) ermöglicht wird. Rinderrhodopsin enthält sieben potentielle Phosphorylierungsstellen, *in vivo* werden allerdings wahrscheinlich nur Ser338 und Ser343 phosphoryliert (Ohguro et al., 1993). Dabei sinkt die Affinität des Transducins zu R\* mit steigendem Phosphorylierungsgrad (Gibson et al., 2000). Die endgültige Abschaltung des Rezeptors erfolgt durch die Bindung von Arrestin (Arr) und der Ausbildung eines Rp\*•Arr Komplexes, der im nachfolgenden Schritt zu freiem all-*trans*-Retinal, Arrestin und dem Apoprotein Opsin (Op), das keinen Chromophor mehr gebunden hat, zerfällt.

Die Halbwertszeit des Zerfalls von R\* zu Opsin und all-*trans*-Retinal beträgt etwa 8 min (pH 6,5, 20 °C, Heck et al., 2003). All-*trans*-Retinal wird mittels all-*trans* Retinal-Dehydrogenase (RDH) zu all-*trans*-Retinol reduziert (Palczewski et al., 1994). Das entstandene Retinol wird mit Hilfe eines Retinoid-bindenden Proteins (*interphotoreceptor retinoid-binding protein* = IRBP) in das retinale Pigmentepithel transportiert, wo es wieder in 11-*cis*-Retinal umgewandelt wird (Palczewski et al., 1999).

Das phosphorylierte Opsin wird mit einer Proteinphosphatase 2A wieder dephosphoryliert (Palczewski et al., 1989).

Die Abschaltung des Transducins (wie aller G-Proteine) erfolgt durch die intrinsische GTPase Aktivität der G $\alpha$ -Untereinheit, bei der das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird. Die Hydrolyse wird durch RGS9 (*regulator of G-protein signaling*) gefördert, welches als Photorezeptor-spezifisches GTPase beschleunigendes Protein (GAP) identifiziert wurde (He et al., 1998). Nach der GTP-Hydrolyse dissoziiert G $\alpha$ •GDP von den katalytischen Untereinheiten der PDE und die inhibitorischen PDE-Untereinheiten binden wieder. Die G $\alpha$ •GDP-Untereinheit bindet an G $\beta\gamma$  und steht dem Transduktionszyklus erneut zur Verfügung.

Durch die Abschaltung der PDE-Aktivität wird die cGMP-Hydrolyse unterbrochen. Die Regenerierung des cGMP-Spiegels erfolgt mittels Phosphorylierung durch Guanylatkinase (GK, Phosphorylierung von cGMP zu GDP) und Nukleosiddiphosphatase (NDK, GDP zu GTP) und schließlich durch die Aktivität der Guanylatzyklase (GC, *guanylate cyclase*). Die Erhöhung der cGMP-Konzentration bewirkt schließlich die Öffnung der cGMP-regulierten Ionenkanäle des Außensegmentes, und die für den Dunkelzustand typische Zelldepolarisation wird wieder hergestellt (Molday und Kaupp, 2000).

### 1.3. Struktur und Photoaktivierung des Rhodopsins

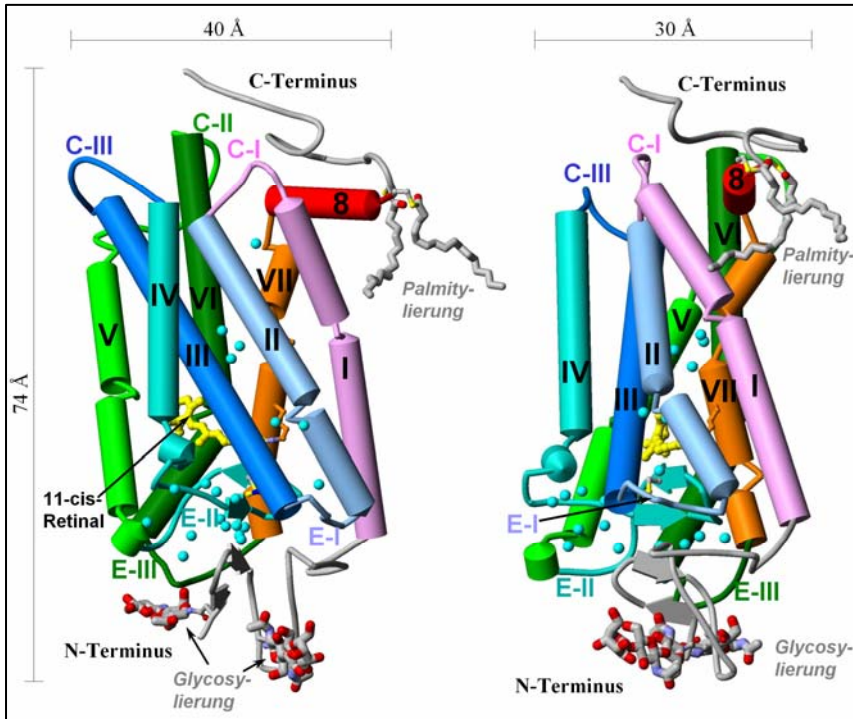
Rhodopsin, ein etwa 40 kDa großes, integrales Membranprotein, ist der GPCR in der visuellen Kaskade. Der Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins resultiert aus seinen strukturellen Eigenschaften. Dieser Zusammenhang steht im Fokus dieser Dissertation und soll in diesem Absatz detailliert beschrieben werden.

#### 1.3.1. Struktur des Rhodopsins

Im Jahr 2000 wurde die erste hochaufgelöste Kristallstruktur von Rinderrhodopsin (2,8 Å) publiziert (Palczewski et al., 2000, PDB-Eintrag: #1F88). Die Struktur wurde mehrfach bestätigt und präzisiert (Edwards et al., 2004, #1GZM; Okada et al., 2002, #1L9H; Teller et al., 2001, #1HZX). Bis heute ist Rhodopsin allerdings der einzige GPCR, von dem eine hochaufgelöste Kristallstruktur existiert. In der momentan am höchsten aufgelösten (2,2 Å) Kristallstruktur des inaktiven Grundzustandes von Rinderrhodopsin (Okada et al., 2004, #1U19) (siehe Abb. 3) konnten alle Aminosäurereste des Proteins modelliert und die Struktur des in der Bindungstasche eingespannten Retinals genauer bestimmt werden. Zudem enthält das Modell diverse Wassermoleküle innerhalb des Rhodopsinmoleküls, die für die Funktion des Rezeptors von Bedeutung sein könnten.

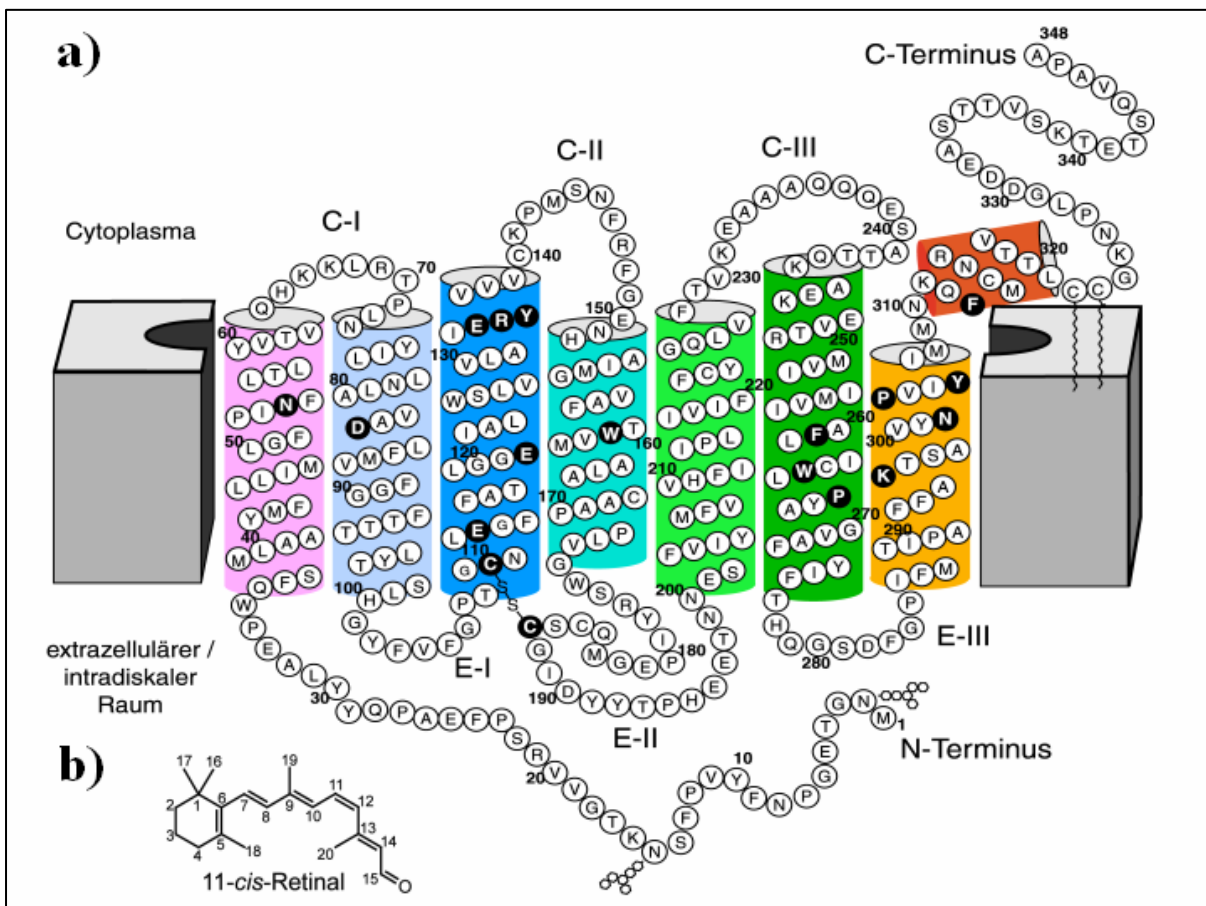
Wie alle GPCRs ist auch Rhodopsin ein Membranprotein. Das Apoprotein Opsin besteht aus 348 Aminosäuren (Sekundärstruktur in Abb. 4). Sieben  $\alpha$ -helikale Transmembranhelices (Helix-I bis VII) durchspannen die hydrophobe Lipid-Doppelschicht der Zellmembran und sind auf der intra- und extrazellulären Seite durch Peptidschleifen (engl. *loops*) verknüpft.

Rhodopsin besteht aus dem Apoprotein Opsin und einer prosthetischen Gruppe, dem Chromophor 11-*cis*-Retinal. Im Unterschied zu anderen GPCRs ist der Ligand des Rhodopsins, der Chromophor 11-*cis* Retinal, kovalent über eine Schiffbase an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lys296 (Helix VII) des Apoproteins Opsin gebunden. Dieser Chromophor fungiert als inverser Agonist, d.h. er fixiert den Rezeptor in einer inaktiven Konformation und reduziert somit die Basalaktivität. Im dunkeladaptierten Zustand liegt die Schiffbase protoniert vor. Deren positive Ladung wird durch eine Salzbrücke zur negativen Seitenkette von Glu113 (Helix III), dem sogenannten Gegenion, stabilisiert (Sakmar et al., 1989; Zhukovsky et al., 1991; Zhukovsky et al., 1992). Diese ionische Wechselwirkung bewirkt einen weiteren Beitrag zur konformativen Fixierung des Rhodopsins in der inaktiven Form (Cohen et al., 1992).



**Abb. 3: Kristallstruktur von Rhodopsin (2,2 Å)**

Schematische Darstellung von Rhodopsin (rechts um 90° gedreht):  $\alpha$ -helikale Strukturen sind als Zylinder dargestellt,  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen als Pfeile. Die sieben Transmembran-Helices sind nummeriert (I bis VII), die achte Helix (8) ist parallel zur Membran angeordnet. Cytoplasmatische Domänen wurden mit C-I bis C-III bezeichnet, extrazelluläre mit E-I bis E-III. Weiterhin sind Retinal, Palmitylierung und Glykosylierung hervorgehoben. Die Positionen von Wassermolekülen sind als türkisfarbene Kugeln gezeigt. (Struktur: PDB-Eintrag #1U19)



**Abb. 4: Modell der Sekundärstruktur des Rinderrhodopsins**

Zweidimensionales Modell der Sekundärstruktur von bovinem Rhodopsin (a). Wichtige Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt. Der Chromophor 11-cis-Retinal (b) ist an Lys296 in Helix-VII mittels einer protonierten Schiffbase gebunden. Details zur Struktur sind im Text beschrieben. Die farbliche Darstellung der Helices entspricht Abb. 3.

In Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass das Entfernen der positiven Ladung am Lys296 oder aber der negativen Ladung am Glu113 (Austausch zu Gln) eine konstitutive – also lichtunabhängige – Aktivität des Rezeptors in Abwesenheit des Chromophors bewirkt (Sakmar et al., 1989).

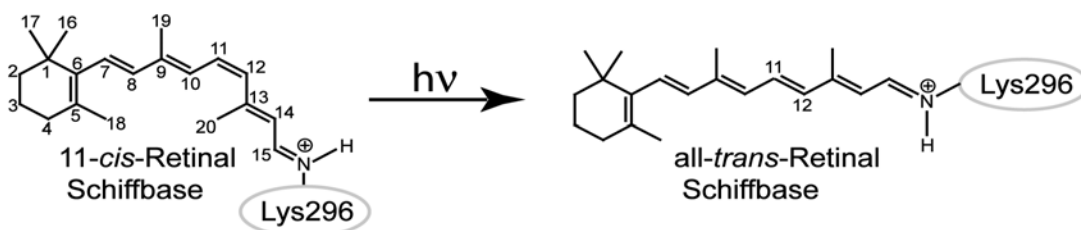
Wie andere Transmembranrezeptoren auch wird Rhodopsin posttranslational modifiziert. Die C-terminal gelegenen Aminosäurereste Cys322 und Cys323 werden dabei palmitoyliert, wodurch dieser Bereich noch einmal in der Membran verankert wird und einen vierten cytoplasmatischen *Loop* bildet. Überraschenderweise wurde in den Kristallstrukturen gefunden, dass dieser *Loop*-Bereich eine  $\alpha$ -helikale Struktur und somit eine parallel zur Membran liegende achte Helix ausbildet. Nahe des N-Terminus sind die Aminosäurereste Asn2 und Asn15 glykosyliert. Näheres zur Funktion der Glykosylierung ist unter 3.9 ausgeführt. Zwischen den Sulfhydrylgruppen des Cys110 und Cys187 ist eine Disulfidbrücke ausgebildet. Diese Disulfidbrücke ist in GPCRs hochkonserviert. Sie fixiert den zweiten extrazellulären *Loop*, der tief in das Proteininnere hineinragt und die Retinalbindungstasche zur extrazellulären Seite hin verschließt. Er wird durch die Ausbildung von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen stabilisiert (pfeilartige Bänder in Abb. 3). In diesem Loop befinden sich Glu181 und Ser186, die Teil eines Wasserstoff-Brücken-Netzwerks (mit Glu113 sowie zwei Wassermolekülen) sind, welches die Schiffbase-Bindung des Retinals während der Rezeptoraktivierung stabilisiert (Ludeke et al., 2005; Yan et al., 2003).

Ein Vergleich von Aminosäuresequenzen von GPCRs wurde von Probst *et al.* (1992) sowie von Mirzadegan *et al.* (2003) veröffentlicht. In den meisten GPCRs ist am cytoplasmatischen Ende der dritten Helix ein D(E)RY-Motiv (siehe Absatz 1.3.4) lokalisiert und am cytoplasmatischen Ende der siebten Helix ein NPxxY-Motiv. Die hohe Konservierung dieser Motive legt nahe, dass sie von herausragender Bedeutung für die Funktionalität der GPCRs sind.

### 1.3.2. 11-*cis*-Retinal – der Chromophor des Rhodopsins

Der Ligand des Rhodopsins ist der Chromophor 11-*cis*-Retinal, ein Vitamin A Derivat. Es ist ein Aldehyd bestehend aus einem  $\beta$ -Ionon-Ring und einer Polyenkette. Das mehrfach konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem des Retinals bildet einen effizienten Lichtabsorber.

Durch die Wechselwirkung mit dem Protein wird die Absorption vom ultravioletten in den grünen Bereich des sichtbaren Spektrums verschoben. Der Chromophor ist durch eine Schiffbase-Bindung kovalent an Opsin gebunden, wobei das Stickstoffatom der Schiffbase im unbelichteten Grundzustand protoniert vorliegt. Diese Protonierung beeinflusst das  $\pi$ -Elektronensystem des Retinals und bewirkt eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um ca. 60 nm (380 nm  $\rightarrow$  440 nm). Eine zusätzliche Verschiebung zu größeren Wellenlängen (500 nm) erfolgt durch Wechselwirkungen in der Chromophorbindungs tasche zwischen Aminosäureseitenketten und dem Retinal (Kochendoerfer et al., 1999). Dieser *opsin-shift* wird zur spektroskopischen Differenzierung der Photoprodukte bei der Rhodopsinaktivierung genutzt.



**Abb. 5: Lichtinduzierte Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zu all-*trans*-Retinal**

Die Absorption eines Photons induziert eine *cis-trans* Isomerisierung der  $\pi$ -Bindung zwischen den Kohlenstoffatomen C11 und C12. Das Retinal ist mittels Schiffbase Bindung kovalent an die Aminosäureseitenkette von Lys296 gebunden. Die Schiffbase Bindung liegt in einer *anti*-Konformation vor.

### 1.3.3. Photoaktivierung des Rhodopsins

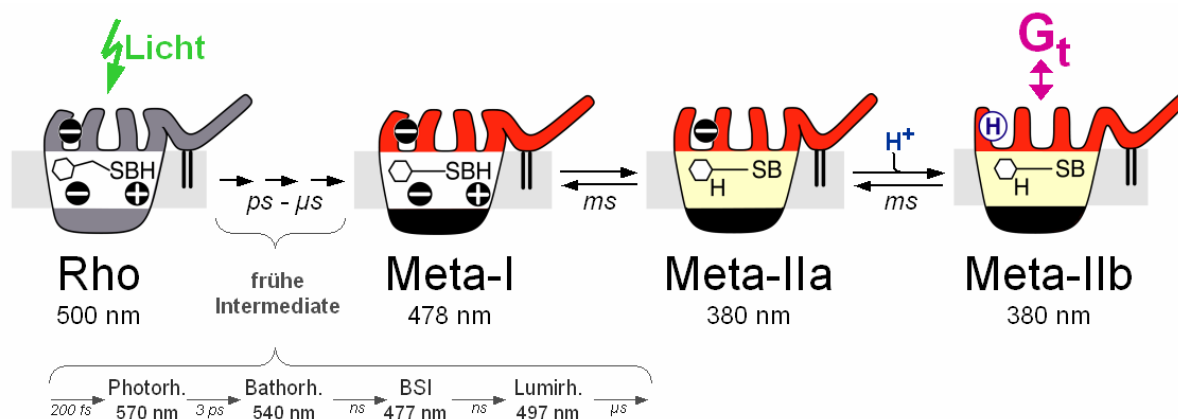
Trotz intensiver Forschungsbemühungen sind noch nicht alle Details der Photoaktivierung von Rhodopsin, insbesondere der Bildung der aktiven Rezeptorkonformation, geklärt. Im Folgenden soll ein Überblick über den momentanen Stand der Kenntnisse gegeben werden. Bezüglich tiefergehender Diskussionen zu diesem Thema sei auf einige Übersichtsartikel (Ernst et al., 2003; Helmreich und Hofmann, 1996; Hofmann, 1999; Hofmann, 2000; Okada et al., 2001; Sakmar, 1998) verwiesen.

Im dunkel-adaptierten, inaktiven Zustand hat Rhodopsin ein Absorptionsmaximum von 500 nm. Durch die Absorption eines Photons erfolgt eine Photoisomerisierung (ca. 200 fs) des Chromophors, bei welcher der inverse Agonist, 11-*cis*-Retinal, photochemisch in den Agonisten all-*trans*-Retinal überführt wird (Bownds, 1967; Wald, 1968). Zwei Drittel der absorbierten Photonenenergie werden dabei in Form von Retinal-Opsin-Wechselwirkung gespeichert. Dieser angeregte Zustand des Rhodopsins (Photorhodopsin) relaxiert in den nachfolgenden Millisekunden über mehrere Stufen bis hin zum sogenannte Metarhodopsin II (Meta-II), das die aktive Rhodopsin-Konformation darstellt und



in der Lage ist, den Nukleotidaustausch im G-Protein Transducin (G<sub>t</sub>) zu katalysieren. Durch die neue Retinalkonfiguration werden Aminosäureseitenketten der Retinalbindungstaschen und somit auch der Transmembrandomäne gezwungen, sich entsprechend neu auszurichten. Die Retinalisomerisierung kann als ein „sterischer *Trigger*“ betrachtet werden, durch den konformative Änderungen in der Transmembrandomäne ausgelöst werden.

Während des Relaxationsprozesses werden spektroskopisch unterscheidbare Photointermediate durchlaufen (Abb. 6), die durch diskrete Absorptionsmaxima und Proteinkonformationen gekennzeichnet sind.



**Abb. 6: Modell zur Aktivierung von Rhodopsin durch Lichtabsorption**

Die Absorption eines Photons (links) führt zur Isomerisierung des Retinals (schematisch gezeigt), worauf eine Reihe von spektroskopisch definierten Intermediaten durchlaufen wird. Die frühen Intermediate Photorhodopsin, Bathorhodopsin, BSI (engl.: *blue shifted intermediate*) und Lumirhodopsin (nach Menon et al., 2001) sind in grau gezeigt. Im Metarhodopsin-I (Meta-I) liegt noch immer eine protonierte Schiffbase (zwischen Retinal und Lys296) vor, welche durch das negativ geladene Gegenion Glu113 stabilisiert wird. Erst nach einem Protonentransfer entsteht Metarhodopsin-IIa (Meta-IIa) und nach Aufnahme eines weiteren Protons an der cytoplasmatischen Oberfläche wird die aktive, mit dem G-Protein Transducin (G<sub>t</sub>) interagierende Meta-IIb Konformation gebildet. Meta-I, Meta-IIa und Meta-IIb stehen in einem Gleichgewicht (siehe Text). Unter den Intermediaten sind die Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich angegeben, unterhalb der Reaktionspfeile ist die Reaktionszeit gegeben.

Die Konformationen der frühen Photointermediate werden innerhalb von µs durchlaufen. Danach stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den langlebigen Photoprodukten Metarhodopsin-I (Meta-I) und Metarhodopsin-II (Meta-II) ein. Dieses Meta-I/Meta-II Gleichgewicht kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, was für die biophysikalische Untersuchung dieser Photoprodukte von Bedeutung ist. Es ist abhängig von:

- Temperatur und pH-Wert (Emeis und Hofmann, 1981; Parkes und Liebman, 1984),
- Ionenstärke (Vogel et al., 2001),
- hydrophobe Umgebung, (Lipid-Doppelschicht oder Detergenzmizellen) (Arnis und Hofmann, 1993; Gibson und Brown, 1993; Hessel et al., 2001)

In Meta-I liegt das Gegenion Glu113 noch unprotoniert und die Schiffbase protoniert vor. Der Übergang zu Meta-II ist durch eine Deprotonierung der Schiffbase und Protonierung des Gegenions Glu113 gekennzeichnet, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 478 nm (Meta-I) nach 380 nm (Meta-II) verschiebt (Emeis et al., 1982; Jäger et al., 1994; Longstaff et al., 1986). In Detergens konnte die Existenz zweier isospektraler Meta-II-Formen nachgewiesen werden, die als Meta-IIa und

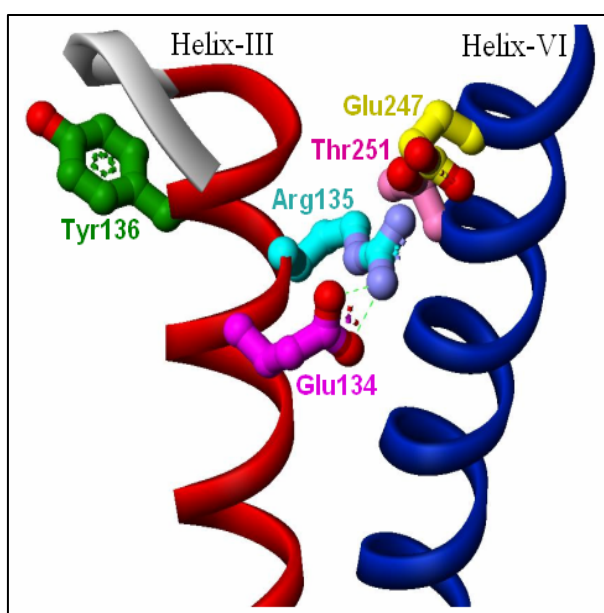
Meta-IIb bezeichnet werden (Arnis und Hofmann, 1993). Die Bildung des mit dem G-Protein interagierenden Meta-IIb ist dabei an die Aufnahme eines Protons aus der wässrigen Umgebung gekoppelt. Wahrscheinlich wird dabei das am cytoplasmatischen Ende der Helix-III lokalisierte Glu134 protoniert, welches Bestandteil des D(E)RY-Motivs ist (Arnis et al., 1994; Fahmy et al., 1993). Die Änderung ionischer Wechselwirkungen in dieser Region bewirkt möglicherweise eine Entkopplung der Helices III und VI (siehe 1.3.4). Verschiedene Veröffentlichungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung der aktiven, signalgebenden Konformation und Bewegungen der Transmembranelices hin (siehe Hofmann, 2000). Anhand von EPR-Messungen (engl. „*electron paramagnetic resonance*“) an Rhodopsin-Mutanten, die Spin-Sonden an Cystein-Seitenketten trugen, konnte eine lichtinduzierte Bewegung der Helix-III und der Helix-VI nachgewiesen werden (Altenbach et al., 1996; Farahbakhsh et al., 1995; Farrens et al., 1996; Kim et al., 2004). Insbesondere konnte dabei eine signifikante Bewegung des cytoplasmatischen Teils der Helix-VI aus dem Helixbündel heraus in Richtung Lipid-Doppelschicht beobachtet werden. Diese Umordnung der cytoplasmatischen Oberfläche des Rezeptors könnte zur Ausbildung von Bindungsstellen für das G-Protein führen. Im Zusammenhang mit dieser Helixbewegung zeigten Mutagenesestudien, dass die Punktmutationen E113Q, G90D oder A292E, die einen Bruch bzw. Störung der Salzbrücke zwischen Lys296 und dem Gegenion Glu113 bewirken, zu konstitutiver Aktivität des Apoproteins Opsin führen (Cohen et al., 1992; Rao und Oprian, 1996; Robinson et al., 1992). Eine neuere Arbeit von Kim *et al.* (2004) beschreibt anhand von EPR-Messungen, dass der erwähnte Bruch der Salzbrücke mit konformativen Änderungen, insbesondere einer Bewegung der Helix-VI einhergeht. Sie postulierten, dass ein Bruch der Salzbrücke eher "Auslöser" als die "Konsequenz" der Helix-VI Bewegung und somit der Aktivierung ist. Auch eine M257Y-Mutation bewirkt ohne die Salzbrücke zu beeinflussen konstitutive Opsin-Aktivität und die Doppelmutanten E113Q/M257Y, E113Q/M257N, and E113Q/M257A waren sogar mit 11-*cis*-Retinal funktionell aktiv, ohne dass es dafür einer Chromophorisomerisierung bedurfte. Nach Kim *et al.* müssen somit zwei Ereignisse bei der Rezeptoraktivierung stattfinden: 1.) Bruch der Salzbrücke zwischen protonierter Schiffbase und Gegenion sowie 2.) Ermöglichung der Helix-VI Bewegung. Letzteres wurde von ihnen durch eine Störung der Interaktion der Helix-VI mit den umliegenden Helices-II, III und VII durch die M257Y-Mutation erzwungen.

In Meta-II liegt das Retinal in einer all-*trans*-15-*anti* Konformation vor. Durch eine thermische Isomerisierung der Schiffbase Bindung (C=N) kann die Konformation zu all-*trans*-15-*syn* wechseln. Die daraufhin veränderte Proteinkonformation ist dem Meta-I ähnlich und wird Meta-III genannt ( $\lambda_{\max} = 470$  nm). Das Meta-III Photoprodukt wurde umfangreich von Vogel *et al.* (2004) und Ritter *et al.* (2004) charakterisiert. Dabei wurde Meta-III als "Retinal-Speicherform" von Rhodopsin bei starkem Lichteinfall beschrieben, da dieses Photoprodukt dem Regenerationszyklus der visuellen Kaskade entzogen ist und somit nicht mehr für die Signaltransduktion bereitsteht (Abb. 2). Eine

Rückbildung zu den Meta-I/Meta-II Intermediaten kann nur nach Absorption eines weiteren Photons oder durch Bindung von Transduzin erfolgen (siehe Zimmermann et al., 2004).

#### 1.3.4. Die Bedeutung des hochkonservierten D(E)RY-Motivs

Das Tripeptid Glu134-Arg135-Tyr136 ist Teil des bei GPCRs hochkonservierten D(E)RY-Motivs am cytoplasmatischen Ende der Helix-III (Abb. 7). Die beteiligten Aminosäurereste interagieren über Wasserstoffbrücken mit verschiedenen umliegenden Resten. Die Carboxylgruppe des Glu134 bildet eine Salzbrücke zur Guanidinium-Gruppe des nahe liegenden Arg135. Letzteres ist mit Glu247 und Thr251 in Helix-VI verbunden (Palczewski et al., 2000).



**Abb. 7: Dreidimensionales Modell der ERY-Region**  
 Dargestellt sind die hochkonservierten Aminosäurereste Glu134 (pink), Arg135 (türkis) und Tyr136 (grün) in Helix III sowie die benachbarten Reste Glu247 (gelb) und Thr251 (rosa) in Helix VI. Basis des dargestellten Modells ist die Kristallstruktur von Rhodopsin (1HZX, Teller et al., 2001).

Diese Region hat eine herausragende Stellung in der Rezeptor-Aktivierung. Die Aufnahme eines Protons und der Bruch der Salzbrücke zwischen Glu134 und Arg135 gehen mit konformativen Änderungen einher, die den Übergang zur aktiven G-Protein-bindenden Meta-IIb Konformation charakterisieren (Arnis und Hofmann, 1993; Fahmy et al., 2000; Hofmann, 2000).

Ein Austausch von Glu134 gegen Glutamin (E134Q-Mutation) bewirkt, dass die Protonenaufnahme in der cytoplasmatischen Domäne des Rhodopsins bereits vorweggenommen ist (Fahmy et al., 2000). Bei dem so veränderten Rhodopsin wird auch bei Anwesenheit eines schwachen (partiellen) Agonisten nach der Belichtung die aktive Meta-IIb Konformation (siehe Abschnitt 1.3.3) stark favorisiert (Meyer et al., 2000). Diese Tatsache kann als wichtiges Werkzeug bei Mutagenesestudien genutzt werden, bei denen der Einfluss einer Mutation auf das Meta-I/Meta-II Gleichgewicht untersucht werden soll. Durch eine zusätzliche E134Q-Mutation kann der Einfluss des partiellen Agonisten kompensiert werden.

## 1.4. Das G-Protein Transducin und seine Interaktion mit Rhodopsin

Im Fokus dieser Arbeit steht der Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins, aber auch die daraus resultierende katalytische Aktivität bezüglich des Nukleotidaustausches im G-Protein. Das G-Protein der visuellen Kaskade ist das Transducin, auf welches in diesem Abschnitt näher eingegangen werden soll. Für einen tiefergehenden Überblick zu G-Proteinen sei auf Veröffentlichungen verwiesen (Bourne, 1997; Hermans, 2003; Wess, 1997)

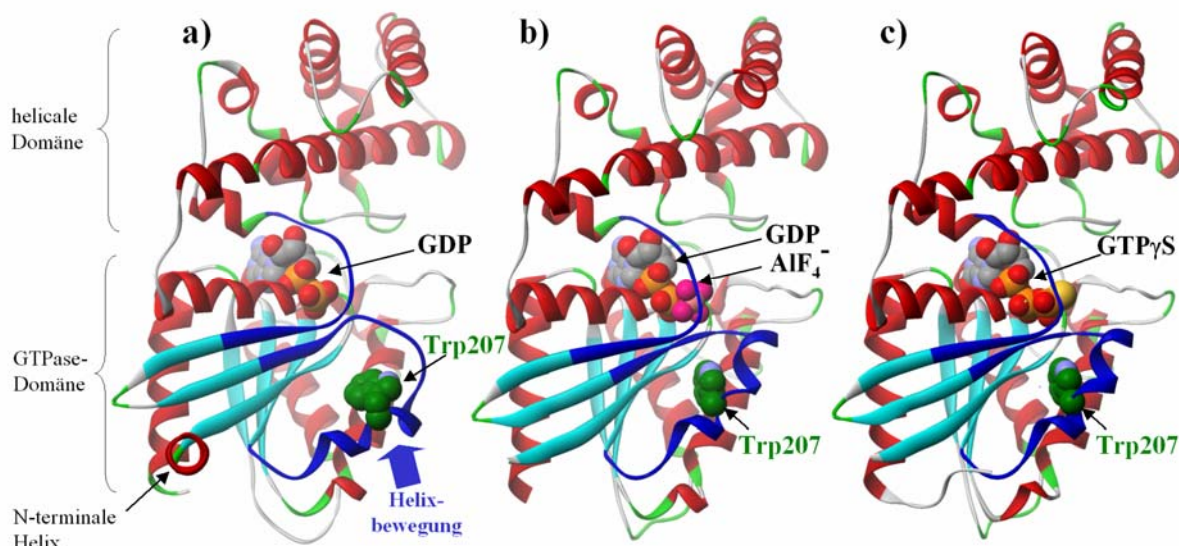
### 1.4.1. Transducin, ein heterotrimeres G-Protein

Transducin zählt zu den heterotrimeren Guanin-Nukleotid bindenden Proteinen (G-Proteinen), die aus einer GDP-bindenden  $G_{\alpha}$ , einer  $G_{\beta}$  und einer  $G_{\gamma}$ -Untereinheit bestehen.  $G_{\beta\gamma}$  bildet eine funktionelle Einheit und kann nur durch Denaturierung getrennt werden. Der durch die Bindung eines GPCR induzierte Nukleotidaustausch (GDP gegen GTP) in der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit bewirkt die Dissoziation des Heterotrimers in  $G_{\alpha}\cdot\text{GTP}$  und  $G_{\beta\gamma}$ , wobei sowohl  $G_{\alpha}\cdot\text{GTP}$  als auch  $G_{\beta\gamma}$  regulatorisch wirksam werden können (siehe Hermans, 2003). Es sind mehr als zwanzig  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten bekannt, die aufgrund struktureller und funktioneller Homologien in vier Unterklassen gegliedert werden:  $G_{s\alpha}$ ,  $G_{i/o\alpha}$  (Zugehörigkeit von  $G_{t\alpha}$ ),  $G_{q/11\alpha}$  und  $G_{12/13\alpha}$ . Zudem wurden fünf  $G_{\beta}$ -Untereinheiten ( $G_{\beta_1}$ - $G_{\beta_5}$ ) sowie 12  $G_{\gamma}$ -Untereinheiten ( $G_{\gamma_1}$ - $G_{\gamma_{12}}$ ) identifiziert (Hermans, 2003). Dabei weisen die  $G_{\beta}$ -Untereinheiten eine Homologie von 70-90 % auf, die  $G_{\gamma}$ -Untereinheiten sind heterogener. Im Gegensatz zu  $G_{\alpha}$  werden die verschiedenen Typen von  $G_{\beta}$  und  $G_{\gamma}$ -Untereinheiten im Organismus ubiquitär exprimiert. Die Rezeptorspezifität der heterotrimeren G-Proteine wird somit weitgehend durch die  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten determiniert.

### 1.4.2. Struktur von Transducin

Die Kristallstruktur von Transducin ( $G_{t\alpha}\beta_1\gamma_1$ , 2,0 Å, PDB-Eintrag: #1G0T) (Lambright et al., 1996) sowie des sehr ähnlichen heterotrimeren G-Proteins  $G_{t\alpha_1}\beta_1\gamma_2$  (2,3 Å, #1GP2) (Wall et al., 1995) sind bekannt. Zudem wurden die Kristallstrukturen der aktivierten  $G_{t\alpha}$ -Untereinheit mit gebundenem  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (Guanosin-5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphat) sowie mit Aluminiumfluorid ( $\text{AlF}_4^-$ ) gelöst. Die Kristallstruktur der  $G_{t\alpha}$ -Untereinheit ist in Abb. 8, die des Gt-Holoproteins in Abb. 9 dargestellt.

Wie andere G-Proteine auch wird Transducin posttranslational modifiziert. Die  $G_{t\alpha}$ -Untereinheit wird dabei am N-Terminus myristyliert und die  $\gamma_1$ -Untereinheit wird am C-terminalen Cys71 über eine Thioesterbindung farnesyliert (Wedegaertner et al., 1995).



**Abb. 8: Darstellung der GDP-gebundenen sowie der aktiven Form der G $\alpha$ -Untereinheit**

In der G $\alpha$ -Untereinheit ist im inaktiven Zustand das Nukleotid GDP gebunden (a). Bei Aufnahme von  $\text{AlF}_4^-$  (b) bzw. GTP $\gamma$ S (c) wird die G $\alpha$ -Untereinheit in der aktiven Konformation fixiert. GTP $\gamma$ S ist ein nicht-hydrolysierbares Analogon des GTP und zusätzlich zum GDP aufgenommenes  $\text{AlF}_4^-$  ersetzt die  $\gamma$ -Phosphat-Gruppe des GTP. Nach dem Nukleotidaustausch kommt es zu konformativen Änderungen in den "switch"-Bereichen (blau hervorgehoben, siehe Lambright *et al.* 1994). Dadurch wird die Position von Trp207 (grün) geändert, der damit einhergehende Fluoreszenzanstieg ist die Grundlage der fluorometrischen Messung der Gt-Aktivierung (siehe 3.4). (PDB-Einträge der dargestellten Strukturen sind von links nach rechts #1G0T, #1TAD und #1TND)

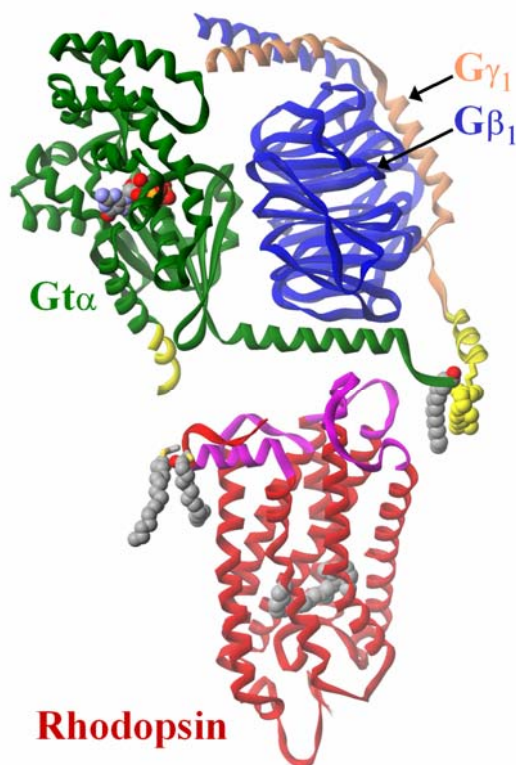
Die G $\alpha$ -Untereinheit (350 Aminosäuren) kann in zwei Domänen unterteilt werden. Die GTPase-Domäne stellt für die GTP-Hydrolyse katalytisch wirksame Aminosäureseitenketten bereit und besteht aus einem sechssträngigen, antiparallelen Faltblatt, das von sechs  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Die zweite Domäne, die helikale Domäne, besteht aus einer langen zentralen Helix, um welche fünf kürzere Helices angeordnet sind. Zwischen beiden Domänen wird die Nukleotidbindungstasche ausgebildet. Die N-terminale Region wird durch eine weitere Helix ("N-Helix") aus 25 Aminosäureresten gebildet. Bei Aufnahme von GTP bewirkt die zusätzliche Phosphatgruppe konformative Änderungen in den in Abb. 8 blau gekennzeichneten Bereichen (sogenannte "switch"-Bereiche: Reste 173-183 sowie 195-215). Diese Bereiche sowie die N-Helix bilden die Hauptkontaktstellen zu der im Heterotrimer benachbarten G $\beta$  Untereinheit aus. Durch diese konformativen Änderungen wird die Affinität zur G $\beta$  Untereinheit herabgesetzt und der G $\alpha\beta\gamma$ -Komplex zerfällt (Coleman *et al.*, 1994; Lambright *et al.*, 1994; Noel *et al.*, 1993; Sondek *et al.*, 1994).

Die aus 340 Aminosäuren bestehende G $\beta$ -Untereinheit ist auch aus zwei Domänen aufgebaut. Zum einen wird die N-terminale Region durch eine 20 Reste lange  $\alpha$ -Helix gebildet, zum anderen ist eine als  $\beta$ -Propeller bezeichnete Domäne zu finden, die sich aus sieben rotationssymmetrisch angeordneten  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zusammensetzt (Sondek *et al.*, 1996).

Die G $\gamma$ -Untereinheit des Transducins besteht aus 71 Aminosäuren, welche zwei  $\alpha$ -Helices bilden, die durch eine Peptidschleife verbunden sind. Die N-terminalen Helices von G $\beta$  und G $\gamma$  bilden interhelikale Kontakte aus, die zur Stabilität des Heterodimers beitragen.

### 1.4.3. Interaktion zwischen Transducin und Rhodopsin

Kristallstrukturen existieren für das Transducin-Holoprotein (siehe 1.4.2) sowie vom Grundzustand des Rhodopsins (s. 1.3.1). Doch Kristallstrukturen allein können die Dynamik der Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein nicht klären, zumal die Kristallstruktur des Gt wie auch des Rhodopsins Strukturen wiedergeben, die nicht den Konformationen entsprechen, in welchen die beiden Proteine miteinander interagieren. Ein umfangreicher Überblick zu möglichen Interaktionen der beiden Proteine wurde von Hamm *et al.* publiziert (2001).



**Abb. 9: Interaktionsstellen zwischen dem heterotrimeren G-Protein Transducin und seinem Rezeptor Rhodopsin**

Die G $\alpha$ -Untereinheit mit dem gebundenen Nukleotid GDP (Kalottenmodell) ist in grün gezeigt, G $\beta_1$  in blau und G $\gamma_1$  in orange (PDB-Eintrag: #1G0T). Darunter ist Rhodopsin in rot dargestellt (#1U19).

Verschiedene mögliche Interaktionsstellen des Gt werden diskutiert (siehe Text). Der C-terminale Bereich von G $\alpha$  sowie der farnesylierte C-terminale Bereich von G $\gamma_1$  stellen die Hauptinteraktionsstellen dar (Kisselev *et al.*, 1998; Kisselev und Downs, 2003) und sind in gelb hervorgehoben. Diese Bereiche sind in der Kristallstruktur nicht aufgelöst, sie wurden für die Darstellung entsprechend modelliert. Auch die Myristylierung am G $\alpha$ -N-Terminus sowie die Farnesylierung am G $\gamma_1$ -C-Terminus sind hier modelliert.

Der exponierte cytoplasmatische Bereich des Rhodopsins ist bei der Interaktion involviert (in pink hervorgehoben), inklusive der parallel zur Membran ausgerichteten Helix-8, die durch eine Verankerung des C-terminalen Bereichs (Palmitylierungen an Cys322 und Cys323) stabilisiert wird. Palmitylierungen und Retinal sind als Kalottenmodell gezeigt.

#### a) Bindungsstellen am Rhodopsin

Da Transducin mit der cytoplasmatischen Seite von lichtaktiviertem Rhodopsin interagiert, wurden mehrere Studien durchgeführt, die sich mit der Rolle der cytoplasmatischen Rhodopsin-Domäne bei der Interaktion mit Gt beschäftigten. So wurde von König *et al.* (1989) gefunden, dass synthetische Peptide, die den cytoplasmatischen *Loops* C-II, C-III und der Helix-8 entsprachen, gegen die Stabilisierung von Meta-II durch Gt kompetieren können. Daraus wurde geschlussfolgert, dass diese Regionen an der Transducinbindung durch lichtaktiviertes Rhodopsin beteiligt sind. Dieser Befund konnte bezüglich der *Loops* C-II, C-III anhand von Mutagenesestudien mehrfach bestätigt werden. Von Franke *et al.* (1992) wurden zahlreiche Mutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Transducin zu aktivieren, beschrieben, die die Schlüsselrolle dieser beiden *Loops* bestätigten. Zuvor wurden bereits zwei Mutanten gefunden, die zwar das G-Protein binden konnten, jedoch keine katalytische Aktivität bezüglich des Nukleotidaustausches aufwiesen (Franke *et al.*, 1990). Dies verdeutlichte, dass die



Aktivierung von Gt in zwei Schritte unterteilt werden muss: die Bindung und die Katalyse. Bei der Aktivierung von Transducin katalysiert lichtaktiviertes Rhodopsin den Austausch des von der Gt $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP gegen GTP. Anhand von Studien, bei welchen die Meta-II-Stabilisierung in Anwesenheit von Transducin („Extra Meta-II“ Effekt) untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass die Anwesenheit von GDP einen Zerfall des Komplexes aus Meta-II und Gt bewirkt (Hofmann, 1985; Kahlert et al., 1990; Panico et al., 1990). Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass der durch Meta-II katalysierte Nukleotidaustausch in der Gt $\alpha$ -Untereinheit über einen stabilen Rezeptorgebundenen Zwischenzustand mit leerer Nukleotidbindungstasche („empty site“) erfolgt (siehe Abb. 2). Die molekularen Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und Gt, die zur Öffnung der Nukleotidbindungstasche und zur Freisetzung des GDP führen, sind im Detail noch nicht bekannt, der gegenwertig diskutierte Interaktionsmechanismus wurde von Hermann *et al.* (2004) vorgeschlagen.

Es muss hervorgehoben werden, dass die für die Rhodopsinaktivierung bedeutsame D(E)RY-Region am cytoplasmatischen Ende der Helix-III auch für die Gt-Aktivierung wichtig ist. Ein Austausch von Glu134 und Arg135 bewirkte, dass Gt vom Rezeptor nicht mehr gebunden werden konnte (Ernst et al., 1995).

Auch der achten Helix wurde schon früh aufgrund von Kompetitionsstudien mit synthetischen Peptiden eine Rolle bei der Gt-Aktivierung zugewiesen (König et al., 1989; Phillips und Cerione, 1992). Durch Experimente, bei denen der C-terminale Bereich von Rhodopsin sukzessiv verkürzt wurde, stellte sich heraus, dass nur der N-terminale Teil der Helix (bis Cys316) von Bedeutung ist (Weiss et al., 1994). Dies wurde durch Mutagenesestudien bestätigt, bei denen Rhodopsin-Chimären mit Teilen des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors untersucht wurden (Ernst et al., 2000; Kim et al., 2005; Marin et al., 2000). Nur der Austausch von Aminosäuresequenzen im Bereich von Asn310 bis Arg314 bewirkte einen Verlust der katalytischen Aktivität. Außerdem wurde von Abdulaev *et al.* (1998) ein monoklonaler Antikörper mit einem Epitop charakterisiert, welches den Aminosäuren 304-311 von Rhodopsin entsprach. Es wurde eine selektive Bindung des Antikörpers an die lichtaktivierte Rhodopsin-Konformation, nicht jedoch an die Dunkel-Konformation beobachtet, was für eine starke, lichtinduzierte konformative Änderung in diesem Bereich der achten Helix spricht.

#### **b) Bindungsstellen am Transducin**

Es gibt Hinweise, dass alle Untereinheiten des Gt Kontakt zum Rhodopsin haben (Hamm, 1998). Dabei sind die C-terminalen Bereiche der Gt $\alpha$ - und Gt $\gamma_1$ -Untereinheit bisher am besten untersucht worden. Von Hamm *et al.* (1988) wurden zwei synthetische Peptide der C-terminalen Region der Gt $\alpha$ -Untereinheit (Gt $\alpha$ 340-350 und Gt $\alpha$ 311-328) identifiziert, die mit dem Gt-Holoprotein um Bindungsstellen an belichtetem Rhodopsin kompetieren. Außerdem stabilisierten die gefundenen Peptide sowie Varianten mit leichten Abwandlungen die aktive Rezeptorkonformation. Eine Mutagenesestudie, bei welcher systematisch Aminosäuren in diesem Bereich durch Alanin ersetzt wurden, bestätigten die Bedeutung der C-terminalen Region von Gt $\alpha$  (Garcia et al., 1995). Dabei

wurden mäßige (K341A) und starke Beeinträchtigungen (L344A, G348A und L349A) der Aktivierbarkeit von Gt beobachtet. In beiden Studien wurde eine besondere Rolle von Leu349 bei der Aktivierung von Gt durch lichtaktiviertes Rhodopsin hervorgehoben. Die wichtige Rolle dieser vier Aminosäurereste spiegelte sich auch in einer Studie von Martin *et al.* (1996) wieder, bei der durch systematischen Austausch von Aminosäuren hochaffine Peptidanaloga der C-terminalen Region Gt $\alpha$ (340-350) gesucht wurden. Dabei wurde ein Peptid gefunden, das eine um ca. 2 Größenordnungen höhere Affinität als die native Sequenz (siehe 3.7) aufwies, die Aminosäurereste L344, G348 und L349 blieben dabei unverändert.

Außerdem wurden bezüglich der C-terminalen Region Studien an chimären G $\alpha$ -Untereinheiten durchgeführt, die zeigten, dass die letzten 5 C-terminalen Aminosäurereste einen Beitrag zur Rezeptorspezifität des Gt-Holoproteins leisten (Hamm, 1998).

Mutagenesestudien und Arbeiten, die auf Kompetitionsstudien mit synthetischen Peptiden basieren, lieferten Hinweise auf weitere mögliche Regionen von Gt, die mit Rhodopsin interagieren. Es wurde vorgeschlagen, dass auch Teile der N-terminalen Helix (Position 8-23) sowie der Schleife, welche die beiden Gt $\alpha$ -Subdomänen verbindet (Position 310-324, nahe am C-Terminus) Bindungsstellen darstellen (Hamm, 2001).

An der G $\gamma$ -Untereinheit wurde von Kisselev *et al.* (1994) mit G $\gamma$ <sub>1</sub>(60-71) eine Peptidsequenz identifiziert, die sowohl die Meta-II Konformation stabilisierte als auch die Wechselwirkung zwischen Gt-Holoprotein und Rhodopsin kompetierte. Dafür musste das Peptid, wie auch das Holoprotein, am C-Terminus farnesyliert sein. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aminosäurereste Phe64 sowie Leu67 bei der Interaktion mit Rhodopsin von Bedeutung sind, da ein Austausch dieser Reste eine Verminderung der Meta-II Stabilisierung zur Folge hatte. Hervorzuheben ist auch, dass die gleichen Autoren (Kisselev *et al.*, 1995) zeigen konnten, dass die Lipidmodifikation eine spezifische Funktion bei der Wechselwirkung von belichtetem Rhodopsin und dem C-terminalen Bereich der G $\gamma$ -Untereinheit hat. Das farnesylierte Peptid stabilisierte Meta-II um den Faktor 5 besser als bei einer Geranylgeranyl-Modifikation und um den Faktor 12 besser als bei einer Geranyl-Modifizierung.

Verschiedene Modelle für die Interaktion von lichtaktiviertem Rhodopsin mit Transducin werden diskutiert (Kisselev *et al.*, 1999; Marin *et al.*, 2002; Natochin *et al.*, 2001; Rondard *et al.*, 2001), ein großes Problem ist jedoch, dass zwischen den beiden am G-Protein als Hauptbindungsstellen identifizierten Regionen des Gt $\alpha$ -C-Terminus und des farnesylierten G $\gamma$ -C-Terminus eine Distanz von mehr als 40 Å liegt. Diesbezüglich wurde von Herrmann *et al.* (2004) anhand kinetischer Auswertungen von Lichtstreuungs-Bindungs-Experimenten ein Modell vorgeschlagen, bei welchem erst der C-Terminus der G $\gamma$ -Untereinheit bindet. Dadurch werden konformative Änderungen ausgelöst, wodurch der im Gt-Holoprotein "maskierte" C-terminale Bereich von Gt $\alpha$  zugänglich und in einem zweiten Schritt (daher "*sequentiell fit*"-Modell benannt) gebunden wird. Erst dann wird die Nukleotidfreisetzung durch den Rezeptor katalysiert.



Eine andere Möglichkeit der Interaktion bzw. der Überbrückung einer Distanz von 40 Å wäre eine Dimerisierung des Rezeptors, wie sie für andere GPCRs bereits nachgewiesen wurde (Rios et al., 2001). Diesbezüglich wurden AFM-Bilder (engl.: „*atomic force microscopy*“) veröffentlicht, in welchen organisierte Strukturen von Rhodopsin-Dimeren bzw. -Oligomeren erkennbar sind. (Fotiadis et al., 2003; Liang et al., 2003). Die Frage, ob der Photorezeptor im Grundzustand oder nach Lichtaktivierung Dimere bildet und ob eine solche Dimerisierung für die Gt Aktivierung oder die Interaktion mit Arrestin notwendig ist, ist derzeit noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen (Chabre et al., 2003; Fotiadis et al., 2003; Fotiadis et al., 2004).

## 1.5. Ziel der Arbeit

Rhodopsin ist der Lichtrezeptor der visuellen Kaskade und gilt als bestuntersuchter Modell-Rezeptor der großen Familie der GPCRs. Diese Arbeit hat das Ziel, einen Beitrag zur Kartierung von Rhodopsin hinsichtlich struktureller Determinanten des aktiven Rezeptorzustandes zu leisten. Im Fokus der Dissertation steht die Rolle des in GPCRs hochkonservierten NPxxY-Motivs am cytoplasmatischen Ende der Helix VII sowie der achten Helix bei der Rezeptoraktivierung und der Präsentation von Bindungsstellen für Transducin. Außerdem soll die Funktion des Retinal-Ringes beim Aktivierungsmechanismus am Beispiel eines modifizierten azyklischen Retinals untersucht werden.

Zur Klärung dieser Fragen wurden eine Reihe von Rhodopsinmutanten hergestellt, bei denen einzelne Aminosäurereste oder auch ganze Motive ausgetauscht sind. Aufgrund der klar definierten spektroskopischen Eigenschaften der Photointermediate konnten zur Charakterisierung der Pigmente verschiedene spektroskopische Techniken eingesetzt werden: UV/Vis-, Infrarot- und Fluoreszenzspektroskopie.

Die konkreten Fragestellungen, mit denen ich mich beschäftigt habe möchte ich im folgenden erläutern.

### 1.5.1. Die Rolle des NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motivs bei der Rhodopsinaktivierung

Aus einem Vergleich der Aminosäuresequenzen von 74 verschiedenen Rezeptoren der GPCR-Superfamilie (Probst et al., 1992) ging hervor, dass es ein konserviertes NPxxY-Motiv am cytoplasmatischen Ende der Helix-VII gibt. Durch die Rhodopsin-Kristallstruktur von Palczewski *et al.* (Palczewski et al., 2000) wurden detaillierte Strukturen des Rezeptors sichtbar. Unter anderem zeigte die Struktur eine hydrophobe Interaktion der aromatischen Ringe von Tyr306 und Phe313, welche die Helix-VII mit der parallel zur Membran liegende Helix-8 verbindet. Auch ein Phenylalanin-Rest ist bei den meisten GPCRs sechs bis sieben Positionen nach dem NPxxY-Motiv zu finden, woraus sich eine übergreifende Funktion dieser Interaktion für den Aktivierungsmechanismus ableiten lässt.

Mutagenesestudien am Rhodopsin wiesen auf eine Rolle der achten Helix bei der lichtaktivierten Interaktion mit Transducin hin und von Abdulaev *et al.* (1998) wurde anhand von spezifisch an lichtaktiviertes Rhodopsin bindenden Antikörpern beschrieben, dass die C-terminale Region der Helix-VII lichtspezifisch exponiert wird.

Das NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv war auch Gegenstand verschiedener Untersuchungen an anderen GPCRs. Mutationen in diesem Motiv hatten Auswirkungen auf die Rezeptor-Expression, die Affinität zum Liganden, die Rezeptor-Sequestration, die Kopplung heterotrimerer G-Proteine sowie zu den kleinen G-Proteinen ARF (*ADP-ribosylation factor*) und RhoA (Barak et al., 1995; Mitchell et al., 1998;

Prioleau et al., 2002; Wess et al., 1993). Doch die konkrete Funktion des konservierten Motivs ist noch nicht klar.

Anhand einer Mutagenesestudie am Rhodopsin sollte die Bedeutung der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F Region studiert werden. Die veränderten Rezeptoren sollten hinsichtlich ihrer Expression, der Stabilität der rekonstituierten Pigmente, ihres Aktivierungsmechanismus sowie ihrer Gt-Interaktion charakterisiert werden. Dazu wurde der Chromophor 9-dm-Retinal verwendet, dessen partiell-agonistische Wirkung eine Differenzierung der Photoprodukte der solubilisierten Pigmente erlaubt. Ein besonderer Gesichtspunkt war auch die Auswirkung einer gestörten Brücke zwischen Tyr306 und Phe313.

Die komplexe Bedeutung dieser Region wird im Kapitel 3 erläutert. Teile der Arbeit wurden in Fritze *et al.* (2003) veröffentlicht.

### **1.5.2. Die Rolle der achten Helix von Rhodopsin bei der Transducinbindung**

Die Kristallstrukturen des Rezeptors Rhodopsin wie auch des G-Proteins Transducin sind bekannt (siehe 1.3.1 und 1.4.2). Bezüglich der Interaktion von Gt mit dem Rezeptor (siehe 1.4.3) gibt es zwar verschiedene Modelle, doch der exakte Reaktionsmechanismus ist noch unklar. Daher besteht ein großes Interesse an der genauen Charakterisierung von Bindungsstellen bei beiden Proteinen.

In verschiedenen Studien wurde die Rolle der achten Helix bei der Gt-Bindung und -Aktivierung widersprüchlich bewertet (siehe 4.). Ergebnisse neuerer Veröffentlichungen geben aber sehr starke Hinweise für eine Beteiligung der achten Helix bei der Gt-Interaktion. Eine Mutagenesestudie bei welcher Aminosäurereste gegen Cystein ausgetauscht wurden zeigte starke (N310S) bis mäßige (F313S, M317S) Einschränkungen der Gt-Aktivierung (Altenbach et al., 1999; Cai et al., 1999). Zudem wurden Studien veröffentlicht, bei denen Rhodopsin-Chimären mit Teilen des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors untersucht wurden (Ernst et al., 2000; Kim et al., 2005; Marin et al., 2000). Hier bewirkte der Austausch von nur drei Aminosäureresten (N310S, K311P, Q312D) eine Inaktivierung des Rezeptors. Die Weiterführung dieser Studie steht im Fokus dieses Teils der Dissertation. Zum einen soll untersucht werden, ob der Tausch von Lys311 gegen Prolin die funktionelle Einschränkung des Rezeptors bewirkte. Zum anderen soll eine weitere Rhodopsin-Chimäre hinsichtlich der Interaktion mit Gt untersucht werden, bei welcher auch die Verbindungsschleife zwischen Helix-VII und 8 (Positionen 307 bis 321) mit der homologen Sequenz des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors ersetzt wurde.

Zudem soll mit Hilfe der erwähnten Rhodopsin-Chimäre ein anderer Gesichtspunkt studiert werden. Die Ergebnisse zu dem in dieser Arbeit untersuchten NPxxY<sub>(5,6)</sub>F-Motivs spiegeln eine Kopplung konformativer Änderungen im Bereich der Helix-8 an Protonendelokalisationen während des Übergangs zur aktiven Rezeptorkonformation wider. Analog dazu sollen auch die Auswirkungen der veränderten Helix-8 auf den Aktivierungsmechanismus, insbesondere des Gleichgewichts der Meta-Rhodopsine untersucht werden. Die Ergebnisse werden im Kapitel 4 vorgestellt und diskutiert.

### 1.5.3. Die Rolle des Retinal-Rings bei der Rhodopsinaktivierung

Verschiedene Mutagenesestudien am Rhodopsin (siehe 1.3.3) zeigten, dass ein Bruch der Salzbrücke zwischen protonierter Schiffbase und Gegenion für die Rezeptoraktivierung wichtige Protonierungsschritte vorwegnimmt, die zu konstitutiver Opsin-Aktivität führen. Der Einbau von 11-*cis*-Retinal führt bei diesen Pigmenten jedoch zu einer Abschaltung des Rezeptors bzw. zu einer lichtabhängigen Aktivierung (Überblick in Kim et al., 2004). 11-*cis*-Retinal fixiert somit den inaktiven Grundzustand. Daraufhin wurde dem Retinal hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus von Rhodopsin die Funktion eines stereochemischen Schalters (*steric trigger*) zugewiesen (Yan et al., 1991). Bei der Suche nach dem Mechanismus für diesen stereochemischen Schalter konzentrierte sich die Forschung auf die Funktion der 9-Methyl-Gruppe (siehe Meyer et al., 2000) und des  $\beta$ -Ionon-Rings des Retinals. Bezüglich der Bedeutung des Retinal-Rings gab es widersprüchliche Befunde. Crouch *et al.* (1983) zeigten, dass mit einem geöffneten ("azyklischen") Ring stabile Pigmente geformt werden können, wobei die in Abb. 50 gezeigten verbliebenen Ringfragmente essentiell für die Verankerung des Retinals in der Bindungstasche sind. Jäger *et al.* (1994) wiesen diesem azyklischen Retinal Eigenschaften eines partiellen Agonisten zu. Die vorherrschende Meinung bezüglich der Ring-Funktion ist allerdings, dass ein vollständiger Ring für die Verspannung des Retinals in der Bindungstasche während des Aktivierungsprozesses essentiell ist und durch die Nähe zur Helix-VI aktiv an den konformativen Änderungen des Proteins bis hin zur Bildung der aktiven Meta-II Konformation teilnimmt (Spooner et al., 2004; Spooner et al., 2003). Gegen eine unveränderte Position des  $\beta$ -Ionon-Rings während der Aktivierung sprachen dagegen Quervernetzungsstudien, aus denen hervorging, dass der Ring beim Übergang von Batho- nach Lumirhodopsin in Richtung Helix-IV umklappt (Borhan et al., 2000).

Die Frage danach, welche Rolle der Retinal-Ring bei den einzelnen Aktivierungsschritten hat ist also von großer Bedeutung. Die diesbezüglichen Ergebnisse wurden im Kapitel 5 dargelegt (veröffentlicht in Bartl et al., 2005).

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1. Materialien und Chemikalien

#### 2.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen

Chemikalien / Materialien	Hersteller
Centricon YM-10	Millipore, Eschborn
1,10-Phenanthroline Monohydrate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1D4 Antikörper	National Cell Culture Center, Minneapolis, USA
all- <i>trans</i> -Retinal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche, Mannheim
Biorad (Bradford-) Reagenz	Biorad, München
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Con-A Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
COS-1 Zellen	American Type Cell Collection, Rockville, USA
DEAE-Dextran (Chloride form)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylether (Reinheit >99,8 %)	Merck, Darmstadt
DMEM (Dulbecco modifiziertes Eagle-Medium)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Mini/Mega/Giga-Prep Kit	Qiagen, Hilden
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS (fetal calf serum)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Heptan (Reinheit >99 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
„HiTrap Blue“-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Längenstandard (DNA)	Roche, Mannheim
Längenstandard (Proteinstandardmischung IV)	Merck, Darmstadt
LB-Medium, Miller	Becton-Dickinson, Augsburg
n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DM)	Biomol, Hamburg
N-Glucosidase F, rekombinant	Roche, Mannheim
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Protease-Inhibitor-Complete-Tablette	Roche, Mannheim
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Tris-HCl (1M, pH 7,4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Zellkultur Rollerflaschen ( $A_0=850 \text{ cm}^2$ )	Falcon, Greiner

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Materialien sowie deren Bezugsquellen**

### 2.1.2. *Escherichia coli* (*E. coli*)

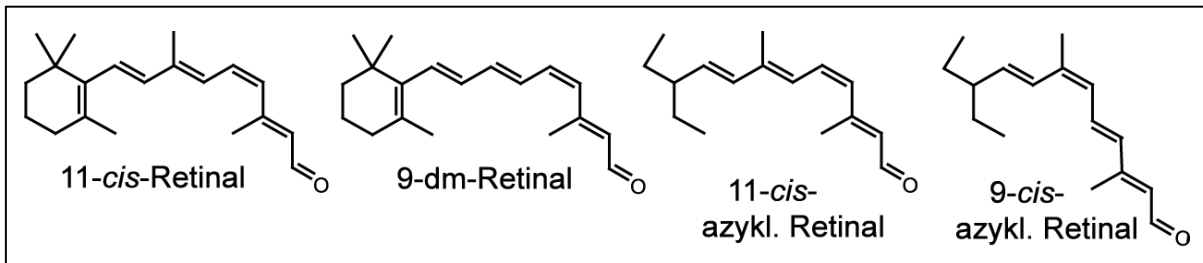
Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* –Stamm XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB laqI<sup>Δ</sup>ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

### 2.1.3. COS-1 Zellen

Für die Expression von Rhodopsin wurden COS-1 Zellen (Nierenzellen vom *African green monkey*, American Type Cell Collection, Rockeville, USA; ATCC #CRL-1650) verwendet. Die COS-1 Zell-Linie (Gluzman, 1981) entstand aus der CV-1 Zell-Linie (Jensen et al., 1964) durch Transformation mit einer Mutante des Simian Virus 40 (SV40) mit defektem Replikations-Origin. SV40 repliziert sich dadurch nicht eigenständig, es wird jedoch eine als Tumor-Antigen ("T-Antigen") bekannte DNA-Helikase (siehe Wessel et al., 1992) durch die SV40-DNA exprimiert, welches wiederum für die Replikation und Transkription von pMT4-Plasmiden mit intaktem SV40-Origin genutzt wird. Dadurch sind COS-1 Zellen zur transienten Transfektion mit pMT4-Plasmiden geeignet.

### 2.1.4. Retinale



**Abb. 10: Struktur der verwendeten Retinale**

11-*cis*-Retinal, 11-*cis*-9-Demethyl-Retinal (9-dm-Retinal), 4-*cis*-3,7-Dimethyl-10-Ethyl-2,4,6,8-Dodecatetraenal (11-*cis*-azyklisches Retinal) und 6-*cis*-3,7-Dimethyl-10-Ethyl-2,4,6,8-Dodecatetraenal (9-*cis*-azyklisches Retinal)

Die in dieser Arbeit verwendeten Retinale sind in Abb. 10 dargestellt. 9-dm-Retinal und die azyklischen Retinale wurden freundlicherweise von Vladimir Kuksa und Krzysztof Palczewski (University of Washington, Seattle, WA, USA) zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung von 11-*cis*-Retinal wurden ca. 25 mg all-*trans*-Retinal in 10 ml Acetonitril in einem braunen 25 ml Rundkolben gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und unter leichtem Rühren für 15 min mit gelbem Licht belichtet (Kaltlichtquelle mit Schott-Filter  $\lambda < 420\text{nm}$  und Wärmefilter). Durch die Belichtung stellte sich ein Photogleichgewicht ein, in welchem ca. 25 % des Retinals in der 11-*cis*-Konformation vorlagen. Dieses Gemisch der Retinal-Isomere wurde mittels präparativer HPLC getrennt. Dazu wurde der Probe das Lösungsmittel entzogen, das Retinalgemisch

wieder in 5 ml 5 % (v/v) Diethylether in Heptan aufgenommen und über eine HPLC-Säule (Merck Lichrosorb Si60, 5 µm, 300x20 mm) mit 5 % Diethylether in Heptan als Laufmittel aufgetrennt. Die 11-*cis* Fraktion wurde in einem braunen 250 ml Rundkolben gesammelt, eingedampft und bei -80 °C eingefroren.

Zur Rekonstitution von Rhodopsin wurde eine Stammlösung von ca. 15-20 mM Retinal in Ethanol (absolut, HPLC-Grade) hergestellt. Die Konzentration der Retinale wurde UV/Vis-spektrometrisch bestimmt. Die Reinheit wurde mittels analytischer HPLC (Lichrosorb Si60, 5 µm, 250x4 mm) mit 5 % Diethylether in Heptan als Laufmittel überprüft.

Die Konzentration der mit den entsprechenden Retinalen rekonstituierten Pigmente wurde UV/Vis-spektrometrisch bestimmt (siehe 2.6.1).

## 2.2. Geräte

Eine Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Geräte ist in Tabelle 2 angegeben.

**Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hersteller**

Geräte	Hersteller / Typ
Fluoreszenzspektrometer	SPEX, Fluorolog II
Spektralphotometer	Eppendorf, Bio-Photometer
UV-Vis Spektrometer	Varian, Cary 50 Bio
HPLC (präparativ)	Beckmann, System Gold
HPLC (präparativ)	Hewlett Packard, Series 1050
Zentrifuge	Beckman Coulter, Avanti J-25
Ultrazentrifuge	Beckman, L-70 Ultrazentrifuge
Ultrazentrifuge	Beckman, Optima TXL Ultrazentrifuge
Tisch-Zentrifuge	Eppendorf, Modell 5417C / 5415D

## 2.3. Proteinchemische Methoden

### 2.3.1. Präparation von Außensegmenten der Stäbchenzelle

Die Präparation von Außensegmenten der Stäbchenzelle (ROS, '*rod outer segments*') erfolgte nach einer von Papermaster 1982 (Papermaster, 1982) entwickelten Methode. Hierbei wird ausgenutzt, dass die Stäbchenzelle bei Einwirkung von Scherkräften am Zilium bricht und das Außensegment vom Innensegment und somit von den Zellen der Retina abgetrennt wird.

In einem lichtdichten Behälter wurden Augen frisch geschlachteter Rinder auf Eis gesammelt und am gleichen Tag unter schwachem Rotlicht (Rotfilter RG 650, Schott) präpariert. Das Auge wurde durch einen Rund- oder Kreuzschnitt in der Cornea geöffnet und der Glaskörper entfernt. Durch Umstülpen des Auges wurde der hintere Teil des Bulbus mit der Retina freigelegt. Die Retina, die lose

auf dem Pigmentepithel haftet, kann in Richtung *Nervus opticus* zusammengeschoben und dort abgetrennt werden. Die Retinae wurden in einer 45%igen Saccharose-Lösung (0,5 ml /Retina) in Puffer A (pH 7,0, 40 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 mM Glucose) auf Eis gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 80 °C aufbewahrt.

Die aufgetauten Retinae wurden resuspendiert und etwa 2 Minuten kräftig geschüttelt, wodurch die Stäbchenaußensegmente am Zilium abbrechen. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (5000 U/min, 5 min, 4 °C, Rotor Beckmann JS-13.1) und durch eine Baumwollgaze (Porengröße: 100 µm) filtriert. Das Filtrat wurde 1:1 mit Puffer A verdünnt und nochmals zentrifugiert (10.000 U/min, 10 min, 4 °C, Beckmann JS-13.1). Das Pellet wurde in einer 45%igen Saccharose-Lösung in Puffer A resuspendiert und mit einem diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (1,11, 1,13 und 1,15 g/cm<sup>3</sup>) zentrifugiert (13.000 U/min, 20 min, 4 °C, Beckmann JS-13.1). Die Stäbchenaußensegmente sammelten sich hierbei zwischen der oberen und mittleren Schicht des Stufengradienten an. Diese Grenzschicht wurde mit einer Spritze abgesaugt, mit Puffer A (1:1) gewaschen und zentrifugiert (10.000 U/min, 10 min, 4 °C, Beckmann JS-13.1). Das Pellet wurde mit 1-2 ml Überstand bei –40 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Mit dieser Methode konnten aus 100 Retinae eine Rhodopsinmenge von 50-80 mg gewonnen werden.

### **2.3.2. Präparation gereinigter Diskmembranen**

Gewaschene Diskmembranen wurden unter hypotonen Bedingungen aus ROS extrahiert. Die Außensegmente zerplatzen aufgrund des erhöhten osmotischen Druckes in den Zellen. Gleichzeitig gehen periphere Membranproteine bei niedriger Ionenstärke und unbelichteter Probe in Lösung (Kühn, 1981).

Die aufgetauten Stäbchenaußensegmente wurden im hypotonen Puffer B (5 mM PIPES, pH 7,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) resuspendiert. Die aufgeplatzten Zellen wurden abzentrifugiert (28 000 U/min, 20 min, 4 °C, Beckmann JA-30.50) und das Pellet nochmals mit Puffer B resuspendiert und gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde in Puffer C (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7,5) resuspendiert und bei –40 °C eingefroren. Diese gewaschenen Diskmembranen (WMs, '*washed membranes*') enthielten zum größten Teil nur noch Rhodopsin. Wenn nicht anders beschrieben, wurden WM's in 10 % DM (w/v) solubilisiert, als Referenz parallel zu exprimierten Rezeptoren mittels 1D4-Immuno-Affinitätschromatographie (siehe 2.5.5) aufgearbeitet oder als Wildtyp-Rezeptor im Assay zur Transducin-Aktivierung eingesetzt. Die Konzentration wurde spektroskopisch bestimmt durch die Ermittlung des Absorptionsmaximums bei 500 nm im Differenzspektrum von belichteter und unbelichteter Probe. Die Messung erfolgte in Gegenwart von 100 mM Hydroxylamin, welches bei belichtetem Rhodopsin mit Retinal zu Retinaloxim reagiert.



### 2.3.3. Transducin-Präparation aus Stäbchenaußensegmenten

Transducin wurde nach der von Kühn (1982) beschriebenen und von Heck und Hofmann (1993) modifizierten Methode präpariert. Bei dieser Reinigung wird ausgenutzt, dass in Abwesenheit von Nukleotiden Transducin bei Belichtung an das membrangebundene Rhodopsin bindet.

Präparierte Stäbchenaußensegmente (siehe 2.3.1) von ca. 100 Retinae (entspricht ca. 100 mg Rhodopsin) wurden unter Rotlicht in isotonem Puffer P (20 mM BTP, 120 mM KCl, 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, pH 6,9), versetzt mit 1 Tablette Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitor (Roche) je 250 ml, aufgenommen (Konzentration ca. 4 mg Rhodopsin/ml) und resuspendiert. Die Suspension wurde in einem Glas/Glas-Homogenisator homogenisiert, mit Puffer P auf 1 mg Rhodopsin/ml verdünnt, MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 5 mM) zugesetzt und für 10 min auf Eis belichtet (Orangefilter Schott OG-550). Transducin bindet dabei an das lichtaktivierte Rhodopsin.

Dann wurden die Membranen mit gebundenem Gt abzentrifugiert (28.000 U/min, 30 min, 4 °C, Beckmann JA-30.50) und die Pellets in hypotonem Puffer Q (5 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, pH 6,9) resuspendiert (Rhodopsin Endkonzentration 4 mg/ml). Nach erneuter Zentrifugation (28.000 U/min, 30 min, 4 °C, Beckmann JA-30.50) wurden die Pellets in Puffer Q (mit zusätzlich 150 µM GTP und 50 µM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert (Rhodopsin Endkonzentration 3 mg/ml) und 9 min inkubiert. Die Zugabe von GTP führt zum Nukleotidaustausch (GDP → GTP) in der α-Untereinheit des Transducins, wodurch dessen Dissoziation von der Membran induziert wird.

Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, (28.000 U/min, 30 min, 4 °C, Beckmann JA-30.50), der Überstand bei 4 °C aufbewahrt und das Pellet erneut in Puffer Q (mit 150 µM GTP und 50 µM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert (Rhodopsin Endkonzentration 3 mg/ml). Nach 9 min Inkubation wurde die Zentrifugation wiederholt und die Überstände zusammengeführt. Die vereinigten Überstände wurden erneut zentrifugiert (40.000 U/min, 15 min, 4 °C, Beckmann-Rotor Typ 50.2), um die Lösung von Membranresten zu befreien. Mittels einer Ultrafiltrationszelle (Amicon, Membranfilter YM-10) wurde die Suspension auf ca. 3 ml eingengt und über Nacht in isotonem Puffer C (20 mM BTP (pH 7,5), 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) dialysiert (Dialyseschlauch, Durchlass < 12 kDa).

Für die nachfolgende Säulenchromatographie wurden entstandene Agglomerate mittels Ultrazentrifugation (60.000 U/min, 15 min, 4 °C, Beckmann TLA-100.4) entfernt.

Um mögliche Rhodopsinverunreinigungen in der Probe zu entfernen, wurde diese auf eine Concanavalin-A-Säule (ConA) aufgetragen (ca. 1 ml ConA-Sepharose, Flussrate 0,1 ml/min, Puffer C). Dabei wird die Affinität der mit Zucker modifizierten Rhodopsin-Moleküle zu ConA ausgenutzt. Das Transducin wurde in Puffer C eluiert.

Die Proteinkonzentration des eluierten Gt wurde mittels Bradfordmethode (siehe 2.3.5) bestimmt. Das Gt wurde auf eine Konzentration von ca. 1 mg/ml mit Centricon YM-10 Membranfiltern aufkonzentriert (4.300 U/min, 4 °C, Heraeus-Biofuge) und bei -80 °C gelagert.

#### **2.3.4. Präparation von Transducin-Untereinheiten**

Das Verfahren zur Reinigung der Transducin Untereinheiten entspricht im Wesentlichen der im Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Prozedur. Allerdings wurde die Probe nach Dissoziation der Gt-Untereinheiten, Sammeln und Einengen der Überstände nicht dialysiert, sondern mittels Ultrazentrifugation (60.000 U/min, 15 min, 4 °C, Beckmann TLA-100.4) direkt für die Säulenchromatographie vorbereitet. Die Reinigung der Transducin-Untereinheiten erfolgte mittels Affinitätschromatographie (1 ml „HiTrap Blue“-Sepharose, Flussrate 0,05 ml/min). Aktives Gt $\beta\gamma$  wurde mit einem linearen Gradienten von 0 – 0,3 M NaCl (in 20 mM BTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, pH 7,5) eluiert. Die anschließende Elution von Gt $\alpha$  erfolgte mit 1 M NaCl (in 20 mM BTP, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, pH 7,5). Die Untereinheiten wurden gegen Messpuffer (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, pH 7,5) dialysiert und anschließend konzentriert (Amicon, YM-10). Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit BSA als Proteinstandard bestimmt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

#### **2.3.5. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde mit BioRad-Protein-Reagenz nach der Bradfordmethode bestimmt (Bradford, 1976). Dazu werden 10  $\mu$ l Probe in 790  $\mu$ l Puffer gelöst und mit 200  $\mu$ l BioRad-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

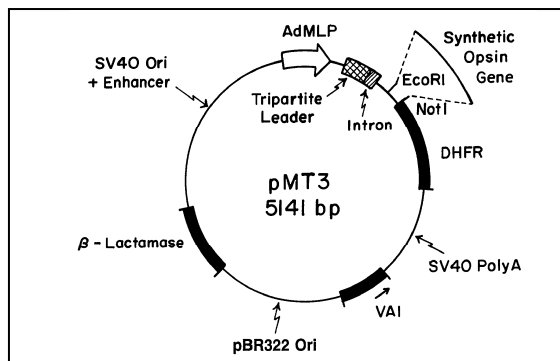
#### **2.3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach dem von Laemmli (Laemmli, 1970) beschriebenen Verfahren, es wurde eine Mini-Protean II®-Apparatur (Biorad, München) mit 12%igen Acrylamidgelen verwendet. Die Proteine wurden mittels Coomassie Blue R-250-Färbung nachgewiesen.

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

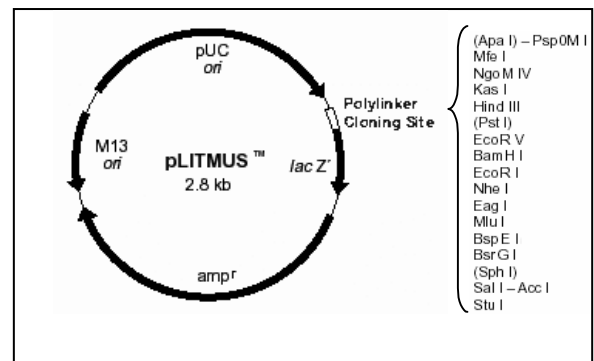
Wenn nicht anders beschrieben, wurden molekularbiologische Standardprozeduren nach gängigen Protokollen durchgeführt (siehe Ausubel et al., 1987; Davis et al., 1994; Sambrook et al., 1989).

### 2.4.1. Klonierung der Opsin-Mutanten



**Abb. 11: Der eukaryotische Expressionsvektor pMT4**  
Mittels Restriktions-Endonukleasen wurde das synthetische Opsin-Gen als EcoRI-NotI-Fragment in den Vektor pMT3 eingefügt (siehe Ferretti et al., 1986; Franke et al., 1988).

Ori: Replikationsursprung, DHFR: Dihydrofolat-reduktase-Gen, AdMLP: Adenovirus Major Late Promotor, Poly A: Polyadenylierungssignal, VAI: Virus-assoziiertes Gen (aus Khorana, 1993)



**Abb. 12: Der Klonierungsvektor pLITMUS-38**

pUC-ori: Bakterien-Replikationsursprung; M13-ori: Replikationsursprung des Coliphagen M13, lacZ': β-Galactosidase-Gen, amp<sup>r</sup>: Ampicillin-Resistenz-Gen

Die Klonierungen der in dieser Arbeit vorgestellten Opsin-Mutanten erfolgten auf Basis eines von (Ferretti et al., 1986) hergestellten synthetischen Opsin-Gens, welches in einen eukaryotischen Expressionsvektor eingebaut wurde (Franke et al., 1988; Oprian et al., 1987). Der Vektor pMT4 (enthält das Opsin-Gen) wurde freundlicherweise von Dr. Tom Sakmar (Rockefeller University, New York) zur Verfügung gestellt. Die Mutationen in den Opsin-Mutanten-Genen wurden mittels Kassettenmutagenese in das Opsin-Gen eingefügt. Dabei wurden Fragmente innerhalb des Opsin-Gens mittels Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und durch synthetisch hergestellte Oligonukleotid-Fragmente mit entsprechend modifizierten Sequenzen ersetzt.

Um für die Klonierungen Restriktionsschnittstellen nutzen zu können, die im ursprünglichen Expressionsvektor pMT4 mehrfach vorkommen, wurde ein *PstI/SalI*-Restriktionsfragment in den Klonierungs-Vektor pLITMUS-38 (siehe Abb. 12, New England Biolabs, Frankfurt am Main) kloniert.

Für die Mutanten des NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motivs wurden durch Austausch von *AatII/BspEI*- oder *AatII/BstEII*-Restriktions-Fragmenten mit den entsprechenden synthetisch hergestellten Oligonukleotid-Duplexen (Duplex jeweils bestehend aus kodierender- und Template-DNA) Codon-

Änderungen in den Klonierungsvektor eingeführt. Das so veränderte *PstI/SalI*-Restriktionsfragment wurde dann in den Expressions-Vektor pMT4 subkloniert.

Die Vektoren für die CTr1-, CTr2- und CTr4-Mutante wurden bereits früher von unserer Arbeitsgruppe hergestellt (Marin et al., 2000). Für die CTr5-Mutante wurde mittels QuikChange (Stratagene-Kit) das Codon für Lys311 im CTr2-Vektor geändert und das *MluI/NotI*-Restriktionsfragment in den pMT4-Vektor kloniert. Für den CTr6-Vektor wurde im pMT4-Vektor das *ApaI/BspEI*- Restriktionsfragment durch synthetische Oligonukleotid-Duplexe ausgetauscht.

Um zusätzliche E134Q-Mutationen in das Opsin-Gen einzufügen, wurde das *PstI/SalI*-Restriktionsfragment in ein Derivat des pMT4-Expressionsvektors eingefügt, welches die E134Q-Mutation enthielt (Sakmar et al., 1989). Auch dieser Vektor wurde freundlicherweise von Dr. Tom Sakmar (Rockefeller University, New York) zur Verfügung gestellt.

#### **2.4.2. Annealing von Oligonukleotiden**

Zur Herstellung der Rhodopsin-Mutanten mittels Kassettenmutagenese wurden synthetische komplementäre Oligonukleotid-Paare verwendet (BioTeZ, Berlin-Buch). Die Oligonukleotid-Paare wurden so gewählt, dass sie den entsprechenden Codon-Austausch enthielten und dass die Enden zu dem mittels Restriktionsendonukleasen aufgeschnittenen Plasmid-Vektor passten.

Die erhaltenen Oligonukleotide wurden in Wasser aufgenommen (100 pmol/ $\mu$ l). Es wurde je 50  $\mu$ l der entsprechenden Einzelstrang-Oligonukleotide zusammenpipettiert, für 10 min bei 90 °C inkubiert und dann über ca. 2,5 h langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

#### **2.4.3. Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels horizontaler Gelelektrophorese wurde zur Kontrolle von Plasmid-Präparationen und Restriktionsreaktionen durchgeführt. Dazu wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM Natriumacetat, pH 7,2, 1 mM EDTA) aufgenommen, aufgeköcht, auf ca. 60 °C abgekühlt und vor dem Einbringen in die Elektrophoresekammer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu$ g/ml Endkonzentration) zugegeben.

#### **2.4.4. Restriktionsverdau von DNA-Plasmiden**

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) bezogen.

Für einen analytischen Verdau wurden 15  $\mu$ l Restriktions-Mischung angesetzt. Dazu wurden ca. 100 fmol DNA (ca. 400 ng pMT4-Vektor) im vom Hersteller für das entsprechende Restriktionsenzym vorgeschlagenen Puffer aufgenommen (wenn empfohlen add. 10  $\mu$ g/ml BSA), 5 Units Enzym dazugegeben, gemischt und ca. 3 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

Anschließend wurde das Gemisch mit 1/10 DNA-Auftragspuffer (50 % Glycerin; 50 mM EDTA, pH 8,0, 0,25 % Bromphenolblau) versetzt und in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch

aufgetrennt. Ein Standard (100 kb DNA Leiter, NEB, Frankfurt am Main) wurde parallel mit aufgetragen.

Zur Isolierung der Vektor-DNA bzw. des ausgeschnittenen DNA-Fragments wurde ein präparativer Verdau angesetzt, bei welchem das Plasmid zweifach geschnitten wurde. In 300 µl wurden ca. 1 pmol DNA mit je 50 Units der entsprechenden Enzyme im vom Hersteller empfohlenen Puffer gemischt und ca. 3 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Mittels analytischer Gelelektrophorese wurde sichergestellt, dass der DNA-Verdau abgeschlossen war. Der komplette Ansatz wurde präparativ gelelektrophoretisch aufgetrennt (1%iges Agarosegel).

#### **2.4.5. Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach oben beschriebenem Restriktionsverdau mit nachfolgender präparativer elektrophoretischer Auftrennung wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und das gesuchte DNA-Fragment mit Hilfe des *QIAquick-Gel-Extraktion Kits* (Qiagen) aufgereinigt.

Bei der Prozedur wird ausgenutzt, dass bei hoher Konzentration eines chaotropen Salzes (Guanidiniumisothiocyanat, GITC) das Schmelzen der Agarose unterstützt wird und die Hydrathülle der DNA entzogen wird, wodurch letztere ausfällt und selektiv an eine Silicagel-Membran bindet ). Darauf folgend wurde die DNA gewaschen und mit Wasser eluiert.

#### **2.4.6. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Nach Spaltung von Vektor-DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde diese zusätzlich mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt, um die endständigen 5'-Phosphatgruppen zu entfernen und damit eine Rezirkularisierung der Vektor-DNA bei der Ligation zu verhindern. Ca. 1 - 2 µg Vektor-DNA wurden mit 1 µl CIP (1 U/ml) in 1 x CIP-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 minütige Inkubation bei 75 °C gestoppt.

#### **2.4.7. Ligation von DNA-Fragmenten**

In einen Ligationsansatz wurden etwa 100 fmol Vektor-DNA, 300 fmol Insert-DNA, 2 Units T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) und 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffers auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt, gemischt und etwa 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Parallel zu jeder Ligationsreaktion wurde eine Kontrolle ohne Insert-DNA durchgeführt, um bei der nachfolgenden Transformation die Rate einer möglichen 'Selbstligation' des Vektors festzustellen.

#### **2.4.8. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen (RbCl-Methode)**

Tiefgefrorene *E. coli* Zellen (DH5α oder XL1-Blue) wurden auf einer Agarplatte mit φα-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % BactoTryptone, 40 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,6) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurden dann 5 ml Vorkultur (φα-Medium) angeimpft und erneut über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zum Ansetzen der Hauptkultur wurden 2 ml

dieser Vorkultur mit 100 ml vorgewärmten  $\phi\alpha$ -Mediums verdünnt und 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde die Hauptkultur 5 min auf Eis abgekühlt und in vorgekühlten 50 ml Falcon-Röhrchen zentrifugiert (5.000 rpm, vorgekühlter GSA-Rotor mit Adapter, 5 min, 4 °C). Die Zellen wurden mit 40 ml eiskaltem Tfb I-Puffer (30 mM KAc, pH 5,8, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin) resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert (5.000 rpm, vorgekühlter GSA-Rotor mit Adapter, 5 min, 4 °C). Die erhaltenen Pellets wurden mit 4 ml eiskaltem Tfb II-Puffer (10 mM MOPS, pH 6,5, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Röhrchen aliquotiert, sofort mit Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.4.9. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Auf Eis wurden 45  $\mu$ l der kompetenten *E. coli* Zellen mit 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes bzw. 0,5  $\mu$ l präparierte Plasmid-DNA (ca. 10 ng/ $\mu$ l in Puffer TE; Puffer TE mit: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte in einer Hitzeschockphase von 2 min (42 °C, Wasserbad). Nach einer Inkubation von 1-2 min auf Eis, wurden 500  $\mu$ l LB-Medium (*Luria-Bertani* Medium: 10 g/l Bacto<sup>TM</sup> Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 1 mM NaOH, pH 7,0) ohne Ampicillin zugegeben und die Zellen wurden 45 min bei 37 °C leicht geschüttelt. 100  $\mu$ l der Bakterienkultur wurden auf LB-Platten (10 g/l Bacto<sup>TM</sup> Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 6 g/l NaCl) mit Ampizillin (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausgestrichen, ggf. bei Raumtemperatur angetrocknet und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden gepickt und auf frischen LB-Platten (100  $\mu$ g/ml Ampicillin) ausgestrichen. Diese Platten wurden ca. 1 Woche im Kühlschrank (6-10 °C) aufbewahrt und für den Ansatz von Vorkulturen für Plasmid-Präparationen (siehe 2.4.10) genutzt.

#### 2.4.10. Isolierung präparativer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die präparative Gewinnung von Plasmid-DNA hoher Qualität erfolgte mit QIAGEN Plasmid Kits (Mini, Mega, Giga; QIAGEN, Hilden) entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

Bei der Prozedur wurden die Zellen mittels alkalischer Lyse (200 mM NaOH, 1 % SDS) aufgeschlossen, Proteine wurden denaturiert und mit Salz (3 M Kaliumacetat) ausgefällt. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt und weiter mit Silicagel-basierenden Anionen-Austauscher-Säulen gereinigt, an welche unter geeigneten Bedingungen (Salz/pH) Plasmid-DNA gebunden bzw. von diesen eluiert werden konnte (Endkonzentration der Plasmide: 0,2-0,7  $\mu$ M).

#### 2.4.11. Reinheit und Konzentration der Plasmid-DNA

Die Reinheit der Plasmid-DNA (Verdünnung 1:100) wurde durch Bestimmung des Quotienten aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ermittelt (Sollwert: 1,8). Die Konzentration der Plasmid-DNA konnte aus dem gemessenen OD<sub>260</sub> Wert nach der Formel für doppelsträngige DNA (  $c$  [ $\mu$ g/ml] = OD<sub>260</sub>/ 0,02 ) für

1 cm Strahlendurchgang ermittelt werden. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass es keine Schwebeteilchen in der DNA gab:  $OD_{325} < 0,02$ )

#### **2.4.12. DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) und wurden von Herrn Dr. Martin Meixner, Institut für Genetik der Humboldt-Universität, Berlin, durchgeführt.

### **2.5. Präparation von Rhodopsin-Mutanten**

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Pigmente wurden in COS-1 Zellen (siehe 2.1.3) transient exprimiert. Die in Analogie zur virusinduzierten Infektion stattfindende Übertragung von fremden Erbmateriale in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Dazu wurde die DEAE-Dextran-Methode (Schenborn und Goiffon, 2000) angewandt, bei welcher Plasmid-DNA im Komplex mit DEAE-Dextran mittels Endocytose von den Zellen aufgenommen wird. Die Methode der Expression von Rhodopsin in COS-1 Zellen wurde im Labor von H. G. Khorana (MIT, Cambridge, MA, USA) entwickelt. Die dazu verwendeten Plasmide basieren auf dem pMT4-Vektor, der ein synthetisches Opsin-Gen enthält (Kapitel 2.4.1) .

#### **2.5.1. Transiente Transfektion von COS-1 Zellen mittels DEAE-Dextran-Methode**

Die zur Transfektion verwendeten COS-1 Zellen wurden in Plastik-Rollerflaschen (850 cm<sup>2</sup> Oberfläche, tissue culture grade) in einem Inkubator mit Rotationsvorrichtung bei 37 °C und unter einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Für die Transfektion wurden die Zellen auf 20.000 je cm<sup>2</sup> in die Roller-Flaschen ausgesät, so dass sie zur Zeit der Transfektion (3 Tage nach der Aussaat) eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten. Als Medium (Vollmedium) wurde DMEM mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS (*fetal calf serum*) verwendet.

150 µg DNA wurden pro zu transfizierende Rollerflasche in einem sterilen Gefäß abgefüllt. Zur Herstellung des Transfektions-Cocktails wurden 6 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.4), 48 ml DMEM-Medium (mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) und 6 ml DEAE-Dextran (Sigma, 2,5 mg/ml in DMEM) mit der DNA vermischt.

Alle folgend verwendeten Medien und Lösungen wurden vor der Aufgabe auf die Zellen auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden vor der Transfektion mikroskopisch überprüft, das verbrauchte Medium verworfen, der Transfektionsansatz (60 ml) auf die Zellen gegeben und 5,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Durch Fehlen des Serums und den darin enthaltenen Wachstumsfaktoren werden die Zellen einem Stress ausgesetzt, bei welchem sie den Komplex aus DEAE-Dextran und DNA endozytieren.

Dann wurde der Transfektionsansatz abgegossen und 75 ml Chloroquin-Mix (7,5 ml 0,1 mM Chloroquin, 67,5 ml Vollmedium) in jede Flasche gegeben und die Zellen 1,5 Stunden im Brutschrank

inkubiert. Durch die Zugabe des Chloroquins soll der Transport der DNA in den Zellkern verbessert werden. Nach dem Verwerfen des Chloroquin-Mix, wurden die Rollerflaschen zweimal mit PBS (*phosphate buffered saline*, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2) gewaschen. Folgend wurden 250-300 ml Vollmedium je Flasche zugegeben und die transfizierten Zellen weitere drei Tage im Brutschrank inkubiert.

### **2.5.2. Ernte der transfizierten COS-1 Zellen**

Das verbrauchte Medium wurde verworfen und die Zellen mit PBS zweimal gewaschen. Nun wurden die Zellen mit 30 ml EDTA-PBS (Stammlösung: 1 mM EDTA in PBS) pro transfizierter Rollerflasche für 10 min inkubiert. Zum Lösen der Zellen von der Rollerflasche wurde die Suspension gut geschüttelt und von der Flasche "geklopft". Zur geernteten Zellsuspension wurden 5 ml PBS, versetzt mit 1 Tablette Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitor (Roche), gegeben. Die Zellsuspension der Flasche wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert (3.600 rpm, 2 min). Pro geernteter Rollerflasche verblieben 15 ml Überstand auf dem Pellet. Letzteres wurde durch Vortexen resuspendiert.

### **2.5.3. Rekonstitution von rekombinantem Opsin mit Retinal**

Das Opsin in den Membranen der geernteten COS-1 Zellen wurde mit 11-*cis*-Retinal, 9-*dm*-Retinal oder mit azykl.-Retinal rekonstituiert. Alle folgenden Schritte wurden unter Rotlicht vollzogen, um den Rezeptor nicht zu belichten bzw. eine Isomerisierung des Retinals zu verhindern. Direkt nach der Ernte wurde die Zellsuspension ca. 4 Stunden auf einem Nutator bei 4 °C im Dunkeln in Anwesenheit von 30 µM 11-*cis*-Retinal bzw. 9-*dm*-Retinal inkubiert, wodurch der Chromophor in die Retinalbindungstasche gelangen und eine Schiffbasen-Bindung zum Opsin ausbilden konnte. Im Falle des azykl.-Retinals wurden die Membranen für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert.

### **2.5.4. Herstellung des 1D4-Immuno-Affinitätsgels**

Die Herstellung des zur Aufreinigung von exprimiertem Rhodopsin verwendeten 1D4-Immuno-Affinitätsgels erfolgte nach einem modifizierten Verfahren von Oprian *et al.* (1987). Gereinigte monoklonale Antikörper *rho-1D4*, spezifisch für den C-terminalen Bereich von Rhodopsin (Molday und MacKenzie, 1983), wurden vom *National Center for Research Resources and the National Culture Center* (Minneapolis, USA) erworben. Der 1D4-Antikörper wurde an eine CNBr-aktivierte Sepharose<sup>TM</sup>-4B (Amersham Pharmacia Biotech) gekoppelt. Die Bromcyan (CNBr)-Methode ist eine sehr universelle Variante zur Kopplung von Liganden, die eine primäre Aminogruppe besitzen. Sie basiert auf der Reaktion der Hydroxylgruppen der Polysaccharidketten der Trägermatrix mit Bromcyan. Die dabei gebildeten Carbamate bzw. Imidocarbonate sind sehr reaktionsfähig und reagieren leicht mit Aminogruppen zu Isoharnstoffderivaten.



Die Vorbereitung des Gels sowie die Kopplung des Antikörpers erfolgte bei Raumtemperatur. Zuerst wurden 40 ml der Kopplungslösung mit 2 mg 1D4-Antikörper je ml Kopplungspuffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,3) vorbereitet.

35 ml 1 mM HCl wurden in ein 50 ml Falcon Tube gefüllt und unter ständigem Rühren wurden 3 g CNBr-aktivierte Sepharose<sup>TM</sup>-4B langsam eingerieselt. Das Röhrchen wurde auf 50 ml mit 1 mM HCl aufgefüllt und das Sepharose-Gel fünfmal mit 1 mM HCl gewaschen und zentrifugiert (30 s, 3.600 rpm). Direkt vor der Antikörperzugabe wurde das Gel mit Kopplungspuffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3, 500 mM NaCl) gewaschen, sedimentiert (30 s, 3.600 rpm) und der Überstand verworfen. Durch Zugabe der oben genannten basischen Kopplungslösung wurde der 1D4-Antikörper während 1,5 h Inkubation bei Raumtemperatur an die Sepharose-Matrix gebunden. Dann wurde das Gel zweimal mit Kopplungspuffer gewaschen und durch Zentrifugation sedimentiert (30 s, 3.600 rpm).

Zur Blockierung verbliebener aktiver Gruppen wurde das 1D4-Gel mit 40 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgefüllt und für 2 h auf dem Nutator inkubiert. Daraufhin wurde das 1D4-Gel fünfmal abwechselnd mit Acetat-Puffer (100 mM Na-Acetat, 500 mM NaCl, pH 4,0) und Tris-HCl (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen und zweimal mit BTP-Puffer (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,8) gewaschen. Dann wurde das Gel mit letzterem Puffer aufgefüllt (1:1), zur Konservierung Natriumazid dazugegeben (Endkonzentration 0,004 % w/v) und bei 4 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurden aus der Kopplungslösung vor und nach der Kopplung des Antikörpers an die Sepharosematrix Aliquots entnommen und mittels Messung der Absorption bei 280 nm der Proteingehalt bestimmt.

Zur Ermittlung der Bindungskapazität des 1D4-Sepharose-Gels wurden WM's (siehe 2.3.2) mit ca. 5 mg Rhodopsin in 25 ml PBS mit 1 % DM (w/v) solubilisiert und mit einem Aliquot von 250 µl 1D4-Gel nach der unter 2.5.5 beschriebenen Prozedur affinitätschromatographisch aufgereinigt. Aus der Menge an gereinigten Rhodopsin ließ sich die Bindungskapazität errechnen.

### **2.5.5. Reinigung der Pigmente mittels Immuno-Affinitätschromatographie**

Die Reinigung des Rhodopsins mittels Affinitätschromatographie beruht auf der Bindung des Rezeptors an einen Antikörper (1D4), der gegen den C-Terminus des Rhodopsins gerichtet ist. Der 1D4-Antikörper ist für die Chromatographie kovalent an eine Sepharose-Matrix gebunden (Oprian et al., 1987).

Für die Solubilisierung und Reinigung von Rhodopsin aus COS-1 Zellen wurde das Detergens Dodecylmaltosid (DM) verwendet. Das Molekulargewicht von DM beträgt 510,63 g/mol und die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) ist 120 µM (Rosevear et al., 1980). Dazu wurde nach der Rekonstitution der Membranen mit Retinal das Detergens (10 %ige Stammlösung) direkt zur Zellsuspension zugegeben (Endkonzentration von 1 % DM (v/v)) und diese 2 Stunden lang auf einem

Nutator bei 4 °C inkubiert. Danach wurden nicht-solubilisierbare Bestandteile der Suspension durch Zentrifugation (3.600 rpm, 3 min) abgetrennt und der Überstand in ein 50 ml-Falcon-Zentrifugenröhrchen gegeben, in welches zuvor eine entsprechende Menge 1D4-Immuno-Affinitätsgel (Bindungskapazität ca. 0,7-1 µg Rhodopsin/µl Gel) überführt wurde.

Über Nacht wurde das Gemisch auf dem Nutator bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Abzentrifugieren des Gelmaterials bei 3.600 rpm für 2 min. Das Gelmaterial wurde nun 2 mal mit PBS-DM Puffer (0,03 % DM in PBS) und einmal mit DM-BTP-Puffer (0,03 % DM in 10 mM BTP, pH 6,0) gewaschen. Zwischendurch wurde die Suspension jeweils 2 min auf dem Nutator gemischt und 2 min bei 3.600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gelmaterial in ein 1,5 ml Polypropylengefäß überführt. Das Gelmaterial wurde nun durch Zentrifugation (14.000 rpm für 10 s) sedimentiert, der Überstand verworfen und entsprechend der erwarteten Rhodopsinkonzentration 500-1000 µl Elutionspuffer (10 mM BTP, pH 6,0, 0,03 % DM, 100 µM Rhodopsin-(1'-18')-Peptid) dazugegeben, wobei das im Elutionspuffer enthaltene Rhodopsin (1'-18')-Peptid den letzten 18 C-terminalen Aminosäuren des Rhodopsins (<sup>331</sup>DEASTTVSKTETSQVAPA<sup>348</sup>) entspricht. Nach 2-3 stündiger Inkubation der Suspension auf dem Nutator bei 4 °C wurde das Gelmaterial wieder sedimentiert (14.000 rpm für 10 s). Der Elutionsschritt wurde noch zweimal wiederholt, während die Überstände in 1,5 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mittels Ultrazentrifugation (40.000 rpm, 10 min, 4 °C, Beckmann-Rotor TL 100.3) von Gel-Rückständen befreit wurden. Die Konzentration der gewonnenen Pigmente wurde mittels UV/Vis- Spektroskopie bestimmt, die Proben lichtundurchlässig verpackt und bei -20 °C tiefgefroren.

### **2.5.6. Opsin-Reinigung**

Für Transducin-Aktivierungs-Messungen der retinalfreien rekombinanten Opsine wurden Membranen transfizierter COS-1 Zellen nach einem Protokoll von Han & Sakmar (Han und Sakmar, 2000) präpariert.

COS-1 Zellen wurden transfiziert (siehe 2.5.1) und wie in 2.5.2 beschrieben in EDTA-PBS geerntet und in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen je Röhrchen in 11 ml hypotonem Puffer D (10 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 mM EDTA, 1 Tablette Complete<sup>TM</sup>-Protease-Inhibitor je Röhrchen) resuspendiert. Die Suspension wurde durch dreimaliges Aufziehen in eine mit einer 26-Gauge Kanüle bestückten 5 ml-Spritze homogenisiert. Das Lysat wurde auf ein 10 ml Sacharose-Kissen in Puffer E (20 mM Tris-HCl, pH 6,8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, 0,1 mM PMSF) geschichtet und für 20 min zentrifugiert (Rotor Ti 50.2, 24.000 rpm, 4 °C). Die sich ausbildende Bande mit Membranen war als Grenzschicht sichtbar und wurde vorsichtig mit einer Spritze entnommen. Die entnommene Suspension wurde mit Puffer E auf 30 ml aufgefüllt, 60 min zentrifugiert (Rotor Ti 50.2, 45.000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in Puffer E gewaschen und noch einmal zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 7,5 ml Puffer E resuspendiert

(mit 5 ml-Spritze und 26-Gauge Kanüle), die Membranen in 1 ml-Aliquots geteilt, in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.5.7. Knüpfung von Disulfidbrücken durch Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen

Für Untersuchungen der Interaktion zwischen Helix-VII und Helix-8 wurde ein rekombinantes Pigment Y306C/F313C/C316S kloniert und in COS-1 Zellen exprimiert (siehe 2.5.1). Die Wechselwirkung der hydrophoben aromatischen Aminosäurereste von Tyr306 und Phe313 sollte durch Knüpfung bzw. Öffnung einer Disulfidbrücke zwischen Cystein-Resten an diesen Positionen untersucht werden. Das von Position 313 nur einen Helixturn entfernte Cys316 wurde durch ein Serin ersetzt, um diesen Aminosäure-Rest von einer möglichen Disulfid-Brückenbildung auszuschließen.

Die Oxidation der Cystein-Reste und somit die mögliche Knüpfung einer Disulfidbrücke erfolgte in Anlehnung an die von Struthers *et al.* (2000) verwendete Oxidation von SH-Gruppen durch Einbringen von Luftsauerstoff bei neutralem pH.

Das Pigment wurde ähnlich wie in 2.5.5 beschrieben aufgereinigt, allerdings wurde der Rezeptor in 2 mM Phosphatpuffer (1,88 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,12 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6,0, 0,03 % (w/v) DM) eluiert. Die im Ergebnisteil gezeigten Effekte ließen sich nicht finden, wenn der Rezeptor in BTP-Puffer (2 mM BTP, pH 6,0, 0,03 % (w/v) DM) eluiert wurde. Zur Oxidation wurde die Probe in ein 2 ml Polypropylen-Gefäß überführt, durch Zugabe einer entsprechenden Menge 100 mM Phosphatpuffer (mit 0,03 % (w/v) DM) wurde der pH-Wert auf pH 7,0 eingestellt, ein 5 mm langer Magnetrührstab hinzugefügt und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  abhängig vom Reaktionsvolumen 20-80 h im Dunkeln gerührt.

Es wurden auch Versuche unternommen, die Disulfid-Brücke durch die oft in der Literatur verwendete Oxidation mit Kupfer(II)-Phenanthrolin (Farrens *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1999) zu knüpfen, jedoch gab es Hinweise, dass durch diese Behandlung auch eine Disulfidbrücke zwischen Cys140 und Cys222 entsteht, was mit konformativen Änderungen sowie starken Änderungen der Kinetik der Rezeptor-Aktivierung verbunden ist (Lewis *et al.*, 2000).

### 2.5.8. Quantifizierung der Sulfhydryl-Gruppen

Die Bildung einer Disulfidbrücke wurde durch Titration der Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen) mit 4,4'-Dithiodipyridine (DTP) in Anlehnung an einen von der Arbeitsgruppe von Khorana (Cai *et al.*, 1997) entwickelten Assay nachgewiesen. 4,4'-Dithiodipyridine (DTP) reagiert mit einer freien SH-Gruppe zu 4-Thiopyridon, welches durch Absorption bei 323 nm (Grassetti und Murray, 1967) quantifiziert werden kann. Die Ermittlung der Anzahl von freien SH-Gruppen wurde im Wesentlichen wie von (Cai *et al.*, 1997) beschrieben durchgeführt ( $\epsilon_{\text{DTP}, 323\text{nm}} = 19.000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ).

Die zu untersuchende Rhodopsin-Probe (bzw. Rhodopsin-Mutante, siehe 2.5.7) wurde mit 1/20 (v/v) DTP in Phosphatpuffer so gemischt, dass eine Endkonzentration von  $0,5\text{ }\mu\text{M}$  Protein und  $25\text{ }\mu\text{M}$

DTP erreicht wurde. Als Referenz wurde parallel dieselbe Lösung ohne Rezeptor pipettiert. Folgend wurden die Reaktionsansätze für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Daraufhin wurde UV/Vis-spektrometrisch die Konzentration des gebildeten 4-Thiopyridons durch Messung der Absorption bei 323 nm, abzüglich des Wertes des Referenzansatzes, ermittelt.

## 2.6. Methoden zur biophysikalischen Charakterisierung der Pigmente

### 2.6.1. UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden mit einem Varian Cary 50 UV/Vis Spektrometer mit einer Auflösung von 2 nm aufgezeichnet. Die Pigmentkonzentration aufgereinigter Proben wurden direkt im Elutionspuffer gemessen (siehe 2.5.5.). Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle anderen Proben in 50 mM BTP (pH 7,5 oder pH 6,5) oder MES (pH 5,5) mit 0,03 % (w/v) DM gemessen. Pigmente mit 11-*cis*-Retinal wurden mit einer Kaltlichtquelle mittels Lichtleiter direkt in der Küvette mit orangem Licht ( $\lambda > 480$  nm, Schott GG495 und zusätzlichem Wärmefilter) für 15 s belichtet. Pigmente mit 9-dm- sowie azyklischem Retinal wurden mit kurzwelligerem Licht belichtet ( $\lambda > 460$  nm, Schott GG475).

Die Konzentration von Rhodopsin, wie auch der Rhodopsinmutanten wurde spektroskopisch mit einem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 42.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Kropf et al., 1973) bestimmt, wenn die Pigmente mit 11-*cis*-Retinal bzw. 9-dm-Retinal (siehe 2.1.4) regeneriert wurden. Zur Berechnung der Pigmentkonzentration wurden die Absorptionsmaxima bei 500 nm (11-*cis*-Retinal) bzw. 464 nm (9-dm-Retinal, Han et al., 1998) des unbelichteten Pigments verwendet.

Bei Pigmenten, welche mit azyklischem Retinal regeneriert waren, wurde ein erhöhter Extinktionskoeffizient festgestellt. Letzterer wurde generiert, indem der Quotient der

Absorptionsmaxima  $\frac{Abs_{azykl.,280nm}}{Abs_{azykl.,462nm}}$  für unbelichtete Pigmente mit azyklischem Retinal mit

$\frac{Abs_{11cis,280}}{Abs_{11cis,500}}$  für parallel aufgereinigte native Pigmente verglichen wurde. Das Maximum der

Proteinabsorption bei 280 nm sollte unabhängig vom Retinal Auskunft über die Konzentration des

gereinigten Proteins geben. Mit der Formel:  $\mathcal{E}_{azykl.} = \mathcal{E}_{11cis} * \frac{Abs_{11cis,280}}{Abs_{11cis,500}} / \frac{Abs_{azykl.,280}}{Abs_{azykl.,462}}$  wurde ein

Extinktionskoeffizient von  $\epsilon = 62.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \pm 1.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für Pigmente ermittelt, die mit azyklischem Retinal regeneriert wurden .

### 2.6.2. Fluoreszenzspektroskopische Messung der Transducin-Aktivierung

Zur Messung der zeitabhängigen Aktivierung von G-Proteinen sind verschiedene Methoden bekannt:

a) die Verfolgung der zeitlichen Änderungen der intrinsischen Fluoreszenz der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit

(nachfolgend beschrieben), b) [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien (Fawzi und Northup, 1990; Wessling Resnick und Johnson, 1987), c) cGMP-Hydrolysemessungen (Fung und Nash, 1983), sowie d) kinetische Lichtstreuungsexperimente (Bennett und Dupont, 1985; Heck und Hofmann, 1993; Heck und Hofmann, 2001; Heck et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde zur Messung der Transducin-Aktivierung die Änderungen der intrinsischen Fluoreszenz der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit nach dem Rhodopsin-katalysierten Nukleotidaustausch genutzt.

Grundlage dieses Assays ist die von Higashijima *et al.* (1987) beschriebene Änderung des Fluoreszenzemissionsspektrums der  $G_{\alpha}$ -Untereinheit, wenn das von ihr gebundene GDP gegen GTP oder GTP $\gamma$ S (nicht hydrolysierbares GTP-Analogon) ausgetauscht wird, z.B. im Verlauf der katalytischen Aktivierung. Von Phillips *et al.* (1988) wurde dieser Assay erstmals auf das Rhodopsin-Transducin-System angewendet.

Für den verwendeten Assay wurde die von Ernst *et al.* (2000) und Meyer *et al.* (2000) vorgeschlagene Abfolge leicht modifiziert. Da die vermessenen Pigmente sehr verschiedene Zerfallsraten (nach der Belichtung) hatten, wurde die Transducin-Aktivierung nicht durch Zugabe von GTP $\gamma$ S gestartet, sondern durch die Belichtung selbst. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 300 nm, die Detektion des emittierten Lichts bei 345 nm. Die Integrationszeit pro Messpunkt betrug 2 s. Die Bandbreite des Anregungslichts wurde mit den am Gerät befindlichen Spalten auf 5,4 nm, die des Emissionslichts auf 7,2 nm eingestellt. Mittels Thermostat wurde die Messtemperatur auf 20 °C eingestellt. Das Messvolumen betrug 650  $\mu\text{l}$  und die Probenzusammensetzung war: 2 nM Pigment, 250 nM Gt und 5  $\mu\text{M}$  GTP $\gamma$ S in 20 mM BTP (pH 7,5), 130 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,01 % DM (w/v). Die Probe wurde während der gesamten Messung gerührt.

Hervorzuheben ist, daß der Assay sehr stark von der DM-Konzentration abhängig ist. Eine Erhöhung der DM-Konzentration auf 0,012 % bewirkte eine Verringerung der Aktivierungsrate (Nukleotidaustausch/Zeit) um ca. 75 %. Bei geringerer Konzentration erhöhte sich die Rate leicht, um jedoch eine ausreichende Solubilisierung des Rhodopsins zu gewährleisten (CMC = 120  $\mu\text{M}$  = 0,006 %, siehe 2.5.5) wurde analog zu den oben erwähnten Arbeiten bei einer DM-Konzentration von 0,01 % gemessen.

Für eine Messung wurde die Probe zunächst für 2 min im Fluoreszenzspektrometer temperiert. Dann wurde für 20 s der Anfangswert der initialen Fluoreszenz des noch nicht aktivierten Transducins aufgezeichnet. Durch Belichtung der Probe mittels einer faseroptischen Kaltlichtquelle, die mit einem Langpass-Filter ( $\lambda > 480$  nm für Pigmente mit 11-*cis*-Retinal,  $\lambda > 460$  nm für Pigmente mit 9-*dm*- bzw. azyklischem Retinal) und einem Wärmefilter ausgestattet war, wurde die Gt-Aktivierung gestartet. Optional wurde nach ca. 4 Minuten 6  $\mu\text{l}$  Wildtyp-Rhodopsin (10 nM Endkonzentration) zur Probe pipettiert, um den Nukleotidaustausch zu vervollständigen.

Zum Vergleich der Gt-Aktivierungsraten der einzelnen Pigmente unter sonst gleichen Bedingungen wurde die Anfangssteigung nach der Belichtung bestimmt. Die Aktivierungsrate wurde mittels linearer

Regression an die ersten Messpunkte, die 15 % der Amplitudenzunahme entsprechen, mit dem Programm *Sigma Plot* (Version 2000, Jandel Scientific) errechnet. (100 % Amplitudenzunahme entsprachen abhängig von der Transducin-Charge einer maximalen Fluoreszenzänderung von 25-30 %).

### 2.6.3. Messung des Meta-II-Zerfalls mittels Fluoreszenz-Spektroskopie

Grundlage dieses Assays ist die von Farrens & Khorana (1995) gefundene Unterdrückung (*Quenching*) einer intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz im Rhodopsin Grundzustand. Aus dem nach Belichtung von Rhodopsin gebildeten Meta-II wird durch hydrolytische Spaltung der Retinyliden-Schiffbase all-*trans*-Retinal aus der Bindungstasche freigesetzt. Dadurch wird die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt und ein deutlicher Fluoreszenzanstieg ist messbar (siehe Schädel et al., 2003).

Der Meta-II-Zerfall wurde wie beschrieben durchgeführt (Farrens und Khorana, 1995). Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 295 nm, die Detektion des emittierten Lichts bei 330 nm. Die Messpunkte wurden in 30 s Intervallen aufgenommen und über 2 s integriert. Die Bandbreite des Anregungslichts betrug 0,36 nm, die des Emissionslichts 7,2 nm. Mittels Thermostat wurde die Messtemperatur auf 20 °C eingestellt. Das Messvolumen betrug 90 µl und es wurden 500 nM Pigment in 50 mM BTP (pH 7,5), 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,03 % DM (w/v) vermessen. Die Probe wurde nicht gerührt.

Für eine Messung wurde die Probe zunächst für 2 min im Fluoreszenzspektrometer temperiert. 15 s nach Aufnahme des ersten Messpunktes wurde die Probe für 10 s mittels faseroptischer Kaltlichtquelle, die mit einem Langpass-Filter (Schott GG495-Filter für Pigmente mit 11-*cis*-Retinal sowie Schott GG475-Filter für Pigmente mit 9-*dm*- bzw. azyklischem Retinal) und einem Wärmefilter ausgestattet war, belichtet. Das Fluoreszenzsignal wurde bis zur Einstellung eines gleichbleibenden Maximalwertes aufgezeichnet.

Es wurde gezeigt, dass der Meta-II-Zerfall von Rhodopsin einer Zerfallsreaktion erster Ordnung folgt (Farrens und Khorana, 1995) und daher an folgende Exponentialfunktion angepasst werden kann:

$$I(t) = I_0 + a(1 - e^{-kt})$$

(mit:  $I$  = Intensität des emittierten Lichtes,  $I_0$  = initiale Intensität des emittierten Lichtes,  $a$  = Amplitude,  $k$  = Geschwindigkeitskonstante,  $t$  = Zeit).

Die Daten wurden mit dem Programm *Sigma Plot* (Version 2000, Jandel Scientific) an die genannte exponentielle Funktion angepasst und die Halbwertszeit des Zerfalls berechnet. Zur Auswertung wurden nur Daten verwendet, die sich mit einem Korrelations-Koeffizienten ( $R^2$ -Wert) von mehr als 98 % mittels Regression an die oben gegebene Gleichung anpassen ließen.

#### 2.6.4. FTIR-Spektroskopie

FTIR-Spektren wurden mit einem Bruker IFS/66v-Spektrometer, ausgerüstet mit einem MnCdTe- (MCT) Detektor aufgezeichnet. Die Vorbereitung von Membranproben erfolgte nach Bartl *et al.* (2001). 40  $\mu$ l einer 100 mM Suspension von hypoton gewaschenen Membranen wurde mit 100 000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde auf eine temperierbare Transmissionsküvette bestehend aus zwei BaF<sub>2</sub>-Fenstern und einem 3  $\mu$ m starken Polytetrafluoroethylene-Dichtungsring transferiert. Für "Extra Meta-II"-Messungen in Anwesenheit von Gt $\alpha$ (340-350)-Peptid (siehe 3.7) wurde das Membran-Pellet in Puffer mit 10 mM Gt $\alpha$ (340-350)-Peptid resuspendiert und noch einmal zentrifugiert (nach Bartl *et al.*, 2000). Messungen bei tiefen Temperaturen wurden mittels Optistat DN Kryostat (gekühlt mit flüssigem Stickstoff, Oxford Instruments) durchgeführt.

Für Messungen an gereinigten rekombinanten Pigmenten in Detergens (Dodecyl Maltosid) wurden 30  $\mu$ l einer aufkonzentrierten (ca. 100  $\mu$ M) Rezeptor-Suspension im Dunkeln direkt auf das Küvetten-Fenster aufgetrocknet und für die Messung mit 2  $\mu$ l 50 mM BTP-Puffer rehydriert.

Vor jeder Messung wurde die Probe für ca. 30 min im Spektrometer äquilibriert. Differenzspektren wurden generiert durch Subtraktion der Dunkel-Spektren von den Spektren nach Belichtung. Es wurden jeweils 4 x 128 Spektren aufgezeichnet und gemittelt. Die Probe wurde für 10 s mittels 150 W Kaltlichtquelle (Spindler & Hoyer), die mit einem Wärmefilter (Schott KG1) und einem Langpass-Filter (Schott GG495 für Pigmente mit 11-*cis*-Retinal, Schott GG475 für Pigmente mit 9-*dm*- bzw. azyklischem Retinal) ausgestattet war, belichtet.

Mittels FTIR-Spektroskopie können Aussagen zu strukturellen Eigenschaften eines Proteins getroffen werden. Für die Charakterisierung der Photointermediate des Rhodopsins werden FTIR-Differenzspektren aufgezeichnet, die nur die lichtabhängigen Änderungen bezogen auf den Rhodopsin-Grundzustand widerspiegeln. Die Interpretation solcher Differenzspektren ist sehr detailliert in der Literatur beschrieben (Bartl *et al.*, 2000; Palings *et al.*, 1987; Siebert, 1995; Siebert *et al.*, 1983). Nachfolgend wird ein Überblick über die wesentlichen Bereiche im FTIR-Differenzspektrum gegeben.

Der sogenannte Fingerprintbereich zwischen 1100 und 1300  $\text{cm}^{-1}$  spiegelt Valenzschwingungen (auch "Streckschwingungen" genannt) der C-C-Einfachbindungen des Chromophors wieder, die untereinander und mit C-H-Biegeschwingungen koppeln. Aus der Bandenstruktur können Rückschlüsse auf die Konformation des Chromophors gezogen werden.

Der Bereich zwischen 900 und 1000  $\text{cm}^{-1}$  wird als HOOP-Bereich (HOOP für "*hydrogen out of plane*") bezeichnet. Absorptionen in diesem Bereich gelten als Maß für die Verdrillung der Polyenkette des Retinals an C-C Einfachbindungen und somit für die Verspannung des Retinals in der Retinalbindungstasche.

Eine Bande bei  $1657\text{ cm}^{-1}$  ist charakteristisch für die C=N-Valenzschwingung der protonierten Schiffbase.

Die strukturellen Änderungen des Proteingerüsts kommen in speziellen Bereichen, die als Amid-I und Amid-II bezeichnet werden, zum Ausdruck. Sie resultieren vorwiegend aus Schwingungsmoden der Peptidbindungen. Der Amid-I-Bereich zwischen  $1620$  und  $1690\text{ cm}^{-1}$  charakterisiert C=O-Valenzschwingungen im Protein, wird jedoch auch von C=C-Valenzschwingungen des Retinal überlagert. Der Bereich um  $1550\text{ cm}^{-1}$  ist für N-H-Biegeschwingungen charakteristisch und bildet zusammen mit C-N-Schwingungen (bei ca.  $1490\text{ cm}^{-1}$ ) den Amid II Bereich. Die Größe dieser Amid-Banden in den Differenzspektren gilt als Maß für Änderungen in der Proteinkonformation.

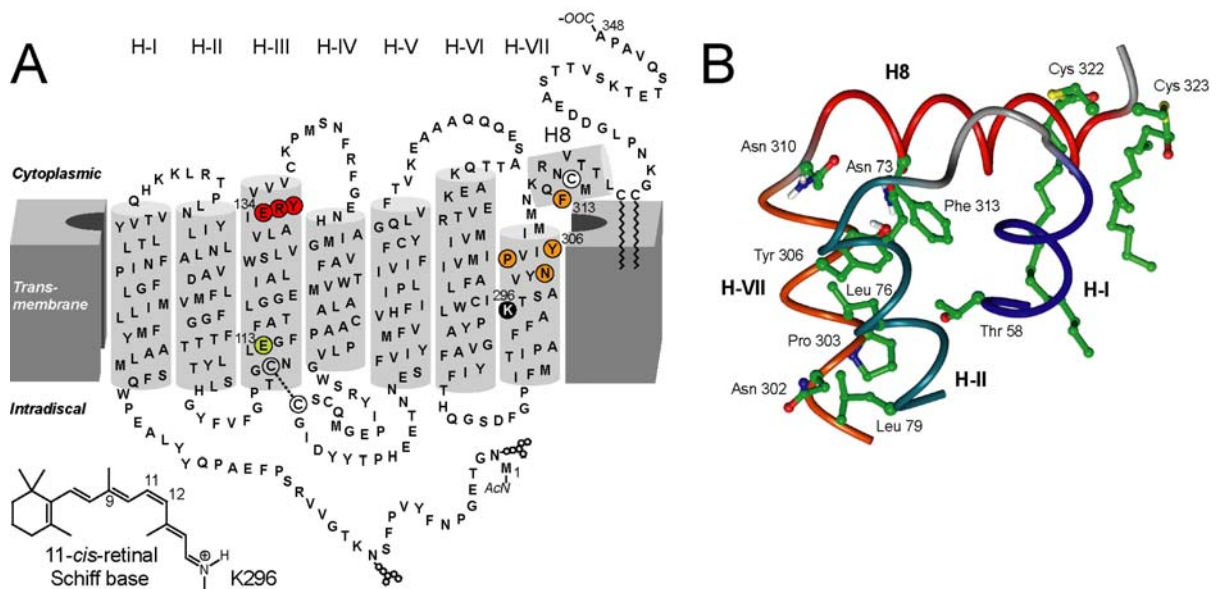
Ergänzend ist der Bereich zwischen  $1700$  und  $1770\text{ cm}^{-1}$  zu erwähnen, in dem die C=O-Streckschwingungen von protonierten Carboxylgruppen beobachtet werden. Dies ist der Hauptbereich für die Beurteilung des Aktivierungszustandes von Rhodopsin. Die Ausbildung einer aktiven Rezeptorkonformation geht mit stark ausgeprägten Banden in dieser Region einher.



### 3. DIE NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-REGION

Im G-Protein-gekoppelten Rezeptor Rhodopsin werden die Transmembran-Helix VII und die cytoplasmatische achte Helix durch ein hochkonserviertes Motiv, das NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv miteinander verknüpft. Die einzelnen Aminosäuren dieses Motivs wurden durch Alanin sowie andere Aminosäuren ersetzt. Durch die Charakterisierung der veränderten Rezeptoren lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion des NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motifs ziehen, die nachfolgend beschrieben werden.

In Abb. 13A ist ein Modell der Sekundärstruktur von bovinem Rhodopsin dargestellt. In der von Palczewski *et al.* (2000) gelösten Kristallstruktur wurde eine helikale Struktur der vierten cytoplasmatischen Schleife festgestellt. Diese parallel zur Membran verlaufende achte Helix ist in Richtung des cytoplasmatischen Endes durch die palmitylierten Reste Cys322 und Cys323 begrenzt, welche den C-Terminus noch einmal in der Membran verankern.



**Abb. 13: Modell des Rinderrhodopsins**

**A)** Modell der Sekundärstruktur von bovinem Rhodopsin mit den konservierten Motiven D(E)RY (rot) und NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F (orange). Der Chromophor 11-*cis*-Retinal ist an Lys296 (schwarz) in H-VII mittels protonierter Schiffbase gebunden, welche durch das Gegenion Glu113 (grün) stabilisiert wird. **B)** Dreidimensionales Modell der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region und benachbarter Helices (H-I, H-II und H8) basierend auf der Kristallstruktur von Rhodopsin (1HZX, Teller *et al.*, 2001)

In der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin (Abb. 13B) ist zu erkennen, dass die hydrophoben aromatischen Ringe von Tyr306 und Phe313 fast planar übereinander liegen und es kann vermutet werden, dass diese Interaktion eine strukturelle Funktion hat.

### 3.1. Sequenz-Vergleich

In einem Vergleich der Sequenz von GPCRs aus der Klasse der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren zeigt sich ein hochkonserviertes NPxxY Motiv. Eine Auswahl eines Sequenz-Abgleichs ist in Abb. 14 gezeigt.

290	I P A F F A K T S A V Y N P P V I Y I M M N K Q F R N C M V T T L - C C G K	RHODOPSIN, bovine (P02699)
290	I P A F F A K S A A I Y N P P V I Y I M M N K Q F R N C M L T T I - C C G K	RHODOPSIN (P08100)
306	L P A Y F A K S A T I Y N P P V I Y V F M N R Q F R N C I L Q L F - G K K V	RED-SENSITIVE OPSIN (P04000)
306	L P A F F A K S A T I Y N P P V I Y V F M N R Q F R N C I L Q L F - G K K V	GREEN-SENSITIVE OPSIN (P04001)
287	I P S F F S K S A C I Y N P P I I Y C F M N K Q F Q A C I M K M V - C G K A	BLUE-SENSITIVE OPSIN (P03999)
402	L G Y W L C Y V N S T I N P P M C Y A L C N K A F R D T F R L L L L C - R W	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE R. M1 (P11229)
424	I G Y W L C Y I N S T I N P P A C Y A L C N A T F K K T F K H L L L M C - H Y	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE R. M2 (P08172)
528	L G Y W L C Y I N S T V N P P V C Y A L C N K T F R T T F K M L L L C - Q C	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE R. M3 (P20309)
437	I G Y W L C Y V N S T I N P P A C Y A L C N A T F K K T F R H L L L L C - Q Y	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE R. M4 (P08173)
479	L G Y W L C Y V N S T V N P P I G Y A L C N R T F R K T F K M L L L C - R W	MUSCARINIC ACETYLCHOLINE R. M5 (P08912)
310	I V F W L G Y L N S C I N P P I Y P C S S Q E F K K A F Q M V L R I - Q C	ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (P35348)
262	E D T L S S T K A K G H N P R S I A V - K L K F S R E K K A A K T L G	ALPHA-1B ADRENERGIC RECEPTOR (P35368)
386	V I F W L G Y F N S C V N P P L I Y P C S S R E F K R A F L R L L R C - Q C	ALPHA-1D ADRENERGIC RECEPTOR (P25100)
410	F F F W F G Y C N S S L N P P V I Y T I F N H D F R R A F R K K I L C R - G D	ALPHA-2A ADRENERGIC RECEPTOR (P08913)
410	F F F W I G Y C N S S L N P P V I Y T I F N Q D F R R A F R R I L C R - P W	ALPHA-2B ADRENERGIC RECEPTOR (P18089)
420	F F F W I G Y C N S S L N P P V I Y T V F N Q D F R R P S F K H I L F R - R R	ALPHA-2C-1 ADRENERGIC RECEPTOR (P18825)
417	F F F W I G Y C N S S L N P P V I Y T V F N Q D F R R S F K H I L F R - R R	ALPHA-2C-2 ADRENERGIC RECEPTOR (P35369)
361	F F N W L G Y A N S A F N P P I Y Y C - R S P D F R I A F Q E L L C L R R S	BETA-1 ADRENERGIC RECEPTOR (P08588)
310	L L N W I G Y V N S G F N P P I Y Y C - R S P D F R I A F Q E L L C L R R S	BETA-2 ADRENERGIC RECEPTOR (P07550)
330	A L N W L G Y A N S A F N P P I Y Y C - R S P D F R S A F R R L L C R C G R	BETA-3 ADRENERGIC RECEPTOR (P13945)
315	V F V W F G W A N S S L N P P I Y Y A - F N A D F Q K V F A Q L L G C Y R L	D(1A) DOPAMINE RECEPTOR (P21728)
343	V F V W F G W A N S S L N P P I Y Y A - F N A D F Q K V F A Q L L G C S H F	D(1B) DOPAMINE RECEPTOR (P21918)
410	A F T W L G Y V N S A V N P P I Y Y T T F N I E F R K A F L K I L H - - C	D(2) DOPAMINE RECEPTOR (P14416)
367	A T T W L G Y V N S A L N P P V I Y T T F N I E F R K A F L K I L S - - C	D(3) DOPAMINE RECEPTOR (P35462)
432	A V T W L G Y V N S A L N P P V I Y T V F N A E F R N V F R K A L R A - C C	D(4) DOPAMINE RECEPTOR (P21917)
452	F T I W L G Y I N S T L N P P L I Y A L C N R D F R T G Y Q Q L F C C - R L	HISTAMINE H1 RECEPTOR (P35367)
272	I V L W L G Y A N S A L N P P L I Y A A L N R D F R T G Y Q Q L F C C - R L	HISTAMINE H2 RECEPTOR (P25021)
396	T S F W L L W A N S A V N P P V L Y P L C H S D F R R A F T K L L C P - Q K	HISTAMINE H3 RECEPTOR (Q9YSN1)
384	I I N W L G Y S N S S L N P P V I Y Y A Y F N K D F Q N A F K K I I K C - K F	5-HYDROXYTRYPTAMINE 1A R. (P08908)
286	I T I C I A Y F N N C L N P P L F Y A F I G K K F R Y F L Q L L K Y I P	TYPE-1A ANGIOTENSIN II R. (P30556)
298	A T E I L G I L N S C L N P P L I Y A F I G Q K F R H G L K I L A I H G	INTERLEUKIN-8 RECEPTOR B (P25025)
285	V T E V I A Y T H C C V N P P V I Y A F V G E R F R S K Y L R Q L F H R R V	C-C CHEMOKINE R. TYPE 1 (P32246)
289	V T E T L G M T H C C I N P P I Y A F V G E K F R S L Y H I A L G C R I	C-C CHEMOKINE R. TYPE 2 (P41597)
285	V T E V I A Y S H C C M N P P V I Y A F V G E R F R K Y L R H F F H R H L	C-C CHEMOKINE R. TYPE 3 (P51677)
284	V T E I I S F T H C C V N P P V I Y A F V G E K F K K H L S E I F Q K S C	C-C CHEMOKINE R. TYPE 8 (P51685)
302	V T S G L G Y M H C C L N P P L L Y A F V G V K F R E R M W M L L R L L G	C-X-C CHEMOKINE R. TYPE 3 (P49682)
304	L C H L T A M I S T C V N P P I F Y G F L N K N F Q R D L Q F F N F C D	NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 1 (P25929)
302	L C I A L G Y A N S S L N P P V L Y A F L D E N F K R C F R Q L C R K P - C	DELTA-TYPE OPIOID RECEPTOR (P41143)
314	F C I A L G Y T N S S L N P I L Y A F L D E N F K R C F R D F C F P L - K	KAPPA-TYPE OPIOID RECEPTOR (P41145)
272	I A I F L T H G N S A M N P I V Y A F R I Q K F R V T F L K I W N D H F	ADENOSINE A1 RECEPTOR (P30542)

**Abb. 14: Aminosäure-Sequenz-Vergleich der NPxxY Region von bovinem Rhodopsin mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse A (Rhodopsin-ähnliche GPCRs).**

Der Vergleich wurde mit dem Programm *Megalign* (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) mit der Methode "Clustal V" durchgeführt und zeigt ein konserviertes NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv (rot und gelb hinterlegt). Die Sequenzen der Proteine sind mittels NCBI Protein-Datenbank zugänglich (jeweilige NCBI-Kodierung in Klammern angegeben). Die Aminosäuren sind als Buchstabensymbol, die jeweilige Position direkt vor der Sequenz angegeben.

Der Sequenz-Abgleich zeigt ein konserviertes NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motif. Die Aminosäuren Asn302, Pro303 und Tyr306 gehören zum klassischen NPxxY-Motiv (Probst et al., 1992). In der Kristallstruktur von Rhodopsin (PDB Einträge 1F88, 1HZX, 1U19) ist eine hydrophobe Wechselwirkung (siehe Abb. 13) zwischen den aromatischen Seitenketten von Tyr306 (rot hinterlegt) und Phe313 (gelb) zu erkennen. Weiterhin gibt es direkt hinter Phe313 ein weniger konserviertes Arg314 (blau) sowie eine Helixwindung danach sehr oft ein weiteres Phe-Arg(Lys)-Paar.

Mutationen in der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region haben Auswirkungen auf die Rezeptor-Expression, die Affinität zum Liganden, die Rezeptor-Sequestration, die Bindung zum heterotrimeren G-Protein, sowie zu den kleinen G-Proteinen ARF (*ADP-ribosylation factor*) und RhoA (Barak et al., 1995; Mitchell et al., 1998; Prioleau et al., 2002; Wess et al., 1993). Zudem wird die hydrophobe Region unterhalb der achten Helix als Austrittsstelle (*Exit-Site*) des all-*trans*-Retinals beim Zerfall des Retinal-Opisin-Komplexes diskutiert (Schädel et al., 2003).

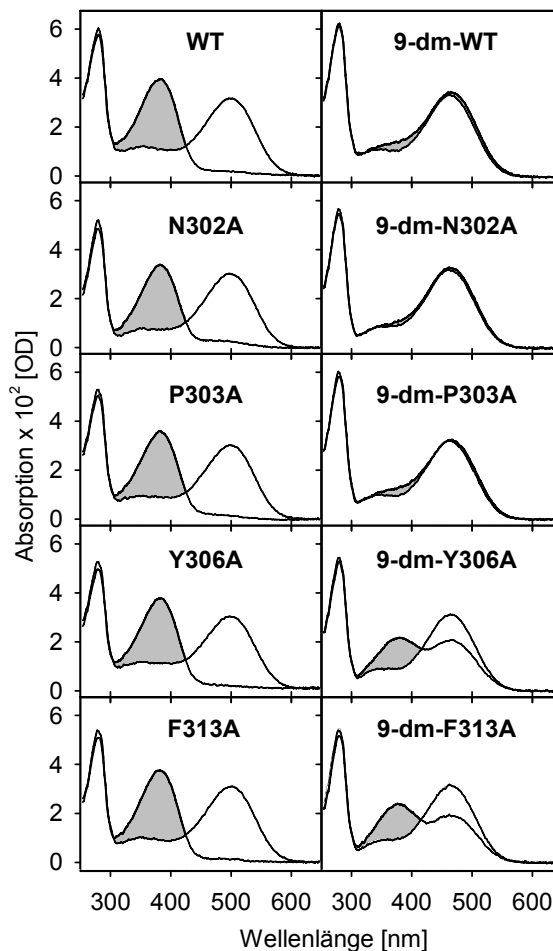
### 3.2. Untersuchung der rekombinanten Pigmente mittels UV/Vis-Spektroskopie

Verschiedene Pigmente wurden hergestellt, bei denen Aminosäuren im NPxxY-Motiv (Helix VII) sowie Phe313 in der cytoplasmatischen Helix 8 gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die Opsine wurden in COS-1 Zellen exprimiert und entweder mit dem nativen Chromophor 11-*cis*-Retinal oder dem 9-demethyl-Analogon (9-dm-Retinal, siehe Abb. 10) regeneriert. Die Pigmente wurden solubilisiert und mittels 1D4-Immuno-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Absorptionsspektren vor und direkt nach Belichtung sind in Abb. 15 gezeigt.

Nach der Belichtung stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Meta-I und Meta-II ein, welches durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums abhängig vom Protonierungszustand der Schiffbase charakterisiert ist (Hofmann, 2000).

Alle Pigmente mit dem nativen Chromophor zeigten Absorptionsspektren, die dem Wildtyp sehr ähnlich sahen. Das Dunkelabsorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 500 nm (Grundzustand mit 11-*cis*-Retinal) sowie ein Absorptionsmaximum bei 380 nm nach Belichtung (aktive Meta-II-Konformation) zeigten, dass die Retinal-Bindungsstelle nicht durch eine der Mutationen gestört wurde. Der Anteil inaktiver Meta-I-Spezies ( $\lambda_{\max} = 478 \text{ nm}$ ) war marginal. Dies ist der starken agonistischen Wirkung des all-*trans*-Retinals zuzuschreiben, sowie der Solubilisierung der Pigmente in Dodecylmaltosid, welche die Bildung der aktiven Meta-II-Konformation des Rezeptors erleichtert (Arnis und Hofmann, 1993).

Um jedoch einen möglichen Effekt der Mutationen auf das Gleichgewicht zwischen inaktiver und aktiver Rezeptorkonformation zu detektieren, wurden die Pigmente mit 9-dm-Retinal regeneriert, einem Analogon des 11-*cis*-Retinals, welches durch das Fehlen der Methyl-Gruppe an C-9 nur eine schwache agonistische Wirkung beim Wildtyp-Rezeptor zeigt. Die veränderte Interaktion mit Aminosäureresten der Retinalbindungstasche wird durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Dunkel-Konformation des 9-dm-Wildtyp-Pigments auf ca. 464 nm deutlich (gegenüber 500 nm bei Rhodopsin). Durch das Fehlen der



**Abb. 15: Spektren der gereinigten rekombinanten Pigmente**

Die Opsine wurden mit 11-*cis*-Retinal (links) oder mit 9-dm-Retinal (rechte Spalte) regeneriert. Die Spektren wurden vor (nicht schattiert) bzw. nach Belichtung (grau schattiert) bei RT und pH 7,5 gemessen

Methylgruppe am C-9 Atom des Retinals werden die zur Bildung der aktiven Meta-II Konformation nötigen Protonentransferreaktionen (siehe 0) stark eingeschränkt. Dadurch bleibt das Gleichgewicht zwischen inaktivem 9-dm-Meta-I und der aktiven 9-dm-Meta-II-Konformation weit auf Seiten der 9-dm-Meta-I Konformation, und nur eine kleine Fraktion der Pigmente erreicht die 9-dm-Meta-II-Konformation (Meyer et al., 2000; Vogel et al., 2000). Dies ist durch eine leichte Erhöhung der Absorption bei ca. 380 nm gekennzeichnet. Das Absorptionsmaximum von 466 nm entspricht Meta-I.

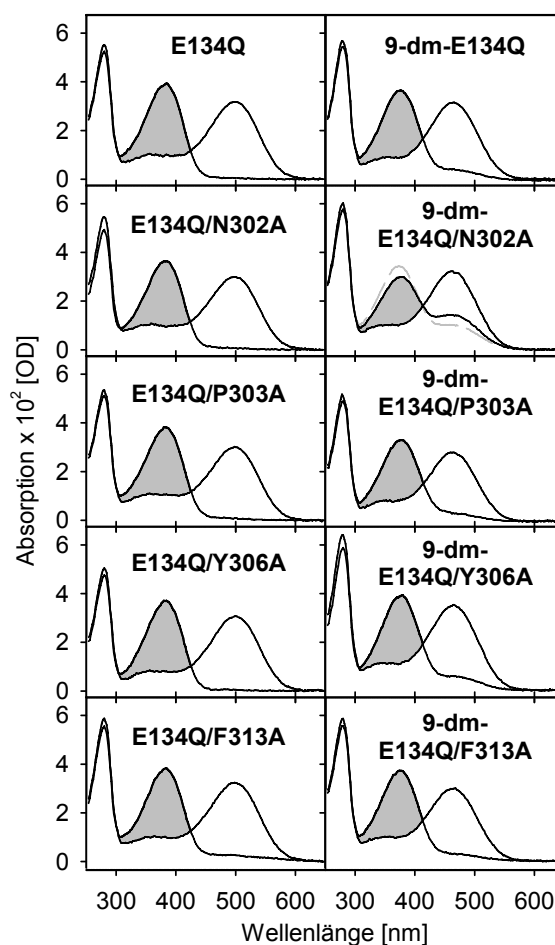
Die UV/Vis-Spektren der 9-dm-Mutanten-Pigmente vor Belichtung sind dem des 9-dm-Wildtyps vergleichbar. Nach Belichtung der Pigmente gibt es allerdings Unterschiede. 9-dm-N302A und 9-dm-P303A zeigen ein ähnliches Verhalten wie 9-dm-Wildtyp, wogegen bei 9-dm-Y306A sowie 9-dm-F313A eine erhöhte Fraktion des 9-dm-Meta-II-Photoprodukts beobachtet wurde.

### 3.3. Auswirkung einer zusätzlichen E134Q-Mutation im hochkonservierten D(E)RY-Motiv

Die herausragende Rolle des D(E)RY-Motivs am cytoplasmatischen Ende der Helix III wurde unter 1.3.2 hervorgehoben. Der Austausch von Glu134 gegen Glutamin (E134Q-Mutation) bewirkt, dass die beschriebene Protonenaufnahme in der cytoplasmatischen Domäne des Rhodopsins bereits vorweggenommen ist (Fahmy et al., 2000). Bei dem so veränderten Rezeptor wird die aktive Meta-IIb Konformation nach der Belichtung stark favorisiert, auch wenn Opsin mit dem schwachen (partiellen) Agonisten 9-dm-Retinal statt mit dem nativen 11-*cis*-Retinal regeneriert wurde (Meyer et al., 2000).

In Abb. 16 sind die Auswirkung der E134Q-Mutation bzw. der zusätzlichen E134Q-Mutation in den schon vorgestellten rekombinanten Rezeptoren bezüglich des veränderten Meta-I/Meta-II-Gleichgewichts dargestellt.

Anhand der UV/Vis-Spektren ist zu erkennen, dass die Wirkung des partiellen Agonisten 9-dm-Retinal durch die Mutation fast vollständig aufgehoben wird. Ähnlich der E134Q-Mutante ist bei den betrachteten Doppelmutanten zu erkennen, dass die zusätzliche Mutation den fast kompletten Übergang zur Meta-II-Konformation nach Belichtung bewirkte, auch bei den Pigmenten, die anstelle des nativen Chromophors 11-*cis*-Retinal das 9-dm-Retinalanalogon enthielten. Die Bildung von 9-dm-Meta-II wird bei der E134Q/N302A-Mutante bei höherem pH erhöht (gestrichelte Linie). Dies könnte bedeuten, dass die N302A-Mutation eine Reprotonierung der Schiffbase von 9-dm-Meta-II bewirkt (näheres zur Schiffbase-Reprotonierung siehe 3.6). Die Auswirkungen der zusätzlichen E134Q-Mutation auf die Transducin-Aktivierung sind unter 3.4.3 beschrieben.



**Abb. 16: Effekt der zusätzlichen E134Q-Mutation auf das Meta-I/Meta-II-Gleichgewicht der Alanin-Austauschmutanten**

Die Opsine wurden mit 11-*cis*-Retinal (linke Spalte) oder mit 9-dm-Retinal (rechte Spalte) regeneriert. Die Spektren wurden vor (nicht schattiert) bzw. nach Belichtung (grau schattiert) bei RT und pH 7,5 aufgezeichnet. Die gestrichelte Linie bei 9-dm-E134Q/N302A zeigt das Spektrum bei pH 8,5 nach Belichtung.

### 3.4. Fluorometrische Messung der Transducin-Aktivierung

Grundlage des verwendeten Assays ist die Änderungen der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz, die bei der Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen auftritt. Dabei kommt es in der Nukleotid-Bindungstasche der G $\alpha$ -Untereinheit zum Austausch des Nukleotids GDP gegen GTP bzw. GTP $\gamma$ S (siehe 1.4.2) (Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)), einem nicht-hydrolysierbaren Analogon des GTP. Außerdem kann die GDP-gebundene G $\alpha$ -Untereinheit durch Zugabe von Aluminiumfluorid (AlF $_4^-$ ) aktiviert werden, wobei AlF $_4^-$  von der Nukleotid-Bindungstasche zusätzlich zum GDP aufgenommen wird und die  $\gamma$ -Phosphat-Gruppe des GTP simuliert (Ernst et al., 2000; Watson und Arkin, 1994). Die Struktur der GDP-gebundenen wie auch der aktiven G $\alpha$ -Untereinheit ist in Abb. 8 dargestellt. Im Fall des Transducins (Gt) ist der intrinsische Fluoreszenz-Sensor die Trp207-Seitenkette in der G $\alpha$ -Untereinheit (Faurobert et al., 1996).

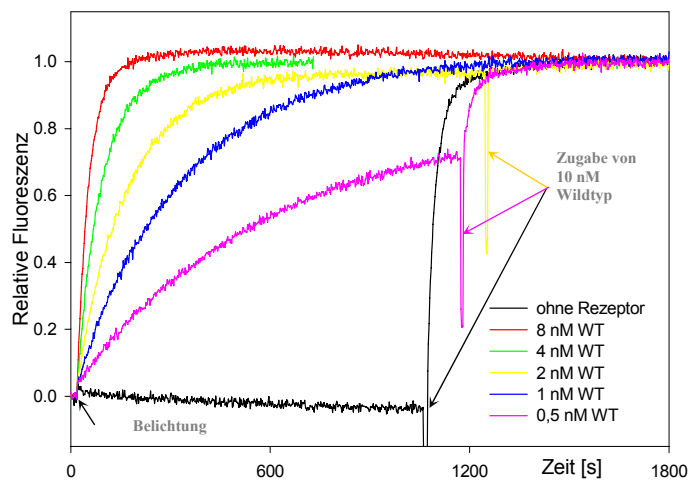
Der Nukleotidaustausch und die damit verbundene Dissoziation der G $\alpha$  und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten geht mit einer messbaren Erhöhung der intrinsischen Fluoreszenz des Transducins von etwa 20-30 % einher. Diese Fluoreszenzänderung kann daher als Monitor der Gt-Aktivierung genutzt werden.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Änderung der Fluoreszenzintensität des mit Aluminiumfluorid aktivierten Gt bei dem hier genutzten Aktivierungsassay etwa 5 % geringer war, als bei Aktivierung mit GTP $\gamma$ S.

#### 3.4.1. Optimierung des fluorometrischen Gt-Aktivierungsassays

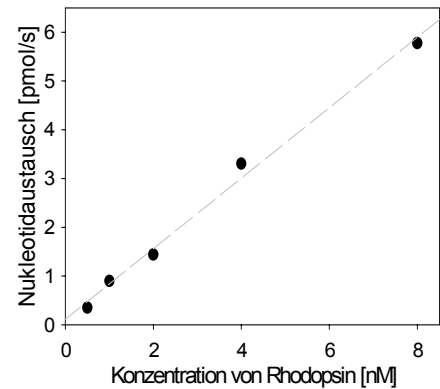
Wie bereits unter 2.6.2 beschrieben, wurde der in früheren Arbeiten (Ernst et al., 2000; Meyer et al., 2000) dargestellte Gt-Aktivierungsassay leicht verändert. Um den sehr verschiedenen Zerfallsraten der rekombinanten Pigmente nach dem Belichten der Probe Rechnung zu tragen, wurde die Transducin-Aktivierung nicht durch Zugabe des Nukleotids GTP $\gamma$ S gestartet, sondern durch die Lichtaktivierung der Pigmente selbst. Dabei war zu beachten, dass der Rezeptor bei dem vorliegenden Versuchsaufbau geringfügig durch das Messlicht aktiviert wurde, wodurch ein geringer katalytischer Umsatz des G-Proteins erfolgte. Da die Probe aber ohnehin 20 Sekunden nach Beginn der Messung mit Orangelicht vollständig gebleicht wurde, kann dieser Effekt vernachlässigt werden.

In Abb. 17 ist die Änderung der Transducin-Fluoreszenz aufgrund der GTP $\gamma$ S Aufnahme in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Wildtyp-Rhodopsin dargestellt.



**Abb. 17: Titration der Rhodopsin-Konzentration im fluorometrischen Gt-Aktivierungsassay**

Die Kurven wurden auf den Anfangswert, sowie auf das Endniveau normiert. Das Messvolumen betrug 1000  $\mu$ l, es wurde bei 20 °C gemessen. Probenzusammensetzung: 250 nM Gt und 5  $\mu$ M GTP $\gamma$ S in 20 mM BTP (pH 7,5), 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,01 % DM (w/v).



**Abb. 18: Graphische Darstellung der Gt-Aktivierungsrate in Abhängigkeit von der Rhodopsinkonzentration**

Die Aktivierungsrate wurde mittels linearer Regression an die Messpunkte, die den ersten 15 % des Gesamtfluoreszenzanstiegs entsprechen, ermittelt. Gesamtmenge aktivierbares Transducin: 250 pmol.

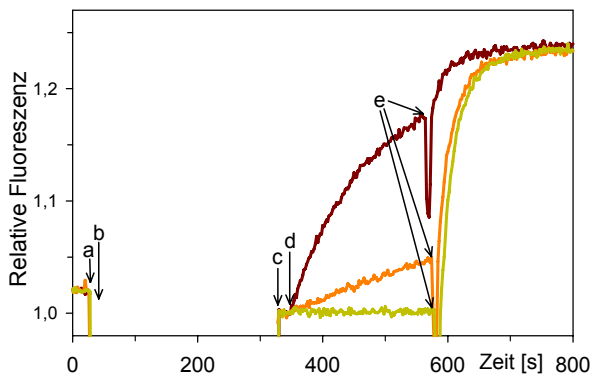
Transducin, Rhodopsin und GTP $\gamma$ S wurden in der Küvette vorgelegt (GTP $\gamma$ S im Überschuss) und 2 min inkubiert. Zu Beginn der Messung wurde für 20 Sekunden der Anfangswert der Fluoreszenz der unbelichteten Probe ermittelt. Dann wurde die Transducin-Aktivierung durch das Belichten der Probe gestartet. Um den Gesamtpool des aktivierbaren G-Proteins zu ermitteln, wurde nach ca. 20 min zusätzlich Rezeptor (Endkonzentration 10 nM) dazu pipettiert. Die Probe wurde bei 300 nm angeregt und das emittierte Licht wurde bei einer Wellenlänge von 345 nm detektiert.

Mit einer Gesamtmenge von 250 pmol Transducin (1000  $\mu$ l  $\times$  250 nM) kann aus den Anfangsanstiegen der Fluoreszenzintensitätsänderung die Aktivierungsrate ermittelt werden.

In Abb. 18 ist dargestellt, dass die Aktivierungsrate im gewählten Messbereich von der Rhodopsinkonzentration linear abhängig ist. Bei einer Rhodopsinkonzentration von 2 nM Wildtyp-Rhodopsin wurde für dieses Beispiel eine Anfangs-Rate des Nukleotidaustausches von etwa 1,5 pmol/s ermittelt. Die Aktivierungsrate variierte geringfügig bei verschiedenen Chargen von aufgereinigtem Transducin, abhängig von der Menge aktivierbaren Transducins in Bezug auf die Gesamtmenge an eingesetztem Transducin (nicht-aktivierbares Gt erhöht die Grund-Fluoreszenz wodurch die Fluoreszenzänderung je Zeit vermindert wird). Deshalb sind nachfolgende Aktivierungsraten der rekombinanten Pigmente immer prozentual, bezogen auf die Aktivierungsrate von Wildtyp-Rhodopsin (mit 11-*cis*-Retinal) angegeben, welches als Referenz mitgemessen wurde.

### 3.4.2. Modifizierung des Gt-Aktivierungsassays zur Messung der Rhodopsinaktivität im Grundzustand

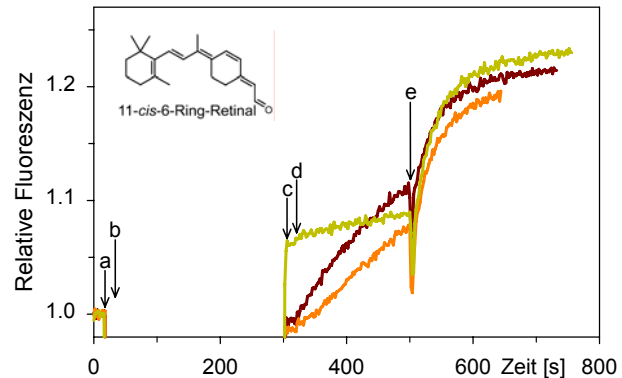
Um eine eventuelle Aktivität der Pigmente im unbelichteten Grundzustand festzustellen, wurde die Abfolge des unter 2.6.2 beschriebenen Assays zur fluorometrischen Bestimmung der Transducin-Aktivierung wie in Abb. 19 dargestellt variiert. Ohne Zugabe von Rezeptor wurden Transducin und GTP $\gamma$ S in der Küvette vorgelegt, die Probe vor der Messung für 2 min temperiert und für 30 Sekunden der Anfangswert der Fluoreszenz des Transducins aufgezeichnet. Sofort nachdem der Anregungsstrahl durch eine Blende unterbrochen wurde (a), wurde der Rezeptor unter Rotlicht direkt in die Küvette pipettiert (b). Die Blende wurde nach 5 Minuten wieder geöffnet (c). Im Falle der Transducin-Aktivierung durch einen im unbelichteten Zustand aktiven Rezeptor müsste im Vergleich zur Anfangs-Fluoreszenz-Intensität ein erhöhtes Signal messbar sein (siehe Beispiel in Abb. 20). Nach weiteren 20 Sekunden wurde die Probe belichtet und nach etwa 4 Minuten wurde Wildtyp-Rhodopsin zugegeben, um die Maximalamplitude der Gt $\alpha$ -Fluoreszenz zu ermitteln. Eine Einschränkung dieses Assays ist allerdings die zeitliche Begrenzung aufgrund der Instabilität des Gt in Detergens (max. 15 min). Die Nachweisbarkeits-Grenze der Dunkelaktivität liegt zwischen  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$  der Meta-II-Aktivität. Die Opsin-Aktivität wurde z.B. mit  $10^{-6}$  (Melia et al., 1997), die Aktivität von Rhodopsin im Dunkelzustand mit  $10^{-12}$  der Meta-II-Aktivität ermittelt (Hofmann, 2000).



**Abb. 19: Optimierung des Transducin-Aktivierungsassays zur Bestimmung eventueller Aktivität der Pigmente im Dunkelzustand**

Nach Aufnahme der Grundfluoreszenz von Gt, wurde das Anregungslicht durch eine Blende abgeblockt (a) und Rezeptor zugegeben (b). Nach ca. 5 min Inkubation wurde die Blende wieder geöffnet (c), die Probe belichtet (d) und zur Bestimmung der Maximalamplitude Wildtyp-Rhodopsin dazugegeben (e).

Exemplarisch sind Wildtyp (rot), F313A (orange) und der Signalverlauf ohne Rezeptor (gelb) gezeigt. Assay-Parameter und Pobenzusammensetzung sind unter 2.6.2 beschrieben. Die Kurven wurden auf das Fluoreszenz-Intensitäts-Niveau vor Zugabe des Rezeptors normiert.



**Abb. 20: Aktivität der Pigmente im Dunkelzustand am Beispiel der E113Q-Mutante mit einem 11-cis-Retinal-analogen, das nicht um die C<sub>11</sub>-C<sub>12</sub> Bindung isomerisieren kann.**

(a) Schließen der Blende, (b) Rezeptorzugabe, (c) Öffnen der Blende, (d) Belichtung und (e) Zugabe von Wildtyp-Rhodopsin

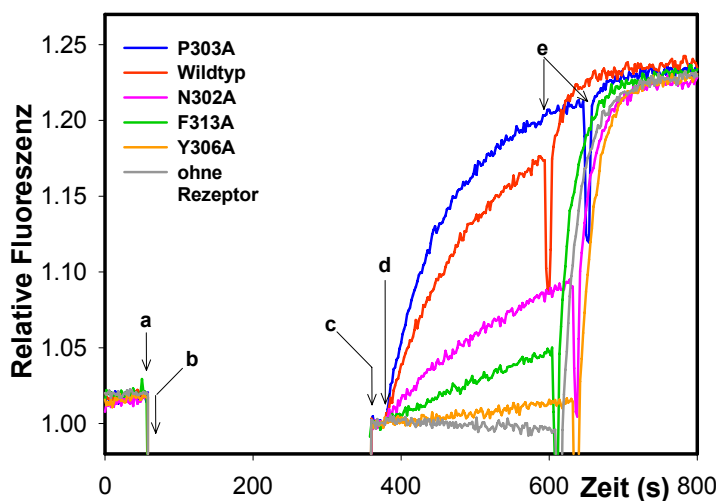
Dargestellt sind Wildtyp (rot), E113Q-Mutante mit nativem 11-cis-Retinal (orange) und E113Q-Mutante mit 11-cis-6-Ring-Retinal (gelb).

Die Kurven wurden auf das Fluoreszenz-Intensitäts-Niveau vor Zugabe des Rezeptors normiert.



### 3.4.3. Effekte der Mutationen auf die Transducin-Aktivierung

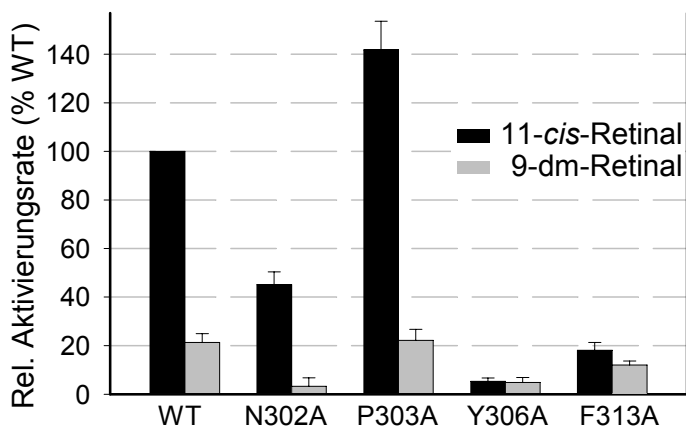
Aus den UV/Vis-Spektren der rekombinanten Pigmente (siehe Abb. 15) geht hervor, dass bei den Mutanten Y306A und F313A die aktive Meta-II-Konformation begünstigt wird. Auch mit dem partiellen Agonisten 9-dm-Retinal wurde das Meta-I/Meta-II-Gleichgewicht weit in Richtung aktiver Meta-II-Konformation verschoben. Dies spiegelt sich allerdings nicht in einer erhöhten Fähigkeit wieder, den Nukleotid-Austausch beim Transducin zu katalysieren. In Abb. 21 sind die Spuren für die fluorometrische Transducin-Aktivierung durch Wildtyp-Rhodopsin und die Alanin-Austausch-Mutanten entsprechend dem unter 3.4.1 und 3.4.2 vorgestellten Assay-Protokoll dargestellt.



**Abb. 21: Transducin-Aktivierungsassay mit rekombinanten Pigmenten**

(a) Schließen der Blende, (b) Rezeptorzugabe, (c) Öffnen der Blende, (d) Zugabe von Wildtyp-Rhodopsin. Die farbliche Zuordnung der Pigmente ist in der Abbildung angegeben. Die Kurven wurden auf das Fluoreszenz-Intensitäts-Niveau vor Zugabe des Rezeptors normiert.

Die initialen Raten der Erhöhung der Fluoreszenz der Gt $\alpha$ -Untereinheit nach Belichtung des Rezeptors sind relativ zur Aktivierungsrate des Wildtyps in Abb. 22 gezeigt.



**Abb. 22: Lichtabhängige Transducin-Aktivierungsrate der rekombinanten Pigmente**

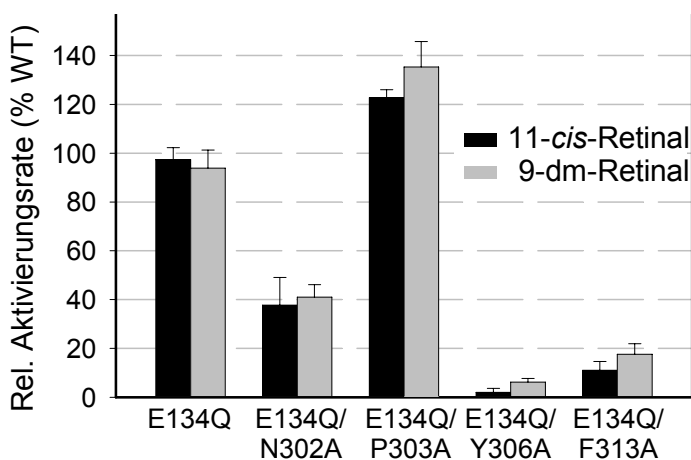
Die Opsine wurden mit 11-*cis*-Retinal (schwarz) oder mit 9-dm-Retinal (grau) rekonstituiert. Die Gt-Aktivierungsrate wurden aus dem initialen Fluoreszenz-Anstiegs nach Belichtung der Probe ermittelt und sind relativ zur Aktivierungsrate des 11-*cis*-Wildtyps (100 %) dargestellt.

Entgegen den Erwartungen ist die lichtinduzierte Gt-Aktivierung bei den Pigmenten Y306A und F313A stark eingeschränkt. Bei Rekonstitution mit dem nativen 11-*cis*-Retinal wurden verglichen mit dem Wildtyp-Rhodopsin Aktivierungsrate von 5,3 % (Y306A) und 18,1 % (F313A) ermittelt, bei Rekonstitution mit 9-dm-Retinal nur 4,8 % (9-dm-Y306A) und 12 % (9-dm-F313A). Am Fall der anderen beiden untersuchten Mutanten wurde für N302A eine reduzierte Aktivierungsrate von 45,1 %,

für P303 dagegen eine Erhöhung auf 141,8 % gemessen. Bei den 9-dm-Pigmenten, bei denen ähnlich wie beim 9-dm-Wildtyp nach Belichtung nur kleine Anteile Meta-II gebildet wurden, war die Gt-Aktivierung stark eingeschränkt: 100 / 21,3 % (WT / 9-dm-WT), 45,1 / 3,2 % (N302A / 9-dm-N302A) und 141,8 / 22,2 % (P303A / 9-dm-P303A).

Keine der Mutationen verursachte konstitutive retinalunabhängige Aktivität, es konnte bei keinem der Pigmente eine signifikante Katalyse des Nukleotidaustausches in Gt $\alpha$  im Dunkeln beobachtet werden.

In Abb. 23 sind die Aktivitätsraten der E134Q-Mutante sowie der Alanin-Austauschmutanten mit zusätzlicher E134Q-Mutation dargestellt.



**Abb. 23: Effekt der zusätzlichen E134Q-Mutation auf die lichtabhängigen Transducin-Aktivierungsraten der rekombinanten Pigmente**

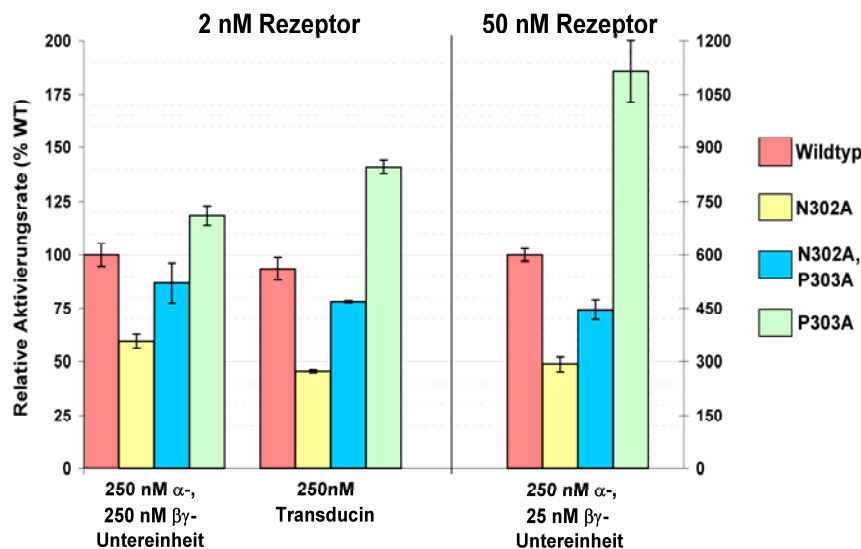
Dargestellt sind die Pigmente mit 11-*cis*-Retinal (schwarz) bzw. mit 9-dm-Retinal (grau). Die Gt-Aktivierungsraten sind relativ zur Aktivierungsrate des mit 11-*cis*-Retinal rekonstituierten Wildtyps (100 %) dargestellt.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass die Raten der Transducin-Aktivierung für alle 9-dm-Pigmente sehr ähnlich zu den jeweiligen Pigmenten mit dem nativen 11-*cis*-Retinal sind. Somit wurden die Effekte des schwachen Agonisten 9-dm-Retinal durch die zusätzliche Mutation in der D(E)RY-Region wieder ausgeglichen. Es ist zu beachten, dass die E134Q-Mutation bei den Alanin-Austauschmutanten die Aktivierungsraten nicht auf das Niveau des Wildtyps anhebt.

Der erhöhte Meta-II Anteil in den UV/Vis-Spektren der Pigmente 9-dm-E134Q/Y306A und 9-dm-E134Q/F313A nach Belichtung spiegelt sich also nicht in einer stärkeren Katalyse des Nukleotid-Austausches beim Transducin wieder.

### 3.5. Erhöhung der Gt $\beta\gamma$ / R\* Affinität durch die P303A-Mutation

In Abb. 24 ist ein Experiment gezeigt welches durchgeführt wurde, um zu untersuchen, ob die untersuchten Mutationen eine veränderte Affinität von R\* zu den Untereinheiten des Transducins bewirken.



**Abb. 24: Aktivierungsraten der Pigmente bei verschiedenen Stöchiometrien der Transducin-Untereinheiten**

Dargestellt sind die Aktivierungsraten der 11-*cis*-Pigmente bei Anwesenheit der isolierten Gt $\alpha$ - und Gt $\beta\gamma$ -Untereinheiten im Verhältnis von 1:1 (links), bei Zugabe des gereinigten Holoproteins (Transducin, Mitte) und Gt $\alpha$ - und Gt $\beta\gamma$ -Untereinheiten im Verhältnis 10:1 (rechts). Der Verminderung der Aktivierungsrate bei Gt $\beta\gamma$ -Überschuß (rechts) wurde durch eine Erhöhung der Rezeptorkonzentration auf 50 nM entgegengewirkt. Die Gt-Aktivierungsraten sind relativ zur Aktivierungsrate des 11-*cis*-Wildtyps dargestellt. Die rechte Achsenskalierung gibt die Raten für Messungen mit 50 nM Rezeptor, relativ zur Aktivierungsrate von 2 nM Wildtyp (100%) gemessen mit äquimolaren Gt Untereinheiten.

Untersucht wurde die Fähigkeit der Pigmente, den Nukleotidaustausch in der Gt $\alpha$ -Untereinheit des Transducins zu katalysieren, für die Fälle, dass (1) die  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des Transducins in äquimolaren Mengen vorliegen, (2) wenn das Transducin als Holoprotein (gereinigt aus Stäbchenaußensegmenten) vorliegt sowie für den Fall, (3) dass  $\alpha$  und  $\beta\gamma$ -Untereinheit im Verhältnis 10:1 vorliegen. Für den letzten Fall wurden 50 nM Rezeptor (sonst 2 nM) eingesetzt, damit der Anstieg des Fluoreszenzsignal auswertbar blieb. Die Transducinuntereinheiten wurden in dissoziiertem Zustand säulenchromatographisch getrennt („HiTrap Blue“-Sephrose, siehe 2.3.4).

Die Transducin-Aktivierungsraten der untersuchten Pigmente wichen nicht signifikant von den Raten ab, die erzielt wurden, wenn dem Assay die Untereinheiten des Transducins im Verhältnis 1:1 getrennt zugegeben wurden (Abb. 24 links). Eine Steigerung der relativen Aktivierungsrate um die Hälfte konnte jedoch bei P303A beobachtet werden, wenn  $\alpha$  und  $\beta\gamma$ -Untereinheit im Verhältnis 10:1 eingesetzt wurden. Die beiden anderen untersuchten Pigmente zeigten im Verhältnis zum Wildtyp eine ähnliche Katalyse, wie in den beiden vorherigen Versuchsansätzen.

Wird bei der Katalyse der Rezeptor als Katalysator und Transducin als Substrat angesehen, so bewirkt die Verringerung der Konzentration der  $\beta\gamma$ -Untereinheit (entspr. Substratverringern), dass der Umsatz weniger von der Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) abhängt, sondern von der Affinität der einzelnen Rezeptoren ( $K_D$ ) zum Transducin.

Das Ergebnis lässt sich so interpretieren, dass der Rezeptor mit der P303A-Mutation eine erhöhte Affinität bezüglich der Gt $\beta\gamma$ -Untereinheit des Transducins aufweist.

### 3.6. pH-abhängiges Meta-I/Meta-II Gleichgewicht der Pigmente mit 9-dm-Retinal

Das Meta-I / Meta-II-Gleichgewicht des belichteten Rezeptors ist von der Temperatur, dem pH sowie von der Lipidumgebung abhängig (siehe 1.3.3). Die beiden Konformationen sind spektral durch den Protonierungszustand der Schiffbase gut voneinander unterscheidbar. Bei protonierter Schiffbase in Meta-I liegt das Absorptionsmaximum bei 478 nm, die Meta-II-Konformation mit deprotonierter Schiffbase hat ein  $\lambda_{\max}$  von 380 nm. Bei nativen ROS-Membranen wird die Meta-II Konformation bei tiefem pH und höheren Temperaturen begünstigt (Parkes und Liebman, 1984). Nach Solubilisierung von Rhodopsin in Detergens wird das Meta-Gleichgewicht auch unter Meta-I-Bedingungen weit auf die Meta-II-Seite verschoben.

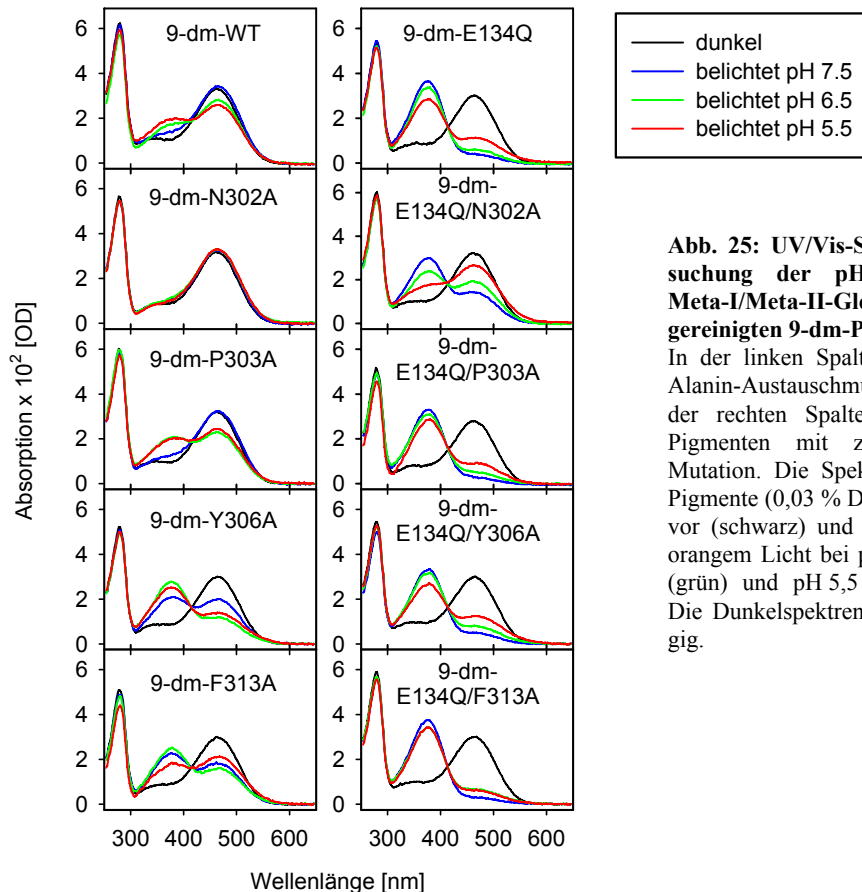
Durch den Einsatz des partiellen Agonisten 9-dm-Retinal als Chromophor werden die zur Ausbildung der aktiven Konformation nötigen Protonentransferreaktionen erschwert und das Meta-Gleichgewicht ist auf die Meta-I Seite verschoben (siehe Meyer et al., 2000). UV/Vis-spektroskopisch kann zwischen 9-dm-Meta-I und 9-dm-Meta-II unterschieden werden. Somit kann das 9-dm-Retinal als ein „Werkzeug“ betrachtet werden, um Auswirkungen von Mutationen auf den Protonierungszustand der Schiffbase während der Aktivierung bei rekombinanten, solubilisierten Pigmenten studieren zu können.

In Abb. 25 sind die Absorptionsspektren der rekombinanten 9-dm-Pigmente vor und nach Belichtung für verschiedene pH-Werte dargestellt.

Wie bereits unter 3.2 erwähnt, liegt 9-dm-WT nach Belichtung bei pH 7,5 nahezu vollständig mit protonierter Schiffbase vor, was sich in einem Absorptionsmaximum von 466 nm widerspiegelt. Bei pH 6,5 und 5,5 ist eine zunehmende Absorption bei 380 nm und eine abnehmende bei 464/466 nm zu beobachten. Beides deutet auf eine zunehmende Deprotonierung der Schiffbase bei saurem pH hin. Eine ähnliche pH-Abhängigkeit wurde bei 9-dm-P303A gefunden. Bei 9-dm-N302A verblieb die Schiffbase dagegen unabhängig vom pH nach der Belichtung nahezu vollständig in protoniertem Zustand. Hier wurde somit keine zunehmende Schiffbase-Deprotonierung bei saurem pH festgestellt.

Im Gegensatz zu den genannten Pigmenten liegen 9-dm-Y306A und 9-dm-F313A bei pH 7,5 nach der Belichtung zu ca. 50 % mit deprotonierter Schiffbase vor, gekennzeichnet durch einen Absorptionsanstieg bei 380 nm und eine Abnahme bei 464/466 nm. Bei 9-dm-Y306A nimmt bei pH 6,5 und 5,5 die Schiffbase-Deprotonierung weiter zu, während bei 9-dm-F313A bei pH 5,5 wieder ein

Absorptionsanstieg bei 466 nm zu verzeichnen ist. Dieser Anstieg könnte mit einer Schiffbase-Reprotonierung erklärt werden. Eine solche Schiffbase-Reprotonierung wurde bereits bei der Kombination von E134Q-Mutation und 9-dm-Retinal bei tiefem pH beobachtet (Meyer et al., 2000). Das entstandene Photoprodukt ist durch eine Meta-II Konformation bei protonierter Schiffbase gekennzeichnet (siehe hierzu auch 5.2.2).



**Abb. 25: UV/Vis-Spektren zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Meta-I/Meta-II-Gleichgewichts von gereinigten 9-dm-Pigmenten**

In der linken Spalte sind Spektren der Alanin-Austauschmutanten dargestellt, in der rechten Spalte die Spektren von Pigmenten mit zusätzlicher E134Q-Mutation. Die Spektren der gereinigten Pigmente (0,03 % DM) wurden bei 20 °C vor (schwarz) und nach Belichtung mit orangem Licht bei pH 7,5 (blau), pH 6,5 (grün) und pH 5,5 (rot) aufgezeichnet. Die Dunkelspektren waren pH-unabhängig.

Durch die zusätzliche E134Q-Mutation und die damit verbundene Vorwegnahme der Protonenaufnahme auf der cytoplasmatischen Rezeptoroberfläche wurde bei allen untersuchten 9-dm-Pigmenten eine verstärkte Schiffbase-Deprotonierung beobachtet. Bis auf 9-dm-E134Q/N302A ist bei allen 9-dm-Pigmenten eine nahezu vollständige Verschiebung des Meta-Gleichgewichts zur aktiven 9-dm-Meta-II Konformation zu finden. Bei 9-dm-E134Q/N302A sind bei pH 7,5 nach Belichtung noch ca. 30 % mit protonierter Schiffbase vorhanden.

Bei allen untersuchten 9-dm-Pigmenten wurde die erwähnte Schiffbase-Reprotonierung bei tiefem pH gefunden, wobei für belichtetes 9-dm-E134Q/N302A aus den Spektren nicht hervorgeht, ob es sich dabei um ein Photoprodukt mit unvollständig deprotonierter oder aber reprotonierter Schiffbase handelt.

### 3.7. Meta-I/Meta-II Gleichgewicht der 9-dm-Pigmente in Anwesenheit von Transducin bzw. Transducin-Peptiden

Mit Hilfe des sogenannten "Extra-Meta-II" Assays kann die Bindung von Gt bzw. von Gt-Peptiden nachgewiesen werden, da diese die gebundene Meta-II Konformation stabilisieren und somit dem Meta-I/Meta-II Gleichgewicht entziehen (Emeis et al., 1982; Hamm et al., 1988). Dazu werden Bedingungen gewählt, die Meta-I begünstigen. Bindungsstudien an Diskmembranen werden z.B. bei pH 8,0 und einer Temperatur von 4 °C (Parkes und Liebman, 1984) durchgeführt. Die Verschiebung des Gleichgewichts kann UV/Vis-spektroskopisch verfolgt werden. Abhängig von der Konzentration und der Affinität des bindenden Partners nimmt die für Meta-II spezifische Absorption bei  $\lambda_{\max} = 380$  nm zu (gebundenes Meta-II plus im Gleichgewicht befindliches Meta-II), während die für Meta-I spezifische Absorption bei  $\lambda_{\max} = 478$  nm abnimmt (im Gleichgewicht verbliebenes Meta-I).

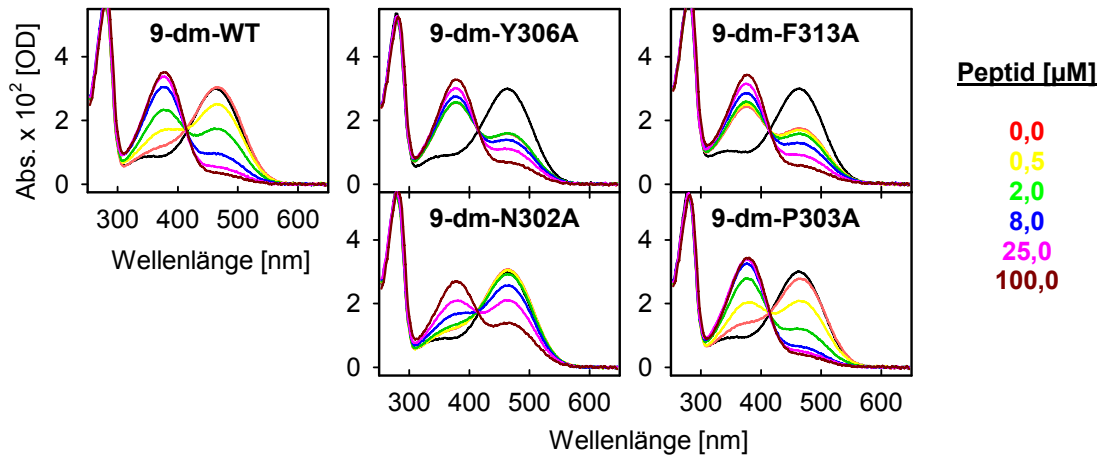
Durch den Einfluss des Detergens ist das Meta-I/ Meta-II Gleichgewicht bei den vorliegenden in DM solubilisierten 11-*cis* Pigmenten weit auf die Seite der aktiven Meta-II Konformation verschoben (siehe Arnis und Hofmann, 1993), so dass der Extra-Meta-II Assay nicht ohne weiteres anwendbar ist. Die Verwendung des partiellen Agonisten 9-dm-Retinal als Chromophor bewirkt jedoch, wie unter 3.2 bereits beschrieben, nach Belichtung eine Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der inaktiven Meta-I Konformation. Somit kann der Extra-Meta-II Assay angewendet werden und eine Kopplung der lichtaktivierten Pigmente an Gt bzw. Gt-Peptide kann anhand einer Meta-II Stabilisierung UV/Vis-spektroskopisch überprüft werden.

Mehrere synthetische Peptide wurden getestet, deren Sequenz den C-terminalen Regionen der G $\alpha$  bzw. G $\gamma_1$  Untereinheiten entsprachen oder ähnlich waren.

Als G $\alpha$ -Peptid wurde das hochaffine Analogon (HAA; Sequenz: (VLEDLKSCGLF, siehe Martin et al., 1996)) der C-terminalen G $\alpha$ (340-350)-Peptidsequenz (IKENLKDCGLF) verwendet. Weiterhin wurden das farnesylierte G $\gamma_1$ -Peptid G $\gamma_1$ (50-71) (EDPLVKGIPEDKNPFKELKGGC-farnesyl, siehe Kisselev et al., 1999) untersucht.

In der Literatur wurde beschrieben, dass beide Peptide mit aktiviertem Rhodopsin interagieren (Ernst et al., 2000; Kisselev et al., 1999). Bei den veröffentlichten Experimenten handelte es sich um Rhodopsin-Photoregenerations-Assays, bei welchen Rhodopsin mit grünem Licht aktiviert und danach einem blauen Blitz (ca. 412 nm) ausgesetzt wurde, wodurch entstandenes Meta-II zu einem spektral dem Rhodopsin sehr ähnlichen Photoprodukt konvertiert (Arnis und Hofmann, 1995). Dieser "Rückschuss" wurde bei Anwesenheit der besagten Peptide oder Transducin inhibiert, da selbige aktiviertes Meta-II stabilisieren.

Bei Anwesenheit des Gt $\alpha$ (340-350)HAA Peptids konnte wie nachfolgend dargestellt (Abb. 26) eine Stabilisierung der aktivierten Konformation von 9-dm-Wildtyp UV/Vis-spektroskopisch festgestellt werden. Für das Peptid G $\gamma$ <sub>1</sub>(50-71) wurde jedoch kein signifikanter Effekt ermittelt.



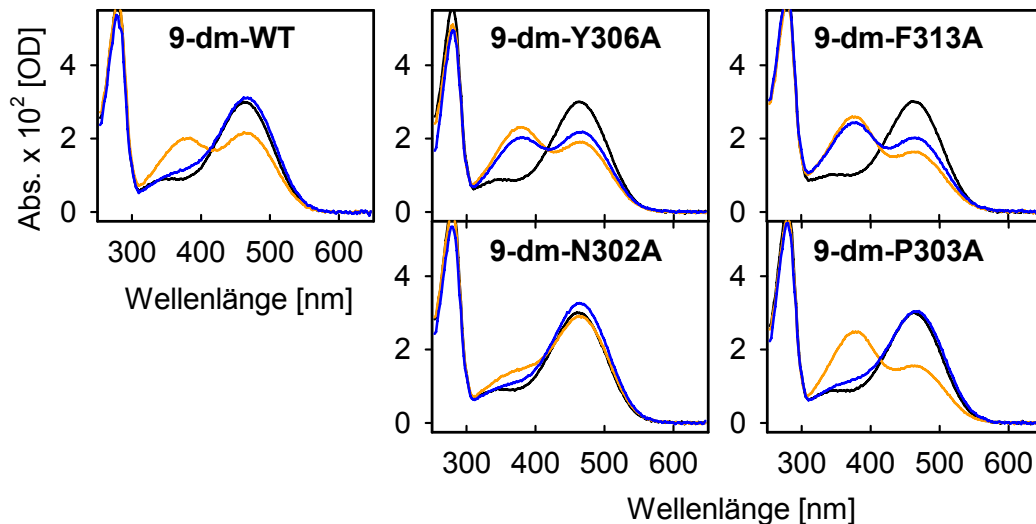
**Abb. 26: UV/Vis Spektren der gereinigten 9-dm-Pigmente in Anwesenheit des Gt $\alpha$ (340-350)HAA Peptids**

Gezeigt sind Spektren der 9-dm-Pigmente (0,7  $\mu$ M) in Anwesenheit des hochaffinen Gt $\alpha$ (340–350)–HAA Peptids (VLEDLKSCGLF, siehe Martin et al., 1996) vor (schwarz), sowie nach 15 s Belichtung mit orangem Licht bei steigender Peptidkonzentration (farbige Spektren). Die Peptid-Anwesenheit hatte keinen Einfluss auf die Spektren vor Belichtung. Es wurde in 50 mM BTP (pH 7,5), 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,03 % (w/v) DM bei 20 °C gemessen. Die Basis-Linien der Spektren bei Konzentrationen von mehr als 2  $\mu$ M Peptid wurden korrigiert.

Die Meta-I Konformation bei 9-dm-Wildtyp ist durch ein Absorptionsmaximum bei 466 nm gekennzeichnet. Bei Anwesenheit des Meta-II stabilisierenden Gt $\alpha$ (340-350)HAA Peptids wurde eine konzentrationsabhängige Erhöhung der für 9-dm-Meta-II charakteristischen Absorption bei 376 nm festgestellt. Der isosbestische Punkt liegt bei 416 nm.

Die halbmaximale Meta-II-Stabilisierung (EC<sub>50</sub>-Wert) ist im Vergleich zum 9-dm-Wildtyp für 9-dm-P303A etwas vermindert, für 9-dm-Y306A und 9-dm-F313A etwa 4-6 mal so hoch, und für 9-dm-N302A etwa 10-15 mal höher. Bezüglich der Fähigkeit, Transducin zu aktivieren, spiegeln sich die Unterschiede der Affinität zum hochaffinen Gt $\alpha$ -Peptid in der Hyperaktivität von P303A sowie der reduzierten Aktivität bei Y306A und F313A wieder (siehe 3.4.3). Bei der nahe der Bindungstasche des Chromophors lokalisierten N302A-Mutation sind die Retinalumgebung sowie der pKa der Schiffbase beeinflusst, weshalb für das 9-dm-N302A Pigment ein erhöhter EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt wurde.

In der Abb. 27 sind die UV/Vis-Spektren der selben 9-dm-Pigmente bei Anwesenheit von Transducin dargestellt. Zusätzlich zu den Spektren mit Transducin sind die Spektren bei Anwesenheit von Transducin und GTP $\gamma$ S gezeigt. Durch das Vorhandensein des GTP-Analogons wurde gebundenes Transducin durch den aktiven Rezeptor sofort aktiviert, wodurch sich für den freigewordenen Rezeptor das normale Meta-I/Meta-II Gleichgewicht einstellte. Die so (mit Gt und GTP $\gamma$ S) gewonnenen Spektren entsprechen den Spektren der Pigmente ohne Transducin (letztere sind nicht gezeigt).



**Abb. 27: UV/Vis Spektren der gereinigten 9-dm-Pigmente in Anwesenheit von Transducin**

Gezeigt sind Spektren von 0,7  $\mu$ M der 9-dm-Pigmente im Dunkeln (schwarz), sowie nach 15 s Belichtung in Anwesenheit von 1,4  $\mu$ M Gt (orange) oder 1,4  $\mu$ M Gt + 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S (blau). Die gereinigten Pigmente wurden in 50 mM BTP (pH 7,5), 0,03 % (w/v) DM bei 20 °C vermessen. Bei den Spektren mit Gt bzw. Gt + GTP $\gamma$ S wurden die Basis-Linien korrigiert.

Bei allen dargestellten 9-dm-Pigmenten ist eine Bindung von Transducin an die aktive 9-dm-Meta-II Konformation zu erkennen. Wie auch schon bei Anwesenheit des Gt $\alpha$ -Peptids ist der Effekt bei 9-dm-P303A am stärksten ausgeprägt. Bei den Pigmenten 9-dm-Y306A, 9-dm-F313A und 9-dm-N302A ist das Meta-I/Meta-II Gleichgewicht nur leicht in Richtung der aktiven 9-dm-Meta-II Konformation verschoben.

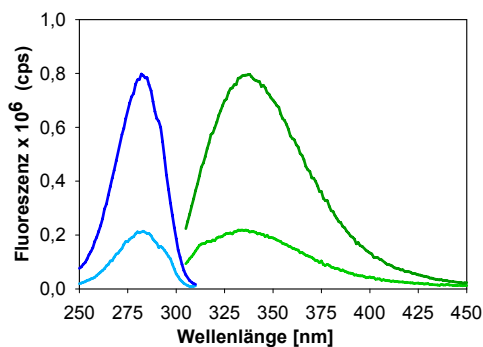


### 3.8. Meta-II-Zerfall in Apoprotein und Retinal

Nach der Belichtung von Rhodopsin und dem Durchlaufen kurzlebiger Photointermediate verweilt der Rezeptor (Sekunden bis Minuten) im beschriebenen Gleichgewicht zwischen inaktiver Meta-I und aktiver Meta-II Konformation. Darauf folgend zerfällt Meta-II in das Apoprotein Opsin und den Liganden all-*trans*-Retinal und kann anschließend wieder regeneriert werden. Für den Meta-II-Zerfall in Detergens (Dodecylmaltosid) wurden Halbwertszeiten von 15,5 min (20 °C, pH 6,0, Farrens und Khorana, 1995) bzw. 16,4 min (20 °C, pH 6,5, Heck et al., 2003) ermittelt.

Farrens und Khorana (1995) haben gezeigt, dass der Zerfall von Meta-II mit einem deutlichen Fluoreszenzanstieg einhergeht und somit fluoreszenzspektrometrisch verfolgbar ist. Durch das Vorhandensein des Chromophors in der Bindungstasche wird intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz des Rhodopsins unterdrückt. Bei Freisetzung des all-*trans*-Retinals aus der Bindungstasche kommt es daher zu einer Zunahme der Tryptophan-Fluoreszenz Intensität.

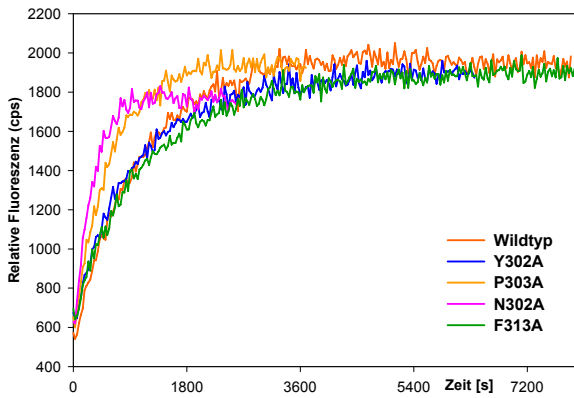
In Abb. 28 sind Anregungs- und Emissionsspektren für Rhodopsin vor und ca. 1,5 Stunden nach Belichtung dargestellt. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm, das Emissionsmaximum bei 330 nm (Anregung bei  $\lambda = 295$  nm). Direkt nach der Belichtung ist kein signifikanter Unterschied zu den Dunkelspektren erkennbar (siehe Farrens und Khorana, 1995)



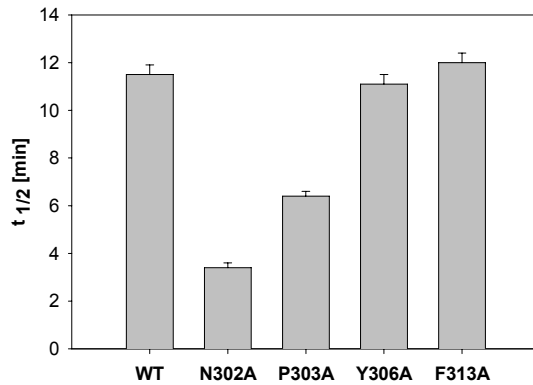
**Abb. 28: Anregungs- und Emissionsspektren von Rhodopsin und Opsin/all-*trans*-Retinal**

Gezeigt sind die Anregungs- (blau) und Emissionsspektren (grün) von Rhodopsin vor (helle Spektren) sowie 1,5 h nach Belichtung (dunkle Spektren) mit orangem Licht ( $\lambda > 495$  nm). 1,5 h nach Belichtung ist das Pigment unter den Messbedingungen (50 mM BTP, pH 7,5, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,03 % DM, 20 °C) größtenteils in Opsin und all-*trans*-Retinal zerfallen.

In Abb. 29 sind typische Verläufe des Fluoreszenzanstiegs für Wildtyp-Rhodopsin und die Alanin-Austauschmutanten dargestellt. Der verwendete Assay entspricht im Wesentlichen den von Farrens & Khorana (1995) benutzten Messbedingungen. In Vorversuchen wurde ein durch das Messlicht induzierter Fluoreszenzanstieg (Zerfall der Probe bzw. Entstehung von verschiedenen Photoprodukten während der Messung) minimiert. Die Messpunkte wurden in 30 s Intervallen während kurzzeitig geöffneter Spalte (2 s Integrationszeit) aufgenommen.



**Abb. 29: Fluorometrische Messung des Meta-II Zerfalls**  
Dargestellt sind Wildtyp (rot), Y306A (blau), P303A (orange), N302A (violett) und F313A (grün). Die Proben wurden mit Licht einer Wellenlänge von 295 nm angeregt und das emittierte Licht wurde bei 330 nm detektiert. Die Pigmente wurden nach 10 s für 15 s mit orangem Licht ( $\lambda > 495$  nm) belichtet. Gemessen wurde bei 20 °C, pH 7,5.



**Abb. 30: Halbwertszeiten des Meta-II Zerfalls der untersuchten Pigmente**

Die gemessenen Fluoreszenzänderungen wurden an eine einphasige Exponentialfunktion angepasst und die Halbwertszeiten ermittelt. Die Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ -value) bei der Regression waren  $> 98\%$ .

Aus den Darstellungen ist zu entnehmen, dass die Zerfallsraten der Pigmente Y306A und F313A etwa dem Wildtyp entsprechen, wogegen ein Alanin-Austausch näher am Chromophor einen beschleunigten Meta-II Zerfall zur Folge hat. Die Halbwertszeiten des Zerfalls waren ähnlich für Wildtyp (11,4 min), Y306A (11,1 min) und für F313A (12,7 min), aber kürzer für P303A (6,4 min) und am kürzesten für N302A (3,4 min). Somit wird durch die näher an der Retinal-Bindungstasche lokalisierten Mutationen die Barriere für die Hydrolyse der Schiffbase gesenkt. Beide Mutanten sind allerdings katalytisch sehr unterschiedlich aktiv, die P303A-Mutation bewirkt Hyperaktivität, während das Pigment mit der N302A-Mutation signifikant weniger aktiv ist. Die verminderte katalytische Aktivität durch die N302A-Mutation lässt sich wohl durch den starken Einfluss auf die Umgebung und den pKa der Schiffbase (siehe Abb. 25) sowie den beschleunigten Zerfall erklären.

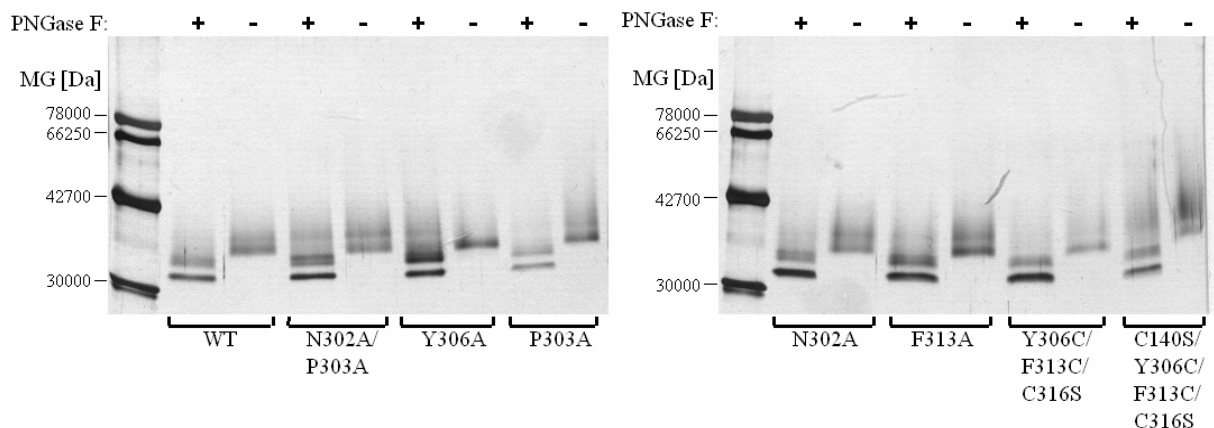
Sowohl die Zerfallskurven der 9-dm-Pigmente, als auch der Pigmente mit zusätzlicher E134Q-Mutation ließen sich nicht an eine einfache Zerfallsfunktion anpassen, was auf einen komplexen Zerfallsmechanismus hindeutet. (siehe 5.5.2).

### 3.9. Glykosylierung der Opsine

Bovines Rhodopsin ist an den N-terminalen Aminosäureresten Asn2 und Asn15 durch zwei Glykosylierungen modifiziert, die aus zwei Hexasacchariden (je 3 Moleküle Mannose und N-acetylglucosamin) bestehen (Ablonczy et al., 2002; Fukuda et al., 1979; Überblick in Kean, 1999). Die Glykosylierung von Rhodopsin wurde umfangreich untersucht, da sich die Retina sehr gut zum Studium der Biosynthese von Glykoproteinen eignet (Kean, 1999).

Nach Deglykosylierung von Rhodopsin durch Verdau mit N-Glykosidase F wurde keine Änderung bei der Regeneration mit 11-*cis*-Retinal sowie der spektralen Eigenschaften vor und nach Belichtung beobachtet (Prasad et al., 1992). Fliesler *et al.* untersuchten isolierte Retinen von Fröschen, die mit Tunicamycin, einem Inhibitor für Asparagin-Glykosylierungen, behandelt wurden. Durch das Fehlen der Zuckermodifikationen war die Morphogenese der Diskmembranen gestört (Akkumulation von unregelmäßig geformten Diskmembranen am Zilium), während der intrazelluläre Opsin-Transport nicht beeinflusst wurde (Fliesler und Basinger, 1985; Fliesler et al., 1985). Auch bei Expression von Wildtyp-Opsin in COS-1 Zellen bei Anwesenheit von Tunicamycin wurden keine signifikanten Unterschiede beim Transport zur Zelloberfläche sowie bei der Regeneration mit 11-*cis*-Retinal festgestellt (Kaushal et al., 1994). Jedoch wurde ein starker Aktivitätsverlust bezüglich der Transducin-Aktivierung (nur ca. 10 % der Wildtyp-Aktivität) festgestellt. Dieses Ergebnis wurde auch anhand von nicht glykosylierbaren rekombinanten Opsin-Mutanten bestätigt, bei welchen drei Aminosäureseitenketten an Position 2 (Asn2-Gly3-Thr4) bzw. 15 (Asn15-Lys16-Thr17) durch andere Reste ersetzt wurden (Kaushal et al., 1994). Bei Verlust der Glykosylierung an Position 2 wurde keine Funktionseinschränkung gefunden, Pigmente denen die Glykosylierung an Position 15 fehlte, verloren jedoch die Fähigkeit der Katalyse des Nukleotidaustausches am Transducin. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Glykosylierung von Asn15 für die korrekte Faltung des Proteins und somit für die Signaltransduktion wichtig ist, konkrete molekulare Details einer solchen Störung sind jedoch bisher nicht bekannt.

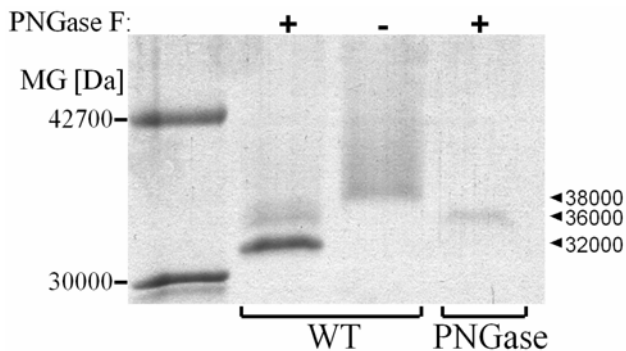
Um zu prüfen, ob die in dieser Arbeit vorgestellten rekombinanten Opsin-Mutanten korrekt glykosyliert sind, wurden die Rezeptoren vergleichend mit N-Glykosidase F (Roche, Mannheim) verdaut (nach Kaushal et al., 1994; Reeves et al., 1996) und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem Wildtyp-Rezeptor verglichen. Verdaut wurden 0,5 µg Rezeptor für 1 h bei 37 °C mit 0,5 U N-Glykosidase bei pH 7,5. Die Polyacrylamid-Gele sind in Abb. 31 dargestellt.



**Abb. 31: SDS-Page zum Nachweis der Glykosylierung der mutierten Pigmente des NPxxY<sub>5,6</sub>F-Motivs**

Dargestellt sind SDS-Gele von Wildtyp-Rhodopsin (WT) sowie der untersuchten Mutanten des NPxxY<sub>5,6</sub>F-Motivs nach (+) bzw. ohne (-) Verdau mit N-Glykosidase F (PNGase F). 0,5 µg Rezeptor wurde mit 0,5 U N-Glykosidase F für 1 h bei 37 °C und pH 7,5 in einem Volumen von 30 µl verdaut und der komplette Reaktions-Ansatz aufgetragen.

Für alle in Abb. 31 dargestellten unverdauten Rezeptoren ist die typische (verschmierte) Bande bei einem Molekulargewicht von 38 kDa zu erkennen. Nach dem Verdau mit N-Glykosidase F erscheinen bei allen Rezeptoren 3 Banden: eine scharf abgegrenzte Bande bei apparenten 32 kDa, die dem deglykosylierten Rezeptor zugeordnet werden kann, sowie zwei schwächere Banden bei ca. 35 und 36 kDa. Letztere Bande entspricht dem Molekulargewicht der N-Glykosidase (siehe Abb. 32 sowie Reeves *et al.* 1996) und die Bande bei 35 kDa kann einem nur unvollständig verdautem Rezeptor mit nur einfacher Glykosylierung zugeordnet werden.



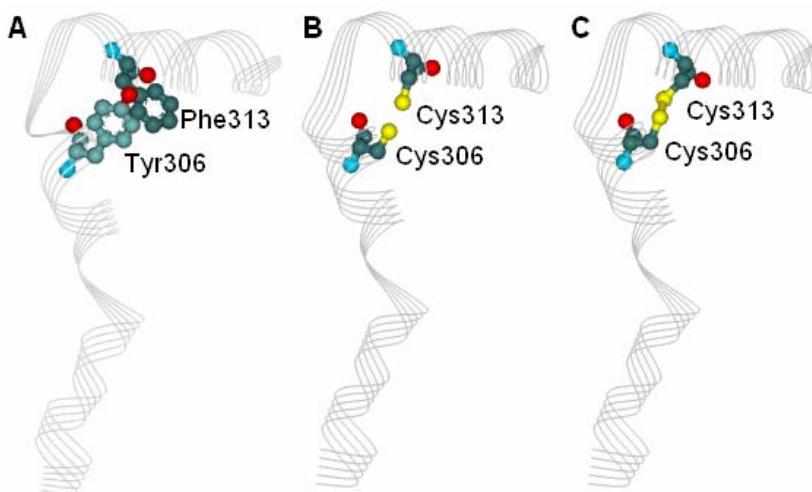
**Abb. 32: SDS-Page Wildtyp-Rhodopsin nach Verdau mit N-Glykosidase F**

SDS-Gel von Wildtyp-Rhodopsin (WT) nach (+) bzw. ohne (-) Verdau mit N-Glykosidase F sowie N-Glykosidase F (PNGase F) ohne Rezeptor. Die Glykosidasebande ist bei 36 kDa zu erkennen, glykosyliertes Rhodopsin erscheint mit einer Bande bei apparenten 38 kDa, deglykosyliertes Rhodopsin dagegen bei 32 kDa.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei keinem der untersuchten Rezeptoren bezüglich des Glykosylierungsmusters signifikante Unterschiede zum Wildtyp-Rhodopsin festgestellt wurden.

### 3.10. Disulfidbrücke zwischen Y306 und F313

Für Untersuchungen der Interaktion zwischen Helix VII und der cytoplasmatischen achten Helix wurden zwei weitere Opsin-Mutanten hergestellt (Y306C/F313C/C316S sowie C140/Y306C/F313C/C316S) und in COS-1 Zellen exprimiert. Die Wechselwirkung der hydrophoben aromatischen Aminosäurereste von Y306 und F313 sollte durch Knüpfung bzw. Öffnung einer Disulfidbrücke zwischen Cystein-Resten an diesen Positionen untersucht werden (siehe Abb. 33).



**Abb. 33: Schematische Darstellung der Einführung von Cystein-Resten an Position 306 und 313 für Untersuchungen des Rezeptors bei geöffneter und geschlossener Disulfidbrücke**

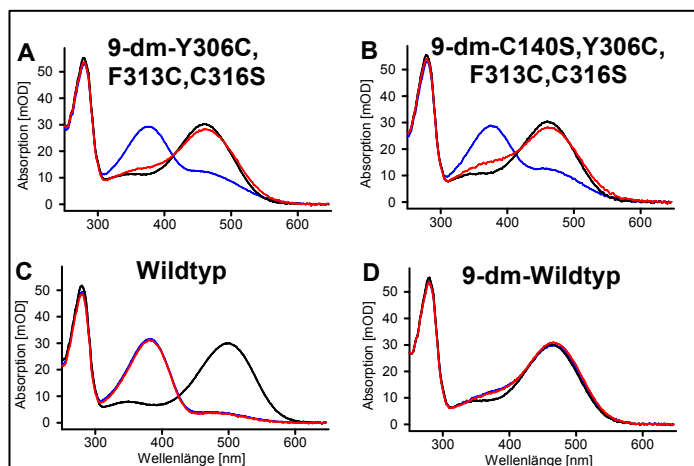
Gezeigt ist die Tertiärstruktur der Helix VII und Helix-8 von Rhodopsin (A), sowie nach Austausch der Reste Y306 und F313 gegen Cystein in reduziertem (B) und oxidiertem (C) Zustand. (Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin: 1HZX.pdb)

Das von Position 313 nur eine Helixwindung entfernte Cys316 wurde durch Serin ersetzt, um diesen Aminosäurerest von einer möglichen Disulfid-Brückenbildung auszuschließen. Bei der zweiten Mutante wurde zusätzlich noch Cys140 im zweiten cytoplasmatischen *Loop* durch Serin ersetzt. Die Mutanten zeigten eine dem Wildtyp entsprechende Glykosylierung (siehe 3.9), nach Expression und Reinigung wurde jedoch im Vergleich zum Wildtyp nur eine Ausbeute von ca. 20 % erzielt.

Die Oxidation der Cystein-Reste und somit die mögliche Knüpfung einer Disulfidbrücke erfolgte in Anlehnung an die von Struthers *et al.* (2000) verwendete Oxidation von SH-Gruppen durch Einbringen von Luftsauerstoff bei neutralem pH (siehe 2.5.7).

Beide mit 11-*cis*-Retinal regenerierte Opsin-Mutanten zeigten im UV/Vis-Spektrum volle Meta-II-Bildung nach Belichtung, unabhängig davon, ob sich die Pigmente in reduziertem oder oxidiertem Zustand befanden. Das entspricht der Beobachtung beim Wildtyp-Rhodopsin sowie bei allen weiteren in dieser Arbeit vorgestellten Mutanten in Detergens.

Auch bei Regeneration der Opsin-Mutanten mit dem partiellen Agonisten 9-demethyl-Retinal wurde im Gegensatz zum 9-dm-Wildtyp im UV/Vis Spektrum nach Belichtung ein großer Anteil an 9-dm-Meta-II gefunden, was sich in einem Absorptionsmaximum bei 380 nm widerspiegelt (siehe Abb. 34, *blau*).



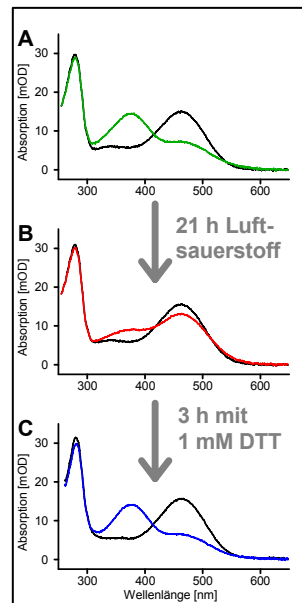
**Abb. 34: Verschiebung des Absorptionsmaximums der 9-dm-Pigmente mit Y306C und F313C nach Bildung der Disulfidbrücke**

UV/Vis Spektren von 9-dm-Y306C/F313C/C316S, 9-dm-C140S/Y306C/F313C/C316S, Wildtyp und 9-dm-Wildtyp im Dunkelzustand (schwarz) sowie nach Belichtung (pH 6,0). Spektrum der Probe nach Einbringen von Luftsauerstoff bei pH 7,0 und Belichtung (rot). Die Oxidation mit Luft hatte keinen Einfluss auf die Spektren im Dunkelzustand.

Diese Verschiebung des Gleichgewichts der 9-dm-Meta-Zustände wurde bereits bei anderen rekombinanten Pigmenten festgestellt, bei denen die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Y306 und F313 gestört wurde: 9-dm-F306A und 9-dm-F313A (siehe 3.2).

Nach Knüpfung der Disulfidbrücke bei den oxidierten Pigmenten 9-dm-Y306C/F313C/C316S und 9-dm-C140/Y306C/F313C/C316S ist im UV/Vis-Spektrum jedoch wieder die dem 9-dm-Wildtyp entsprechende starke Verschiebung des Meta-I/Meta-II-Gleichgewichts in Richtung der Meta-I-Konformation zu beobachten (Abb. 34, *rot*). Beim Wildtyp sowie beim 9-dm-Wildtyp ist im Spektrum kein Unterschied vor und nach der Oxidation mit Luftsauerstoff zu erkennen.

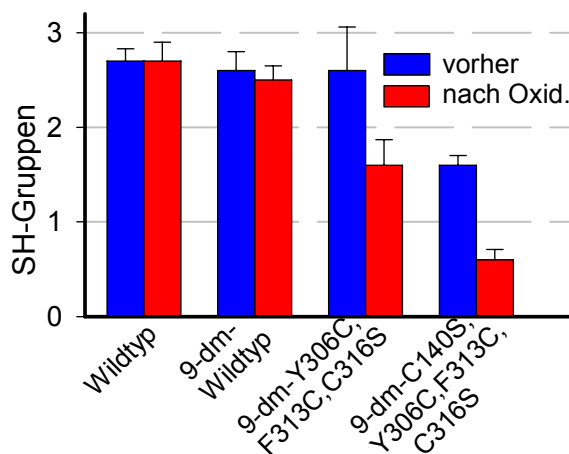
Die beobachtete Verschiebung des Absorptionsmaximums nach Ausbildung der Disulfidbrücke ist reversibel (siehe Abb. 35). Die durch Einbringen von Luftsauerstoff geknüpfte Disulfidbrücke kann unter reduktiven Bedingungen (3 h 1 mM DTT) wieder geöffnet werden. Die Reduktion der Sulfhydrylgruppen kann im UV/Vis-Spektrum anhand der Verschiebung des Meta-Gleichgewichts Richtung Meta-II beobachtet werden.



**Abb. 35: Reversible Knüpfung der Disulfidbrücke beobachtet im UV/Vis-Spektrum von 9-dm-Y306C/F313C/C316S**

Gezeigt sind die Spektren im Dunkelzustand (schwarz), sowie die Spektren nach Belichtung für 9-dm-Y306C/F313C/C316S direkt nach der Reinigung, nach Oxidation mit Sauerstoff (rot) sowie anschließender Reduktion mit 1 mM DTT (blau).

Mit der unter 2.5.8 beschriebenen Methode wurde nachgewiesen, wie viele freie, also reduzierte Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen) die Rezeptoren vor und nach dem Eintragen von Luftsauerstoff besitzen. Ein Molekül bovines Rhodopsin hat 10 Cystein-Reste. Zwischen Cys110 und Cys187 besteht eine Disulfid-Brücke. Cys322 und Cys323 sind palmitoyliert und somit auch von der Reaktion mit DTP auszuschließen. Cys167 befindet sich für die Reaktion unzugänglich mitten in der Helix IV, wie auch Cys264 in Helix VI, sowie Cys185 im extrazellulären *Loop* II, welcher die Retinal-Bindungstasche unterfüttert. Für die Reaktion zugänglich sind also Cys140 im zweiten cytoplasmatischen *Loop*, Cys316 in der achten Helix und das am cytoplasmatischen Ende der Helix V befindliche Cys222. Diese drei Cystein-Reste konnten im Experiment für bovines Rhodopsin näherungsweise bestätigt werden (siehe Abb. 36). Getestet wurden die Mutanten mit 9-dm-Retinal, da nur hier wie oben beschrieben eine spektrale Überprüfung der geöffneten bzw. geschlossenen Disulfidbrücke möglich ist.



**Abb. 36: Bestimmung der Anzahl freier Sulfhydrylgruppen beim Wildtyp, 9-dm-Wildtyp sowie zwei Mutanten, die eine zusätzliche Disulfidbrücke ausbilden können**

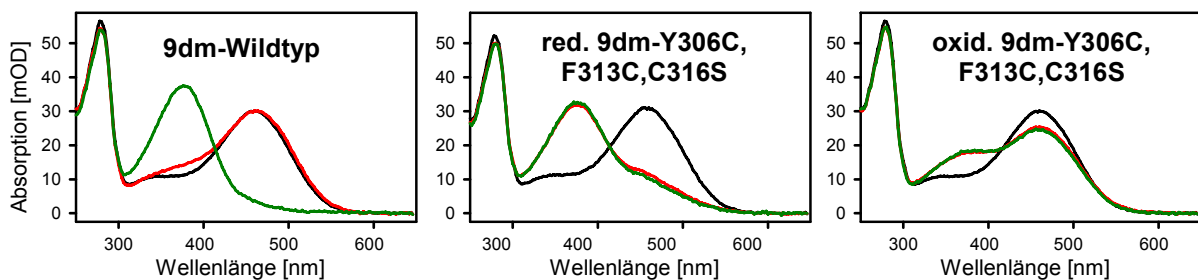
Die Ermittlung erfolgte durch eine Reaktion freier SH-Gruppen mit 4,4'-Dithiodipyridine (DTP) zu 4-Thiopyridone (nach Cai et al., 1997), welches anhand einer Absorption bei 323 nm quantifizierbar ist und zur Menge des eingesetzten Rezeptors in Relation gesetzt werden kann.

Beim Wildtyp-Rhodopsin wie auch beim 9-dm-Wildtyp sind keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Oxidation zu erkennen. Auch bei der reduzierten Form von 9-dm-Y306C/F313C/C316S wurden ca. 3 SH-Gruppen gefunden. Bei dieser Mutante fehlt Cys an Position 316, dafür ist das im reduzierten Zustand an Position 313 befindliche Cys für die DTP-Reaktion zugänglich, Cys an Position 306 wahrscheinlich nicht. Bildung einer Cys306-Cys313 Disulfidbrücke würde erklären, weshalb nach Oxidation nur noch ca. zwei freie SH-Gruppen ermittelt wurden. Bei dem Pigment 9-dm-C140S/Y306C/F313C/C316S wurde zusätzlich Cys140 gegen Serin ersetzt. Die Annahme, dass Cys an Position 306 nicht mit DTP reagiert, erklärt auch hier weshalb durch die Bildung einer Cys306-Cys313 Disulfidbrücke die Anzahl der mit DTP bestimmbaren freien SH-Gruppen um eins erniedrigt wurde.

Anhand der Verschiebung des Absorptionsmaximums und der Verringerung der Anzahl freier Sulfhydrylgruppen konnte gezeigt werden, dass eine Disulfidbrücke gebildet wurde.

Weiterhin wurde untersucht, ob die reduzierte bzw. die oxidierte Form von Y306C/F313C/C316S mit Transducin interagiert bzw. in der Lage ist, den Nukleotidaustausch zu katalysieren.

Aus den in Abb. 37 gezeigten Spektren zum Bindungsassay mit dem hochaffinen G $\alpha$ (340-350)HAA Peptid (VLEDLKSCGLF, siehe Martin et al., 1996), ist zu ersehen, dass die 9-dm-Mutante im Gegensatz zum 9-dm-Wildtyp weder in reduziertem noch in oxidiertem Zustand eine Meta-II-Stabilisierung durch das Peptid nach Belichtung zeigt. Auch bei Anwesenheit von Transducin wurde keine Meta-II-Stabilisierung gefunden.

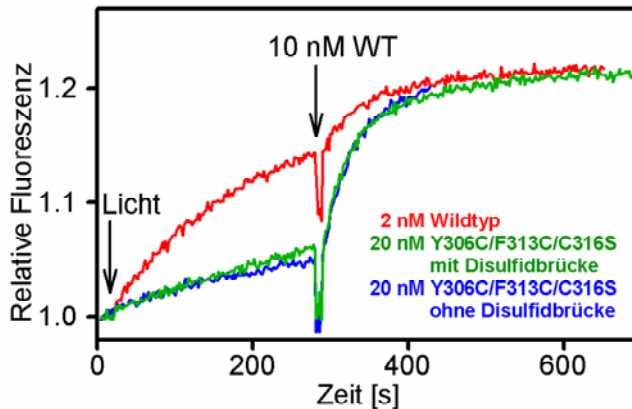


**Abb. 37: G $\alpha$ (340-350)HAA Peptid stabilisiert Meta-II bei 9-dm-Wildtyp, nicht aber bei 9-dm-Y306C/F313C/C316S unabhängig von der Ausbildung der Cys306-Cys313 Disulfidbrücke**

Gezeigt sind UV/Vis-Spektren von 0,7  $\mu$ M 9-dm-Wildtyp sowie 9-dm-Y306C/F313C/C316S in reduziertem (ohne Disulfidbrücke) bzw. oxidiertem (mit Disulfidbrücke) Zustand vor Belichtung (*schwarz*) sowie nach 15 s Belichtung mit orangem Licht bei Abwesenheit (*rot*) oder Anwesenheit (*grün*) von 50  $\mu$ M hochaffinem G $\alpha$ (340-350)-HAA-Peptid. Es wurde in 50 mM BTP, pH 7,5, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,03 % (w/v) DM bei 20 °C gemessen.



Diese starke Einschränkung der Interaktion mit dem Transducin wurde im Aktivierungsassay (2.6.2) bestätigt (Abb. 38).



**Abb. 38: Transducin-Aktivierungsassay mit Y306C/F313C/C316S im reduzierten und oxidierten Zustand**

Gezeigt ist die Aktivierung von 250 nM Gt mit 2 nM Wildtyp-Rezeptor (rot) bzw. 20 nM Y306C/F313C/C316S mit (grün) und ohne (blau) Disulfidbrücke. Nach 250 s wurden 10 nM Wildtyp zugegeben, um als Kontrolle die gesamte Gt-Menge zu aktivieren.

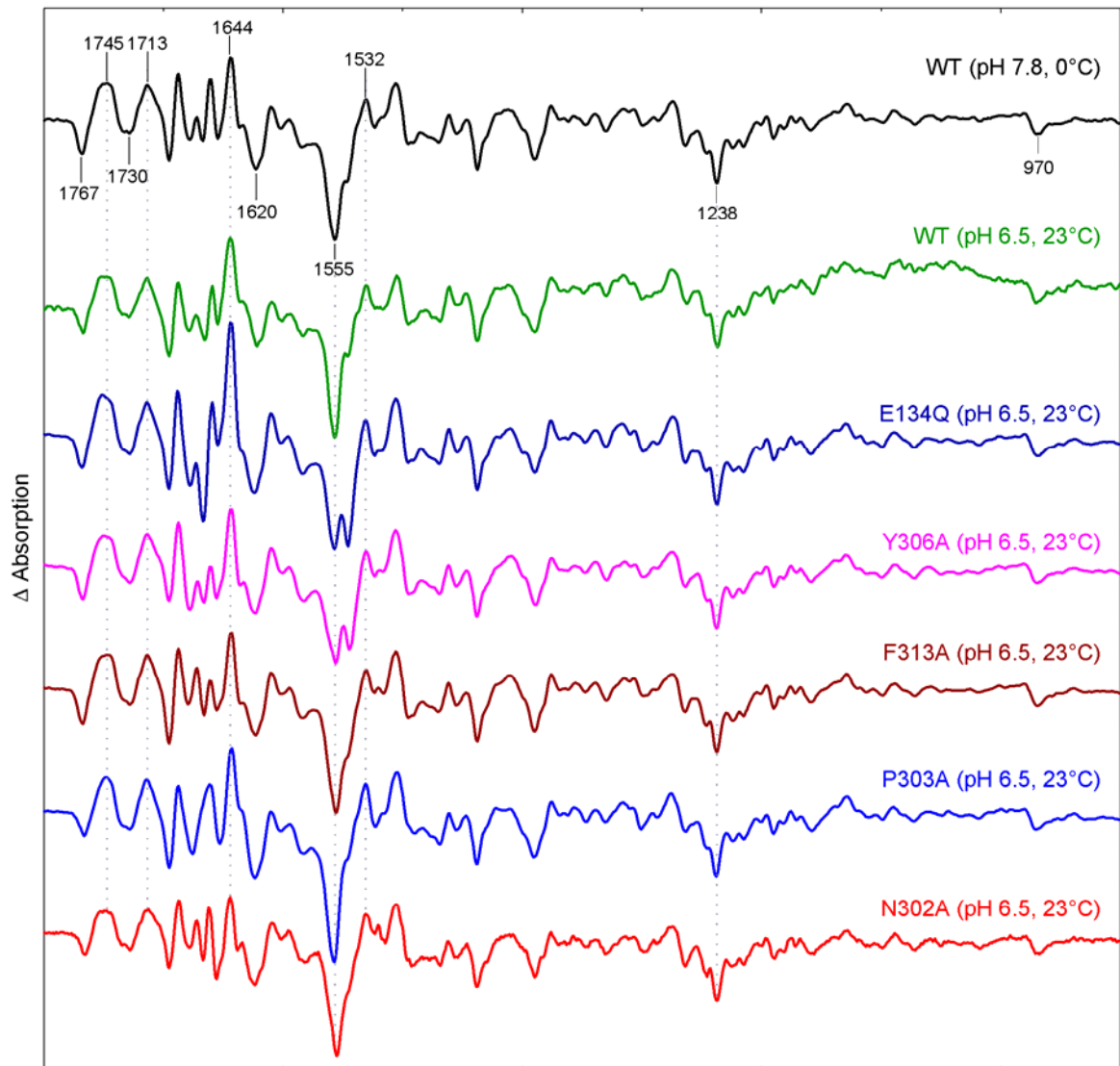
Für das Pigment Y306C/F313C/C316S wurde eine Aktivität von nur 2,6 % verglichen mit der Wildtyp-Aktivität ermittelt und es wurde auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivität der reduzierten und der oxidierten Form des Rezeptors gefunden. Für eine Aussage zur Ausbildung der Disulfidbrücke wurde die Anzahl der freien SH-Gruppen bestimmt (siehe oben).

### 3.11. FTIR-Spektroskopische Untersuchung der rekombinanten Pigmente

Anhand von UV/Vis-Spektren ist im Wesentlichen nur eine Aussage bezüglich des Protonierungszustandes der Schiffbase zwischen Chromophor und der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lys296 möglich. Im folgenden werden FTIR-Differenzspektren gezeigt, die Aussagen bezüglich Strukturänderungen der Pigmente nach der Lichtaktivierung im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor erlauben (siehe auch 2.6.4). Markante und für die frühen Intermediate sowie die Meta-Zustände von Rhodopsin typische Banden wurden bereits von Siebert *et al.* (1983) sowie von Palings *et al.* (1987) beschrieben und zum Teil einzelnen strukturellen Änderungen zugeordnet (siehe auch Bartl *et al.*, 2000; Siebert, 1995).

In Abb. 39 und Abb. 40 sind im Vergleich zum Wildtyp-Rhodopsin FTIR-Differenzspektren (Spektrum des Photoprodukts minus Spektrum der Probe im Dunkelzustand) der Pigmente E134Q, Y306A, F313A, P303A und N302A mit 11-*cis*-Retinal oder 11-*cis*-9-dm-Retinal gezeigt. Zur Messung wurde der pH-Wert direkt in der aufkonzentrierten Probe durch Zugabe von NaOH oder HCl Lösung entsprechend eingestellt. Für die Messung wurden ca. 3 nmol Rezeptor (30  $\mu$ l einer 100  $\mu$ M Lösung) direkt auf dem Messfenster mittels Luftstrom eingetrocknet und der Film mit 2  $\mu$ l Puffer (50 mM BTP, pH entsprechend der Probe) rehydratisiert.





Die Verschiebung des Meta-Gleichgewichtes von Rhodopsin in Detergenen in Richtung aktiver Meta-II-Konformation

**Abb. 39: FTIR-Differenzspektren von Wildtyp sowie E134Q, Y306A, F313A, P303A und N302A mit 11-*cis*-Retinal in Detergenen**

Alle hier dargestellten Differenzspektren (Spektrum des Photoprodukts abzüglich des Dunkelspektrums) zeigen Charakteristika, die dem Übergang zur Meta-II-Konformation nach Belichtung mit gelbem Licht (Schott GG495-Filter) entsprechen. Wellenzahlen spezifischer Banden der Retinal-Isomerisierung sowie des Übergangs zur Meta-II-Konformation sind im Wildtyp-Spektrum bei pH 7.8 und 0 °C gegeben. Alle Spektren wurden bezüglich der Chromophor-Bande bei 1238 cm<sup>-1</sup> normiert.

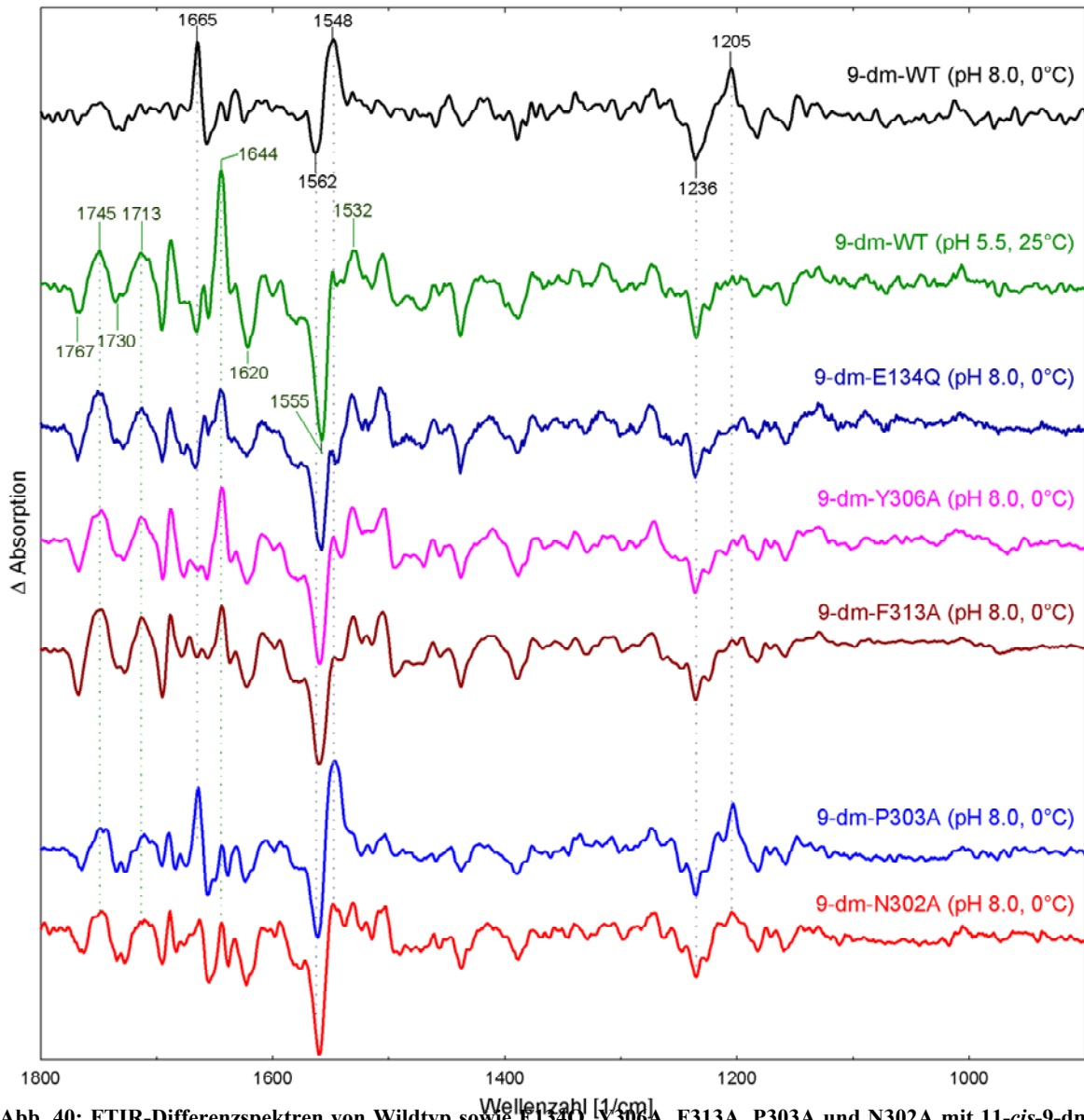
II-Konformation mit deprotonierter Schiffbase (Arnis und Hofmann, 1993) wird auch von den FTIR Daten wiedergespiegelt. Abb. 39 zeigt, dass sich die Differenzspektren von Wildtyp unter Meta-II Bedingungen (pH 6,5, 23 °C) kaum von denen unter Meta-I Bedingungen (pH 7,8, 0 °C) unterscheiden und die Differenzspektren in beiden Fällen wesentliche Meta-II-Charakteristika aufweisen. Spezifische Banden für Änderungen von C=O-Streckungs-Vibrationen der protonierten Carboxylgruppen werden für Asp83 durch eine negative Bande bei 1767 und eine positive Bande bei 1745 cm<sup>-1</sup> und für Glu122 durch eine negative Bande bei 1730 cm<sup>-1</sup> reflektiert. Die Bande bei 1713 cm<sup>-1</sup> zeigt die Protonierung des Gegenions Glu113 (Siebert, 1995).

Die Banden bei 1644 und 1620  $\text{cm}^{-1}$  spiegeln Vibrationsänderungen von C=C- und C=N-Bindungen wieder und werden auf Änderungen im Protein-Rückgrat zurückgeführt. Die präzise molekulare Interpretation dieses Bereichs (Amid-I-Bereich) steht noch aus. Der Bereich zwischen 1500 und 1580  $\text{cm}^{-1}$  (Amid-II-Bereich) inklusive der Meta-II-typischen Banden bei 1555 und 1532  $\text{cm}^{-1}$ , spiegelt eine charakteristische Absorption aufgrund einer komplexen Vibration bestehend aus C-C-Streckung, C-H-Verdrehung des Retinals sowie N-H Vibration an der Schiffbase-Bindung wieder (Siebert, 1995). Die starke negative Bande bei 1238  $\text{cm}^{-1}$  repräsentiert die *cis/trans*-Isomerisierung des Chromophors.

Der HOOP-Bereich (*hydrogen out of plane*) zwischen 1000 und 900  $\text{cm}^{-1}$  gilt als Maß für die Verdrillung der Polyen-Kette des Retinals und somit auch für die Wechselwirkung mit der Retinalbindungstasche. Die Differenzspektren der untersuchten Pigmente E134Q, Y306A, F313A, P303A und N302A zeigen bei pH 6,5 und 23 °C alle Charakteristika einer Meta-II-Konformation und bestätigen somit die Schlussfolgerung aus den UV/Vis-Spektren, dass die eingefügten Mutationen die Ausbildung einer Meta-II-ähnlichen Rezeptorkonformation nicht behindern. Als Besonderheit ist die Bande bei 1644  $\text{cm}^{-1}$  bei E134Q zu erwähnen, deren präzise molekulare Zuordnung aber bisher nicht geklärt ist.

In Abb. 40 sind FTIR-Differenzspektren der selben Rezeptoren mit dem partiellen Agonisten 11-*cis*-9-dm-Retinal dargestellt. Bei pH 8,0 und 0 °C (Meta-I-Bedingungen) zeigt der 9-dm-Wildtyp typische Banden eines Übergangs nach Meta-I, charakterisiert durch spezifische Banden bei 1660, 1562, 1548 und 1205  $\text{cm}^{-1}$ . Die positive Bande bei 1205  $\text{cm}^{-1}$  ist eine charakteristische Bande für die protonierte Form der Schiffbase (Vogel et al., 2001). Bei pH 5,5 und 25 °C sind jedoch wieder Bedingungen geschaffen, unter welchen beim Wildtyp mit 9-demethyl-Retinal nach Belichtung ein Übergang zu einer Meta-II-ähnlichen Konformation zu beobachten ist. Alle bereits beschriebenen für diesen Übergang spezifischen Banden können wieder gefunden werden, die Bande für die Retinalisomerisierung ist von 1238  $\text{cm}^{-1}$  aufgrund des unterschiedlichen Retinals bei den 9-dm-Pigmenten nach 1236  $\text{cm}^{-1}$  verschoben. Auch bei den Pigmenten 9-dm-E134Q, 9-dm-Y306A und 9-dm-F313A sind klare Übergänge zu einer Meta-II-ähnlichen Konformation zu erkennen, und somit können die Aussagen anhand der UV/Vis-Spektren bezüglich des verschobenen Meta-Gleichgewichts bei diesen Rezeptoren bestätigt werden. Die Banden für Änderungen von Vibrationen der protonierten Carboxylgruppen von Asp83 und Glu122 bei 1767, 1745 und 1730  $\text{cm}^{-1}$  sind voll ausgebildet, das Gegenion Glu113 ist protoniert (positive Bande bei 1713  $\text{cm}^{-1}$ ) und die Schiffbase ist deprotoniert (Fehlen der Bande bei 1205  $\text{cm}^{-1}$ ). Im Gegensatz dazu sind beim Differenzspektrum von 9-dm-P303A große Anteile der Meta-I-ähnlichen Spezies zu beobachten. Die Meta-I-typische Bande bei 1665  $\text{cm}^{-1}$  sowie das Motiv bei 1562/1548  $\text{cm}^{-1}$  sind voll ausgebildet, außerdem kann anhand der positiven Bande bei 1205  $\text{cm}^{-1}$  ein protonierter Zustand des Schiffbase identifiziert werden. Allerdings sind auch Meta-II-Charakteristika zu finden. Das typische Meta-II Motiv bei Wellenzahlen größer 1700  $\text{cm}^{-1}$  ist zwar nur leicht ausgeprägt, aber doch zu erkennen. Dies gilt auch für das Differenzspektrum von 9-dm-

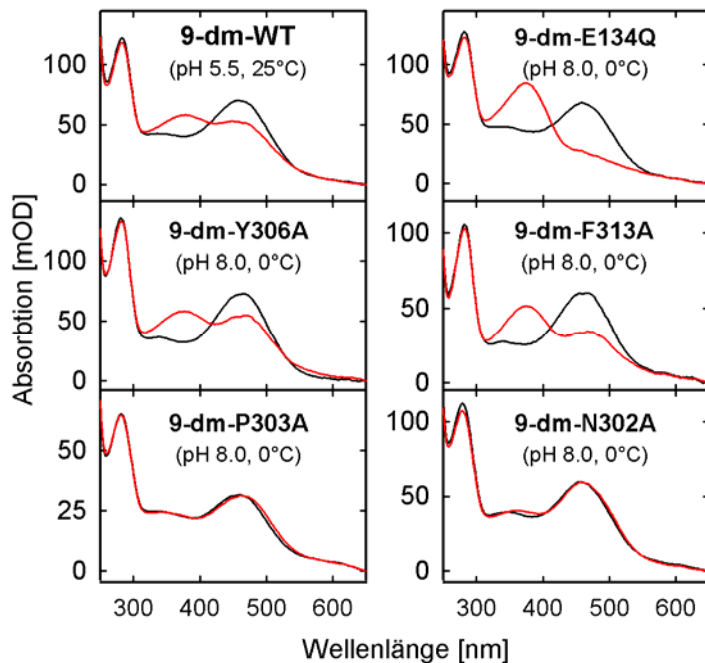
N302A. Anhand der positiven Bande bei  $1205\text{ cm}^{-1}$ , dem charakteristischen Meta-I-spezifischen Motiv bei  $1562/1548\text{ cm}^{-1}$  und der nur minimalen Ausprägung der Bande bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  lässt sich festhalten, dass auch bei diesem Rezeptor ein wesentlicher Anteil des Rezeptors in der Meta-I Konformation mit protonierter Schiffbase vorliegt, wenn auch weniger als bei 9-dm-P303A.



**Abb. 40: FTIR-Differenzspektren von Wildtyp sowie E134Q, Y306A, F313A, P303A und N302A mit 11-*cis*-9-dm-Retinal in Detergens**

Die Differenzspektren wurden mittels Subtraktion des Dunkelspektrums vom Spektrum nach Belichtung des Rezeptors mit gelbem Licht (Schott GG475-Filter) berechnet. Wellenzahlen spezifischer Banden der Retinal-Isomerisierung sowie des Übergangs zur Meta-I-Konformation sind im 9-dm-Wildtyp-Spektrum bei pH 8,0 und  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gegeben, die für den Meta-II-spezifischen Übergang typischen Banden sind im 9-dm-Wildtyp-Spektrum bei pH 5,5 und  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  beschriftet. Bei Meta-I-Bedingungen zeigen die Rezeptoren 9-dm-E134Q, 9-dm-Y306A und 9-dm-F313A Meta-II-typische Differenzspektren. Bei gleichen Bedingungen wurde bei 9-dm-N302A ein Rezeptoranteil mit protonierter Schiffbase gefunden, während 9-dm-P303 ein Meta-I-Spektrum mit Meta-II-Anteilen zeigt. Alle Spektren wurden bezüglich der Chromophor-Bande bei  $1236\text{ cm}^{-1}$  normiert.

Parallel zu den in Abb. 40 gezeigten FTIR-Differenzspektren wurde das Verhalten der Pigmente nach der Auftrocknungsprozedur im UV/Vis-Spektrum untersucht (siehe Abb. 41). Analog zur Vorbereitung der Proben für die FTIR-Spektroskopie wurde ein Aliquot der gereinigten Probe für die FTIR Messungen (100  $\mu$ M Rezeptor) auf eine für das UV/Vis-Spektrometer geeignete Küvette aufgetrocknet und rehydratisiert.



**Abb. 41: UV/Vis-Spektren der mit FTIR-Spektroskopie untersuchten Pigmente: Wildtyp, E134Q, Y306A, F313A, P303A und N302A mit 11-*cis*-9-dm-Retinal in Detergens**

Ein Aliquot von 20-40  $\mu$ l einer 100  $\mu$ M Lösung der gereinigten rekombinanten Pigmente wurde analog zur Vorbereitung für die FTIR-Spektroskopie auf eine Küvette aufgetrocknet und UV/Vis-spektroskopisch vermessen. Die Spektren wurden vor (schwarz) und nach Belichtung (rot) mit gelbem Licht (Schott GG475-Filter) aufgezeichnet. Gezeigt ist 9-dm-WT bei Meta-II-Bedingungen (pH 5,5 und 25  $^{\circ}$ C) sowie die Pigmente 9-dm-E134Q, 9-dm-Y306A, 9-dm-F313A, 9-dm-P303A und 9-dm-N302A bei pH 8,0 und 0  $^{\circ}$ C.

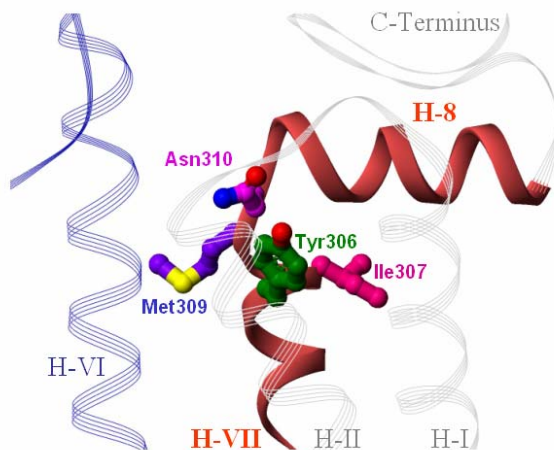
Der im FTIR-Spektrum für 9-dm-WT gefundene Meta-II-Anteil nach der Belichtung bei pH 5,5 und 25  $^{\circ}$ C konnte auch im UV/Vis-Spektrum wiedergefunden werden. Deutlich ist ein Absorptionsmaximum bei 380 nm (rote Kurve) erkennbar. Es sei zu bedenken, dass es aufgrund des dem Grundzustand sehr ähnlichen Absorptionsmaximums von 9-dm-Meta-I während der Belichtung zu Rückisomerisierungen des Retinals zu 7-*cis*- und 9-*cis*-Isorhodopsin kommen kann. Die so entstandenen Pigmente verbleiben mit protonierter Schiffbase-Bindung des Retinals und sind anhand der Absorptionsmaxima praktisch nicht vom 9-dm-Meta-I Spektrum unterscheidbar. Im FTIR-Differenzspektrum werden dagegen nur die Änderungen vom Grundzustandes sichtbar und die bezüglich des Grundzustandes starken Änderungen zur Meta-II Konformation und die dazugehörigen spezifischen Banden machen eine Quantifizierung eines Meta-I-Anteils schwierig.

Das Spektrum von 9-dm-E134Q zeigt eine vollständige Verschiebung des Meta-Gleichgewichts zur aktiven Meta-II-Konformation mit deprotonierter Schiffbase, was mit der Interpretation des FTIR-Differenzspektrums übereinstimmt. Auch 9-dm-Y306A und 9-dm-F313A zeigen im FTIR-Differenzspektrum Meta-II-Charakteristika was sich im UV/Vis-Spektrum in einer deutlichen Verschiebung des Meta-Gleichgewichts bei den gewählten Meta-I-Bedingungen (pH 8,0, 0  $^{\circ}$ C) nach Meta-II widerspiegelt. 9-dm-P303A zeigt im UV/Vis-Spektrum wie auch im FTIR-Differenzspektrum Meta-I-Charakteristika. Die Erwartung, dass sich die gefundenen Meta-II-Anteile im FTIR-Differenzspektrum von 9-dm-N302A auch im UV/Vis-Spektrum wiederfinden lassen wurde nicht

erfüllt. Der Rezeptor liegt nach der Belichtung bei den gegebenen Bedingungen fast vollständig mit protonierter Schiffbase vor. Der Frage, ob bei 9-dm-N302A die Schiffbase gar nicht erst deprotoniert wurde oder ob sie nach erfolgter Deprotonierung wieder reprotoniert wurde, muss noch nachgegangen werden.

### 3.12. Weitere untersuchte Mutationen in der NPxxY-Region

Weiterhin wurden Auswirkungen der Mutationen Y306F, Y306W, I307A, M309A und N310A hinsichtlich des Meta-Gleichgewichts sowie der Fähigkeit, den Nukleotidaustausch im Transducin zu katalysieren, untersucht. Die veränderten Aminosäureseitenketten befinden sich am cytoplasmatischen Ende der Helix VII (siehe Abb. 42).

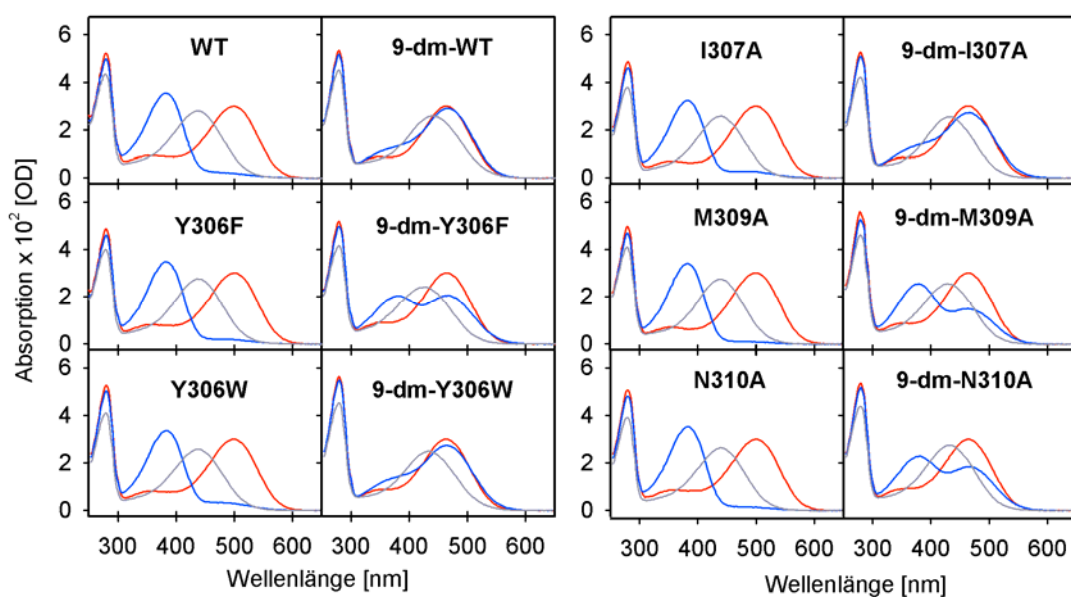


**Abb. 42: Dreidimensionales Modell der Region am cytoplasmatischen Ende der Helix-VII**

Untersucht wurden die Auswirkungen eines Austausches von Tyr306 (grün) gegen Phe bzw. Trp sowie eines Ala-Austausches bei Ile307 (weinrot), Met309 (blau) und Asp310 (rosa). Basis des dargestellten Modells ist die Kristallstruktur von Rhodopsin (1HZX, Teller et al., 2001).

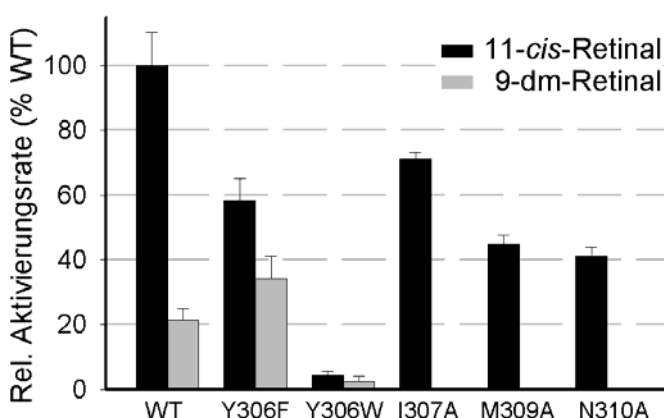
Die UV/Vis Spektren dieser Pigmente mit 11-*cis*-Retinal sowie mit 9-dm-Retinal sind in Abb. 43 dargestellt und in Abb. 44 wird die katalytische Aktivität der Pigmente verglichen. Im vorherigen Abschnitt wurde bereits beschrieben, dass bei Y306A beobachtet wurde, dass durch die Mutation weniger Energie nötig ist, um nach Belichtung eine Konformation mit deprotonierter Schiffbase zu erreichen (Abb. 15), während dieses Pigment bezüglich der Transducin-Aktivierung praktisch inaktiv blieb (Abb. 22). Die UV/Vis Spektren von 9-dm-Y306F zeigen, dass allein der Verlust der Hydroxylgruppe am Tyr306 die Deprotonierung der Schiffbase erleichtert, dieses Pigment aber nur noch 58 % der Wildtyp-Aktivität besitzt. Eine korrekte Ausrichtung der aromatischen Seitenketten müsste den inaktiven Zustand stabilisieren. Dies ist wahrscheinlich durch das Fehlen der Hydroxylgruppe nicht mehr der Fall und der Übergang zur Meta-II-Konformation wird erleichtert. Aus der verminderten Aktivität ließe sich ableiten, dass Tyr306 zur Gt-Bindungsstelle beiträgt. In der Kristallstruktur ist ein Wassermolekül zu finden, zu welchem Wasserstoffbrücken von Tyr306, Thr62 sowie Asn73 geknüpft sind. Dies könnte zur Stabilisierung der hydrophoben Wechselwirkung beitragen. Durch das Einbringen eines hydrophoben Tryptophan-Restes an Position 306 ist die hydrophobe Wechselwirkung möglicherweise wieder intakt (9-dm-Meta-I Spektrum), doch die Interaktion mit Gt

wird massiv gestört (4 % Aktivität). Der Austausch bei Ile307 zeigt verglichen mit dem Wildtyp kaum Auswirkungen in der UV/Vis-Spektroskopie, die Aktivität sinkt allerdings um etwa 30 %. Interessanterweise bewirkt selbst der Austausch der relativ weit von der Retinalbindungstasche entfernten am cytoplasmatischen Ende von Helix VII befindlichen Aminosäurereste Met309 und Asn310 gegen Alanin eine Veränderung des 9-dm-Meta-Gleichgewichts hin zur aktiven Konformation mit deprotonierter Schiffbase. Die Aktivitäten dieser Rezeptoren sind mit nur 45 und 41 % ähnlich der Aktivität von Y306F (58 %). Das bedeutet, dass entweder konformative Änderungen für Meta-II behindert werden (z.B. korrekte Faltung der Helix-8) oder dass diese Region aktiv an der Gt-Kopplung beteiligt ist.



**Abb. 43: UV/Vis Spektren von Rezeptoren mit anderen Mutationen in der NPxxY-Region**

Die Opsine wurden mit 11-*cis*-Retinal (linke Spalten) oder mit 9-dm-Retinal (rechte Spalten) rekonstituiert. Die Spektren wurden vor (rot) und nach Belichtung (blau) bei RT und pH 6,0 sowie nach anschließender Säuredenaturierung des Pigments (Senkung der H<sup>+</sup>-Konzentration auf ca. pH 2: grau) aufgezeichnet.



**Abb. 44: Lichtabhängige Transducin-Aktivierungsraten von Wildtyp, Y306F, Y306W, I307A, M309A und N310A mit 11-*cis*-Retinal und 9-dm-Retinal**

Dargestellt sind die errechneten Aktivierungsraten (rechts) für die angegebenen Rezeptoren regeneriert mit 11-*cis*-Retinal (schwarz) bzw. 9-dm-Retinal (grau). Die Gt-Aktivierungsraten sind relativ zur Aktivierungsrate des 11-*cis*-Wildtyps dargestellt. Die ermittelten Aktivierungsraten sind: 100 % / 21% (Rhodopsin Wildtyp), 58 % / 34% (Y306F), 4 % / 2 % (Y306W), 71 % (I307A) 45 % (M309A) und 41 % (N310A).

### 3.13. Diskussion

#### a) Die Meta-II-Bildung wird von den konservierten Regionen D(E)RY und NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F kontrolliert

Anhand der Kristallstruktur vom inaktiven Grundzustand von Rhodopsin konnten mögliche Wasserstoff-Brücken-Netzwerke und Wechselwirkungen zwischen Seitenketten innerhalb des Proteins visualisiert werden (Okada et al., 2004; Palczewski et al., 2000). Unter anderem wurden detaillierte Strukturen in den konservierten Regionen D(E)RY und NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F an der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin sichtbar. So konnte anhand der Struktur postuliert werden, dass die Helix-Turn-Helix Struktur der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region durch eine hydrophobe Interaktion zwischen den aromatischen Seitenketten von Tyr306 und Phe313 stabilisiert wird.

Die hydrophobe Interaktion konnte auch anhand einer Disulfid-Brücke zwischen Tyr306 und Phe313 imitiert werden. Bei geöffneter Brücke zeigte das Pigment einen erleichterten Meta-II-Übergang, ähnlich den Beobachtungen bei den mutierten Pigmenten Y306A bzw. F313A. Bei geschlossener Disulfidbrücke wurde diese Verschiebung des Meta-Gleichgewichts nicht beobachtet, was wiederum dem Wildtyp-Verhalten entspricht. Obwohl bisher keine Aktivität im Dunkelzustand dieser Pigmente nachgewiesen werden konnte, liegt der Schluss nahe, dass diese hydrophobe Brücke bei der Stabilisierung der inaktiven Dunkelkonformation von Bedeutung ist.

Durch Vorwegnahme von für den Aktivierungsprozeß möglicherweise essentiellen Ereignissen in den konservierten Regionen D(E)RY und NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F, wie der Neutralisierung von Glu134 (durch die E134Q-Mutation) bzw. des Bruches besagter Interaktion zwischen den aromatischen Seitenketten von Tyr306 und Phe313, wird die Bildung der Meta-II-Konformation erleichtert. In beiden Fällen wurde bei den 9-dm-Pigmenten eine signifikante Verschiebung des Meta-Gleichgewichtes hin zur Meta-II-Konformation festgestellt. Daher lässt sich folgern, dass der Meta-II-Übergang durch strukturelle Ereignisse in beiden Regionen, der D(E)RY- sowie der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region determiniert wird. Ob der Übergang zur Meta-II-Konformation komplett oder nur partiell stattfindet, wird maßgeblich durch die chemischen Eigenschaften des Liganden bestimmt. Diese Eigenschaften bestimmen, ob ausreichend Energie aus der *cis/trans*-Isomerisierung des Retinals (oder im Falle anderer rhodopsinähnlicher GPCRs die Bindung des freien Liganden) übertragen werden kann, um alle zur Aktivierung nötigen strukturellen Änderungen zu bewirken.

#### b) Beitrag der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region zu einer Bindungsstelle für Transducin

Bezüglich der Bindung des Transducins an Meta-II gibt es experimentelle Befunde und kinetische Analysen, die mit einem sequentiellen Zwei-Schritt-Mechanismus erklärt werden können (Herrmann et al., 2004). Diesem zufolge bindet zuerst die farnesylierte C-terminale Region von G $\gamma$  und/oder der myristylierte N-Terminus von G $\alpha$  an R\*, erst dann wird die zweite Hauptbindungsstelle für R\*, die C-



terminale Region von G $\alpha$ , für die Interaktion mit R\* zugänglich. Der molekulare Mechanismus der Bindung des G-Proteins sowie der Nukleotidaustauschkatalyse ist allerdings noch nicht verstanden.

Interessanterweise spiegelt sich die erleichterte Meta-II-Bildung bei Mutanten mit fehlenden aromatischen Seitenketten an Position 306 und/oder 313 nicht in einer verstärkten Fähigkeit wieder, den Nukleotidaustausch im Transducin zu katalysieren. Vielmehr wurde ein starker Aktivitätsverlust bei diesen Pigmenten festgestellt. Erste Untersuchungen an einem Pigment mit einer N73A-Mutation ergaben einen fast vollständigen Verlust der Gt-Aktivierung durch diese Mutation. Asn73 befindet sich am cytoplasmatischen Ende der Helix-II und stabilisiert möglicherweise durch ein kleines Wasserstoffbrücken-Netzwerk mit Thr62 (Helix-I) einem Wassermolekül und der Hydroxylgruppe von Tyr306 (siehe Kristallstruktur in Okada et al., 2004) die Position der hydrophoben Brücke zwischen Tyr306 und Phe313. Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass das hochaffine Gt $\alpha$ (340-350)-Peptid bei geknüpfter Disulfidbrücke zwischen Tyr306 und Phe313 keine Meta-II Stabilisierung bewirkt, was ein Hinweis darauf ist, dass die hydrophobe Interaktion zwischen den beiden aromatischen Seitenketten während der Rhodopsinaktivierung aufgrund struktureller Änderungen gebrochen wird, was wiederum im Fall der Disulfidbrücke nicht möglich ist.

Dies sind klare Indizien für eine Beteiligung des Y(x)<sub>5,6</sub>F-Teilmotivs an der Ausbildung einer Bindungsstelle für Transducin. Die Annahme der Beteiligung dieser Region bei der Transducin-Bindung wird von Ergebnissen früherer Arbeiten gestützt (Cai et al., 1999; Ernst et al., 2000; Marin et al., 2000). Außerdem wurde von Schädel *et al.* (2003) auf eine große hydrophobe Tasche nahe der Palmylierungsstelle des Rhodopsins hingewiesen. Dieser Tasche wurde von den Autoren eine potentielle Rolle als Retinal-Bindungsstelle beim Meta-II-Zerfall zugeschrieben. Dies, sowie der Befund einer erhöhten Affinität des P303A-Pigments zur Gt $\beta\gamma$ -Untereinheit könnte als Hinweis auf die Bindung der Lipid-modifizierten Gt-Domänen (myristylierter Gt $\alpha$ -N-Terminus und farnesylierter G $\gamma_1$ -C-Terminus) in dieser Region interpretiert werden.

Auch die Ergebnisse bei Studien zur Wiederherstellung der Aktivität durch eine zusätzliche E134Q-Mutation sprechen für eine Beteiligung der Region an der Gt-Bindung. Während der partielle Agonismus von 9-dm-Retinal durch die E134Q-Mutation kompensiert wurde, konnte bei E134Q/Y306A und E134Q/F313A keine Restoration der Wildtyp-Aktivität beobachtet werden.

Im Gegensatz zum starken Aktivitätsverlust bei Störung der Tyr306-Phe313-Interaktion wurde ein leichter Aktivitätsverlust bei dem N302A-Pigment und Hyperaktivität durch eine P303A-Mutation festgestellt, was auf eine gesonderte Rolle dieser beiden Residuen hinweist (nähere Erläuterungen unter d) ).



**c) konformative Änderungen in der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region nach der Aktivierung**

Es gibt verschiedene Hinweise auf eine strukturelle Umordnung der achten Helix nach der Rezeptor-Aktivierung. Eine Disulfid-Mutante (Y306C/F313C/C316A) wurde hergestellt, bei welcher abhängig von den Umgebungsbedingungen Pigmente *mit* und *ohne* Disulfid-Brücke zwischen den Position 306 und 313 untersucht werden konnten. Anhand von UV/Vis-Spektren wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen den Aminosäureresten 306 und 313 den Meta-I/Meta-II-Übergang determiniert. Nur bei geöffneter Disulfid-Brücke wurde die erleichterte Meta-II-Bildung beobachtet. Jedoch konnte weder bei geschlossener noch bei geöffneter Disulfid-Brücke eine G-Protein-Aktivierung beobachtet werden. Diesbezüglich kann demnach geschlossen werden, dass das Vorhandensein der beiden aromatischen Seitenketten von Tyr306 und Phe313 essentiell für die korrekten lichtinduzierten konformativen Änderungen in der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region sind. Desweiteren kann aus der erleichterten Meta-II-Bildung bei Bruch der hydrophoben Brücke abgeleitet werden, dass diese hydrophobe Interaktion bei der Stabilisierung des inaktiven Grundzustandes von Bedeutung ist.

**d) Das NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv besteht aus mehreren Teilmotiven mit verschiedenen Funktionen**

Auf die komplexe Rolle des Y(x)<sub>5,6</sub>F-Motivs bei der Steuerung des Aktivierungsmechanismus sowie bei der Bereitstellung einer Gt-Bindungsstelle wurde bereits oben eingegangen. Die Studien des Meta-Gleichgewichts sowie der Gt-Aktivierung bei N302A und P303A deuten jedoch auf eine gesonderte Funktion dieser konservierten Residuen hin. Bei den Pigmenten 9-dm-N302A und 9-dm-P303A wurde keine erhöhte Meta-II-Bildung gefunden.

Bei 9-dm-N302A und sogar bei 9-dm-E134Q/N302A wurde eine Behinderung des Übergangs zur Meta-II Konformation festgestellt (siehe Abb. 25). In der Rhodopsin-Kristallstruktur von Okada (2004) wurde ein Cluster aus 4 Wasseratomen zwischen den Helices-II, III, VI und VII gefunden, welches die Ausbildung eines komplexen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes ermöglicht. An diesem Netzwerk ist auch die Seitenkette von N302 beteiligt, sowie die Seitenketten D83 (Helix-II), M257 (Helix-VI) und Y301 (Helix-VII). Das Einbringen einer großen aromatischen Seitenkette (M257Y) in diese hydrophile Tasche bewirkt nach Han *et al.* (1998) konstitutive Opsinaktivität und bei zusätzlichem Bruch der Salzbrücke zwischen protonierter Salzbrücke und Gegenion (E113Q/M257Y) wurde konstitutive Dunkelaktivität auch bei Anwesenheit des inversen Agonisten 11-cis-Retinal beobachtet (Kim *et al.*, 2004). Möglicherweise wird das durch die Retinal-Isomerisierung und die Protonentransfers direkt von der Retinal-Bindungstasche kommende Signal über dieses Wasserstoffbrücken-Netzwerk zur cytoplasmatischen Oberfläche (Ausklappen der Helix-VI) des Rezeptors geleitet. Es ist vorstellbar, dass die Seitenkette von Asn302 bei dieser Signalübertragung eine Rolle spielt und ein Fehlen von Asn302 ein Ausklappen der Helix-VI bzw. den Übergang zur aktiven Meta-II Konformation behindert, was die beobachtete verminderte Fähigkeit der Gt-Aktivierung zur Folge hätte. Zu dieser Vorstellung passt auch der Befund, dass bei N302A der Informationsfluß von der cytoplasmatischen Oberfläche zum Protonierungszustand der Schiffbase

unterbunden ist. Bei keinem anderen hier untersuchten 9-dm-Pigment war eine so starke Fixierung des protonierten Zustandes der Schiffbase bei verschiedenen pH-Werten beobachtet worden (Abb. 25). Es ist auch erwähnenswert, dass das an diesem Netzwerk beteiligte Asp83 zwar beim Austausch gegen Asn kaum Änderungen im Phenotyp zeigt (Breikers et al., 2001; DeCaluwe et al., 1995), jedoch für charakteristische Banden im FTIR-Differenzspektrum beim Meta-II Übergang (1767 und 1748 cm<sup>-1</sup>) verantwortlich gemacht wird, die wiederum mit Änderungen von Wasserstoffbindungen erklärt werden (Fahmy et al., 1993).

Bezüglich der Hyperaktivität des P303A-Pigments lässt sich vorstellen, dass durch die Mutation eine für den Aktivierungsmechanismus nötige strukturelle Änderung der siebten Helix vorweggenommen wurde. Im Dunkelzustand ist der cytoplasmatische Teil der siebten Helix durch das Vorhandensein von Pro303 um einen Winkel von ca. 45° abgelenkt. Durch den Alanin-Austausch wird wohl eher eine  $\alpha$ -helikale Struktur der gesamten Helix-VII bevorzugt. Möglicherweise ist die Helix-VII in der aktiven Meta-II-Konformation nicht abgelenkt. Somit wäre das Vorhandensein von Pro303 zur Stabilisierung des Grundzustandes von Rhodopsin von Bedeutung. Eine signifikante Dunkelaktivität von P303A konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Es liegt nahe anzunehmen, dass die enge räumliche Anordnung der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Teilmotive eine koordinative Bedeutung bei der Rezeptoraktivierung hat.

#### **e) Zusammenspiel zwischen Chromophor, NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F- und D(E)RY-Region**

Eine offene Frage ist, wie das aus der Retinal-Isomerisierung des Retinals resultierende Signal zur cytoplasmatischen Oberfläche, insbesondere zum Y(x)<sub>5,6</sub>F-Teilmotiv übermittelt wird. Das Pigment mit der P303A-Mutation bildet normales Meta-II und zeigt Hyperaktivität nach der Belichtung. Prolin an Position 303 bewirkt eine Unterbrechung der  $\alpha$ -helikalen Struktur und in der Kristallstruktur ist ein Abknicken der Helix VII zwischen Chromophor-Bindungsstelle und NPxxY-Motiv zu sehen. Es ist vorstellbar, dass die Isomerisierung des Retinals eine strukturelle Änderung der Helix VII zur Folge hat, die im Falle der P303A-Mutation bereits vorweggenommen ist. Das Einbringen von Ala303 könnte die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix in dieser Region bewirken. Dies wiederum könnte Auswirkungen auf die Stabilität der Salzbrücke zwischen protonierter Schiffbase und Gegenion (Glu113) haben und/oder konformative Determinanten in der D(E)RY- bzw. der NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region lösen und somit eine Hyperaktivität begründen.

Die Rolle eines Wasserstoff-Brücken-Netzwerkes, bei welchem auch die Asn302-Seitenkette involviert ist (Palczewski et al., 2000), bleibt noch zu klären. In der Kristallstruktur von Okada *et al.* (2004) sind 4 Wassermoleküle in unmittelbarer Nähe zur Seitenkette von Asn302 zu finden.

Es ist bekannt, dass strukturelle Änderungen in der D(E)RY-Region, sowie eine Protonenaufnahme (Meta-IIa -> Meta-IIb) für die Interaktion von Rhodopsin mit Transducin erfolgen müssen. (Arnis und Hofmann, 1993; Arnis und Hofmann, 1995; Fahmy et al., 2000). Anhand der vorliegenden Resultate kann geschlossen werden, dass das Signal von der Chromophor-Bindungs-Domäne in Richtung

D(E)RY-Motiv sowie zur NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region übermittelt wird. Eine Kopplung der beiden Regionen erfolgt nicht nur über den Liganden sondern auch direkt miteinander. Dies geht aus den Daten zu den Doppelmutanten mit Alanin-Austausch und zusätzlicher E134Q-Mutation hervor. Bei allen 9-dm-Ala-Mutanten konnte der partielle Agonismus des 9-dm-Retinals durch die E134Q-Mutation kompensiert werden, so dass die erzielten Aktivitäten denen der Pigmente mit 11-*cis*-Retinal entsprachen.

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, wie die Retinal-Bindungs-Tasche, die D(E)RY- sowie die NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Region beim Übergang des Rezeptors zur aktiven Konformation zusammen agieren. Es wurde festgestellt, dass alle drei Regionen an einem konzertierten Aktivierungs-Mechanismus beteiligt sind, welcher Rhodopsin zum Rezeptor der visuellen Kaskade macht.



#### 4. DIE ROLLE DER ACHTEN HELIX DES RHODOPSINS BEI DER INTERAKTION MIT DEM G-PROTEIN

Die Rolle der cytoplasmatischen achten Helix von Rhodopsin und anderen GPCRs bei der Rezeptor-Aktivierung sowie bei der Interaktion mit dem G-Protein ist noch unklar. Um einen übergreifenden Mechanismus bei der Aktivierung des G-Proteins durch einen GPCR zu finden, wurden Studien durchgeführt, bei welchen die achte Helix von Rhodopsin bzw. Teile der achten Helix entfernt (Osawa und Weiss, 1994; Weiss et al., 1994) bzw. durch homologe Sequenzen des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ersetzt wurden (Ernst et al., 2000; Kim et al., 2005; Marin et al., 2000). Diese Studien wurden durch die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen weitergeführt.

Neben den von Marin *et al.* (2000) beschriebenen Pigmenten, die Rhodopsin/ $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor Chimären CTr1, CTr2 und CTr4, wurden in dieser Arbeit noch zwei weitere Pigmente untersucht (siehe Abb. 45). Bei CTr5 wurde das in CTr2 vorkommende Pro311 durch das im Rhodopsin an dieser Stelle präsente Lys311 ersetzt. Mit CTr6 wurde ein Pigment untersucht, bei welchem auch die *Turn*-Region zwischen dem NPxxY-Motiv am cytoplasmatischen Ende der Helix VII und der achten Helix der Aminosäure-Sequenz des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors entspricht (CTr6). Zu beachten ist, dass besagter *Turn* beim  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor um eine Aminosäure verkürzt ist (dargestellt durch ein leeres Feld an Position 308).

	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323
<b>WT</b>	I	M	M	N	K	Q	F	R	N	C	M	V	T	T	L	C	C
<b>CTr1</b>	I	M	M	N	K	Q	F	R	I	A	F	Q	E	L	L	C	C
<b>CTr2</b>	I	M	M	S	P	D	F	R	I	A	F	Q	E	L	L	C	C
<b>CTr4</b>	I	M	M	S	P	D	F	R	N	C	M	V	T	T	L	C	C
<b>CTr5</b>	I	M	M	S	K	D	F	R	I	A	F	Q	E	L	L	C	C
<b>CTr6</b>	C		R	S	P	D	F	R	I	A	F	Q	E	L	L	C	C

**Abb. 45: Aminosäure-Sequenz der Helix 8 von bovinem Rhodopsin und der rekombinanten CTr-Pigmente**

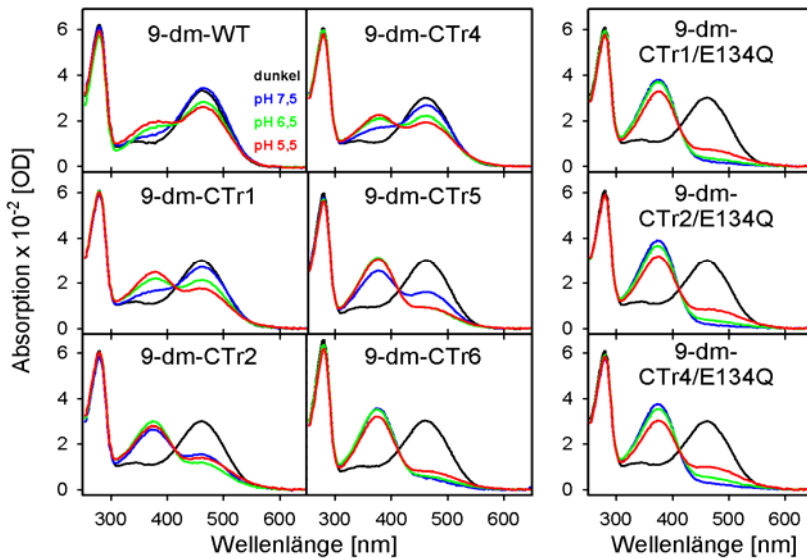
Die Aminosäure-Sequenz der Helix 8 ist im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Blau schattiert sind die Aminosäurereste der Helix 8 des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors.

Anhand eines Sequenz-Vergleichs bei 86 Vertebraten-Opsinen (Marin *et al.* 2000) wurde festgestellt, dass der N-terminale Teil der achten Helix (Asn310 bis Arg314 sowie Cys316) zu fast 100 % konserviert ist, während Asn315 sowie der Bereich von Met317 bis Leu321 nur zu ca. 65 % konserviert sind.

Im Vergleich zum Wildtyp wurden bis auf CTr6 keine signifikanten Abweichungen bei der Expressions-Ausbeute aller untersuchten CTr-Opsine gefunden. Die Expressions-Ausbeute von CTr6 lag bei nur 20-25 %. Nach Rekonstitution mit dem nativen Chromophor 11-*cis*-Retinal zeigten alle CTr-Pigmente ein dem Wildtyp entsprechendes Absorptionsmaximum bei 500 nm im unbelichteten Zustand und ein Absorptionsmaximum von 380 nm nach der Belichtung (Spektren nicht gezeigt).

#### 4.1. pH-abhängiges Meta-I/Meta-II Gleichgewicht der untersuchten 9-dm-Pigmente

Um den Einfluss der Mutationen auf die Aktivierung zu studieren, wurden die CTr-Opsine mit dem partiellen Agonisten 9-dm-Retinal rekonstituiert. In Abb. 46 sind UV/Vis-Spektren der 9-dm-CTr-Pigmente bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Anhand der Verschiebung des Absorptionsmaximums nach Belichtung kann der Einfluss der Mutation auf das Meta-Gleichgewicht beobachtet werden.



**Abb. 46: UV/Vis-Spektren zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Meta-Gleichgewichts bei den CTr-Pigmenten mit 9-dm-Retinal**

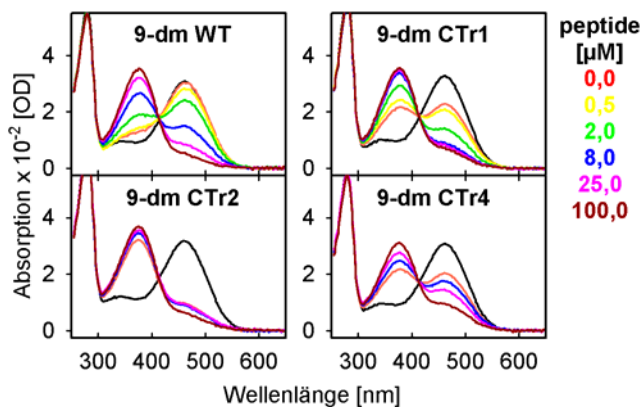
Dargestellt sind UV/Vis-Spektren der 9-dm-CTr-Pigmente im Vergleich zum 9-dm-Wildtyp (links). Rechts: Spektren von Pigmenten mit zusätzlicher E134Q-Mutation. Die Spektren wurden vor (schwarz) und nach Belichtung mit orangem Licht ( $\lambda > 460$  nm) bei pH 7,5 (blau), pH 6,5 (grün) und pH 5,5 (rot) bei 20 °C und 0,03 % DM aufgezeichnet. Der pH-Wert hatte keinen Einfluss auf die Spektren vor Belichtung.

Die Spektren von 9-dm-CTr1 und 9-dm-CTr4 entsprechen den Beobachtungen bei 9-dm-Wildtyp. Bei niedrigem pH-Wert (pH 5,5) wird das Meta-Gleichgewicht hin zur aktiven Meta-II-Konformation verschoben, gekennzeichnet durch eine Erhöhung der Absorption bei 380 nm. Somit hat der Austausch des C-terminalen Teils der achten Helix (Position Asn315 bis Lys321 bei CTr1) sowie des kleinen Fragmentes Asn310-Gln312 (CTr4) keine Auswirkungen auf den Protonierungszustand der Schiffbase während der Aktivierung. Wurden jedoch beide Segmente gleichzeitig ausgetauscht (Austausch von Asn310 bis Lys321 bei 9-dm-CTr2), dann wird das Erreichen der aktiven Meta-II-Konformation erleichtert. Dies wird auch bei 9-dm-CTr5 und 9-dm-CTr6 beobachtet, bei welchen auch praktisch (bis auf Lys311 bei CTr5) die gesamte achte Helix gegen die achte Helix des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors ausgetauscht wurde. Zudem ist zu beobachten, dass verglichen mit den Spektren bei pH 7,5 (bzw. pH 6,5 bei 9-dm-CTr5) keine weitere Verschiebung des Gleichgewichts bei pH 5,5 bei diesen Pigmenten zu beobachten ist. Dies könnte mit einer vereinfachten Reprotonierung der Schiffbase bei diesen Pigmenten erklärbar sein (in Analogie zu 5.2.2). Meta-II mit reprotonierter Schiffbase ( $\lambda_{\text{max}}=470$  nm) bei tiefem pH kann auch bei den Pigmenten 9-dm-CTr1/E134Q, 9-dm-CTr2/E134Q und 9-dm-CTr4/E134Q beobachtet werden, bei welchen zusätzlich noch die E134Q Mutation eingefügt wurde (siehe Meyer et al., 2000). Bei diesen Pigmenten ist das Meta-

Gleichgewicht nach der Bleichung komplett auf die Seite der aktiven Meta-II-Konformation verschoben, jedoch nimmt die Absorption bei 470 nm mit Erhöhung der Protonen-Konzentration zu.

#### 4.2. Bindungsassay mit $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid und Transducin-Aktivierung

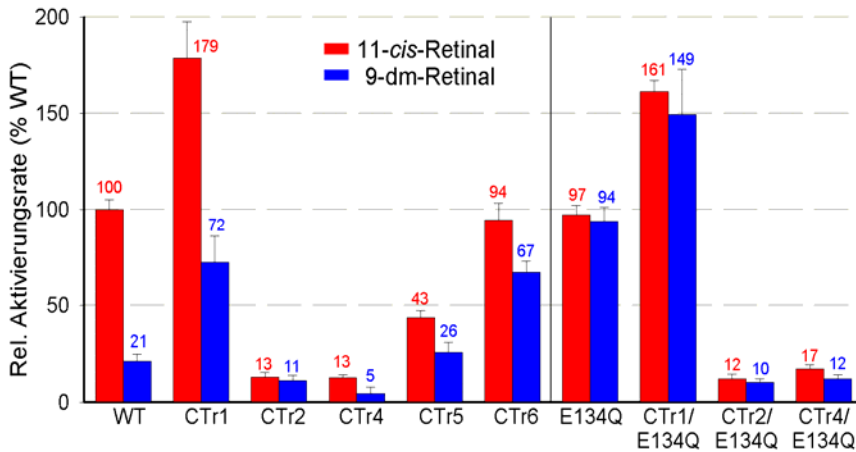
Im folgenden wurde untersucht, ob die Meta-II-ähnliche Konformation der 9-dm-CTR-Pigmente durch die Anwesenheit des hochaffinen  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid-Analogons beeinflusst wird. Die Meta-II-Stabilisierung durch das Peptid ist für die Pigmente 9-dm-CTR1, 9-dm-CTR2 und 9-dm-CTR4 im Vergleich zum 9-dm-Wildtyp in Abb. 47 dargestellt.



**Abb. 47: UV/Vis Spektren der Pigmente 9-dm-Wildtyp, 9-dm-CTR1, 9-dm-CTR2 und 9-dm-CTR4 in Anwesenheit von  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid**  
Gezeigt sind Spektren des 9-dm-Wildtyp sowie der 9-dm-CTR-Pigmente (0,7  $\mu$ M) in Anwesenheit des  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptids vor (schwarz), sowie nach 15 s Belichtung mit orangem Licht bei steigender Peptidkonzentration (farbige Spektren). Es wurde in 50 mM BTP, pH 7,5, 130 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 0,03 % (w/v) DM bei 20 °C gemessen.

Der Assay wurde unter den selben Bedingungen durchgeführt bei denen auch die Transducin-Aktivierung untersucht wurde. Durch die Anwesenheit von 130 mM NaCl und 1 mM  $MgCl_2$  wird die Bildung der Meta-II-ähnlichen Spezies begünstigt (vergl. Abb. 46). Wird die für 9-dm-Meta-I-typische Absorption bei 465 nm verglichen, so ergaben sich als  $EC_{50}$  Werte für die Meta-II-Stabilisation: 2-3  $\mu$ M für 9-dm-CTR1 gegenüber 8  $\mu$ M für 9-dm-Wildtyp. Trotz der stärkeren Affinität des  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptids zu 9-dm-CTR1 verblieb ein Teil des Rezeptors mit protonierter Schiffbase, sichtbar anhand der Schulter bei 465 nm. Letzteres gilt auch für 9-dm-CTR4, bei welchem ein  $EC_{50}$ -Wert von > 50  $\mu$ M Peptid ermittelt wurde. Bei 9-dm-CTR2 konnte kein  $EC_{50}$ -Wert angegeben werden, da auch ohne Peptid fast alle Pigmente nach Belichtung in Meta-II-ähnlicher Konformation vorliegen. Die gefundene 9-dm-Meta-II-Stabilisierung beim 9-dm-CTR4-Rezeptor erscheint als Widerspruch zu dem in Ernst *et al.* (2000) gezeigten Rückschussexperiment. Hierbei wurde verfolgt, wie das belichtete Pigment durch Absorption eines blauen Photons ( $\lambda=412 \pm 7$  nm) wieder eine dem Ausgangszustand ähnliche Konformation erreicht. Im Vergleich zum Wildtyp konnten bei 9-dm-CTR4 in Ernst *et al.* 200  $\mu$ M  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid die Photoregeneration aus der Meta-II-Konformation nicht verhindern.

In Abb. 48 ist die katalytische Aktivität der untersuchten CTr-Pigmente gezeigt. Die Pigmente wurden mit 11-*cis*-Retinal (rot) bzw. mit 11-*cis*-9-dm-Retinal (blau) regeneriert. Außerdem wurde untersucht, ob sich der Verlust der Aktivität bei CTr2 und CTr4 durch die zusätzliche Einführung der E134Q-Mutation kompensieren lässt.



**Abb. 48: Lichtabhängige Transducin-Aktivierungsraten der CTr-Pigmente**  
Die Opsine wurden mit 11-*cis*-Retinal (rot) oder mit 9-dm-Retinal (blau) regeneriert. Die Gt-Aktivierungsraten sind relativ zur Aktivierungsrate des 11-*cis*-Wildtyps dargestellt (Werte über den Säulen in %)

Die gegenüber dem Wildtyp erhöhte Affinität des Gt $\alpha$ (340-350)HAA Peptids zum CTr1-Pigment, bei welchem der C-terminale Teil der achten Helix (Aminosäurereste 315-321) der Sequenz des  $\beta$ -adrenergen Rezeptor entspricht, spiegelt sich in einer fast doppelt so hohen Aktivität bezüglich des Nukleotid-Austausches im Transducin wieder. Auch die Aktivität des 9-dm-CTr1-Pigments ist gegenüber dem 9-dm-Wildtyp von 21 % auf 72 % angehoben. Die zusätzliche E134Q-Mutation restauriert die Aktivität auf das Niveau des Pigments mit 11-*cis*-Retinal.

Trotz des hohen Meta-II Anteils bei 9-dm-CTr2 konnte nur eine minimale katalytische Aktivität (13 %) bei diesem Rezeptor gemessen werden. Schon der Dreifachaustausch N310S/K311P/Q312D bei CTr4 bewirkt diesen massiven Aktivitätsverlust (13 %). Bei beiden Rezeptoren bewirkt auch die zusätzliche E134Q-Mutation keine signifikante Steigerung der katalytischen Aktivität. Eine Steigerung der Aktivität auf 43 % wurde bei CTr5 erreicht, indem, bezogen auf die CTr2-Mutante, das Pro311 des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors gegen das bei Rhodopsin an dieser Position befindliche Lysin rückgetauscht wurde. Bemerkenswert ist, dass bei Ersatz der kompletten Helix 8 inklusive des Verbindungsstücks durch die homologe, um eine Aminosäure verkürzte Sequenz des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors mit ca. 94 % wieder fast Wildtyp-Aktivität erzielt wurde. Selbst bei Anwesenheit des partiellen Agonisten 9-dm-Retinal erreicht dieser Rezeptor ca. 67 % der Wildtyp-Aktivität.



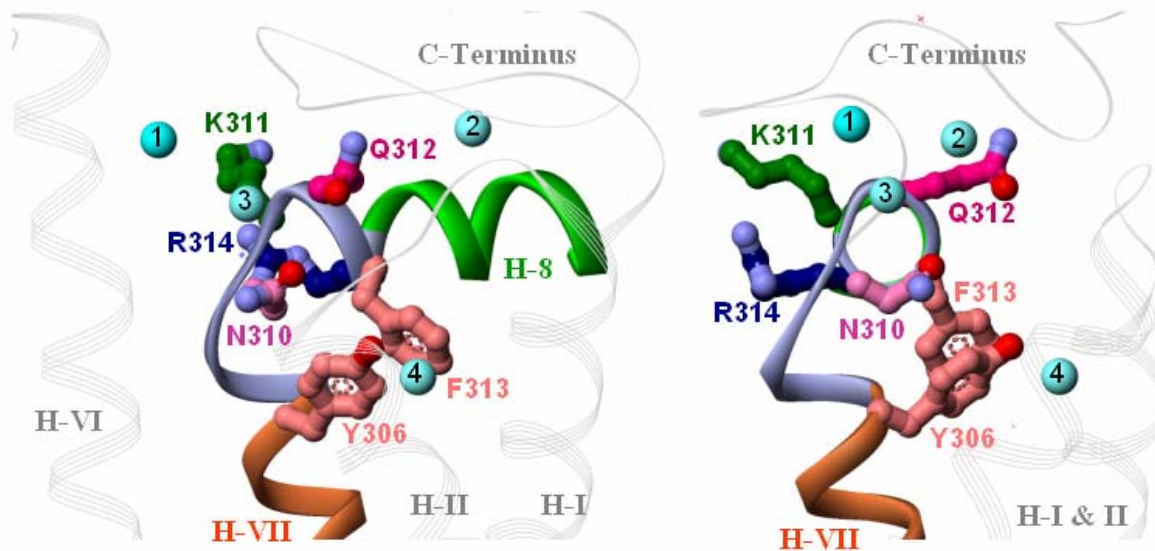
### 4.3. Diskussion

Die Interaktion von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR) mit dem G-Protein steht im Fokus der in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen. Frühere Studien belegten, dass der zweite und dritte cytoplasmatische *Loop* bei der Bildung eines Komplexes mit Gt involviert sind (Franke et al., 1990; Franke et al., 1992; König et al., 1989). Demgegenüber gab es widersprüchliche Resultate bezüglich der Rolle der Helix 8 bei der Interaktion mit Gt. Für eine Beteiligung an der Interaktion sprechen Studien, bei denen Peptide mit homologer Sequenz zur achten Helix die Meta-II-Stabilisierung durch Gt inhibierten (König et al., 1989), die Rhodopsin-stimulierte GTPase-Aktivität von Gt beeinflussten (Takemoto et al., 1986) sowie direkt an eine Fluoreszenz-markierte  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit banden und somit die Interaktion mit dem Rhodopsin verhinderten (Phillips und Cerione, 1992). Auch bei Studien, bei welchen die achte Helix bzw. Teile dieser Helix durch homologe Sequenzen des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors ersetzt wurden, gab es klare Indizien für eine Beteiligung dieser Region an der Interaktion mit Gt (Ernst et al., 2000; Kim et al., 2005; Marin et al., 2000). Andererseits publizierten Weiss *et al.* (1994), dass eine Trunkierung des C-terminalen Endes nach Cys316 die Katalyse des Nukleotidaustausches im Gt nicht beeinträchtigt. Auch bei Pigmenten mit Einzel- und Doppelmutationen im N-terminalen Teil der achten Helix im Bereich von Asn310 bis Asn315 wurden anhand von Bindungsassays mit Nitrozellulose-Filtern (mit Membranproben) keine signifikanten Abweichungen von der Wildtyp-Aktivität gefunden (Osawa und Weiss, 1994). Im Widerspruch dazu stehen die in dieser Arbeit erhobenen fluoreszenzspektroskopischen Aktivierungsdaten, bei welchen für solubilisierte Pigmente mit einer N310A- bzw. F313A-Mutation eine Aktivität von 41 % bzw. 5 % bezogen auf die Wildtypaktivität festgestellt wurde. Auch in einer Publikation von Cai *et al.* (1999) wurde beschrieben, dass in dieser Region ein Austausch von Aminosäureresten gegen Cystein starke Einschränkungen der katalytischen Aktivität des Rezeptors mit sich bringt (I307C, M309C, N310C oder M317C).

Wie bereits erwähnt wurden auf der Suche nach einem übergreifenden Mechanismus für die Aktivierung von G-Protein-aktivierenden-Rezeptoren Rezeptor-Chimären untersucht, bei welchen Teile des Opsins durch homologe Sequenzen des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors ersetzt wurden. In Anlehnung an die Nomenklatur von Marin *et al.* (2000) wurden auch die in dieser Arbeit untersuchten Pigmente benannt (CTr1, CTr2, CTr4) und um zwei weitere Pigmente erweitert, bei welchen zum einen die Rolle von Lysin bzw. Prolin an Position 311 untersucht wurde (CTr5) sowie die *Loop*-Region zwischen Helix VII und der achten Helix in die Untersuchung mit einbezogen wurde (CTr6, siehe Abb. 45).

In Abb. 49 ist eine dreidimensionale Struktur der Region der achten Helix dargestellt. Bereits 2000 wurde von Palczewski *et al.* anhand der Rhodopsin -Kristallstruktur festgestellt, dass sich der Bereich

von Asn310 bis hin zu den palmylierten Aminosäureresten Cys321 und Cys322 als  $\alpha$ -Helix anordnet. Das Protein-Rückgrat des wie nachfolgend diskutiert für die Gt-Aktivierung wichtigen Teils des Proteins (Ile307 bis Arg314) ist blau hervorgehoben und die Seitenketten des N-terminalen Teils der achten Helix (Asn310, Lys311, Gln312, Phe313 und Arg314) sowie Tyr306 sind dargestellt. Außerdem sind auch die in der Kristallstruktur gefundenen Wassermoleküle (Nr. 1-4) gezeigt.



**Abb. 49: Dreidimensionales Modell der Region der Helix-8 von bovinem Rhodopsin**

Gezeigt ist die Region der achten Helix als Draufsicht (links) sowie als Seitenansicht (rechts). Der Proteinrückgrat der Helix VII ist rot, des Bereichs von Ile307 bis Arg314 blau und der Teil von Asn310 bis Leu321 grün dargestellt. Weiterhin sind Seitenketten der Aminosäurereste Tyr306, Asn310, Lys311, Gln312, Phe313 und Tyr306 sowie die Position von Wassermolekülen (hellblaue Kugeln 1-4) hervorgehoben. Basis des dargestellten Modells ist die mit 2,2 Å aufgelöste Kristallstruktur von Rhodopsin (1U19, Okada et al., 2004). (Zur Zuordnung der CTr-Mutanten siehe Abb. 45 auf Seite 87.)

#### a) Kontrolle der Meta-II-Bildung durch die achte Helix

Bei den mit 11-*cis*-Retinal regenerierten CTr-Pigmenten wurde wie beim Wildtyp nach Belichtung eine vollständige Verschiebung des Absorptionsmaximums von 500 nm auf 380 nm im UV/Vis-Spektrum beobachtet. Erst bei den 9-dm-CTr-Pigmenten waren Unterschiede zu erkennen.

Bei den UV/Vis-Spektren aller untersuchter 9-dm-CTr-Pigmente ist anhand des Protonierungszustandes der Schiffbase verglichen mit 9-dm-WT eine Verschiebung des Meta-Gleichgewichts in Richtung der aktiven Meta-II-Konformation zu beobachten. Dieser Effekt ist beim Austausch des C-terminalen Teils der achten Helix (CTr1) sowie des kleinen NKQ-Fragments im N-terminalen Bereich (CTr4) nur leicht ausgeprägt, beim Austausch größerer Fragmente (CTr2, CTr5, CTr6) dagegen stark. Eine solche Verschiebung des 9-dm-Meta-Gleichgewichts wurde bereits bei den Pigmenten 9-dm-F313A und 9-dm-Y306A sowie durch andere Mutationen im *Turn*-Bereich zwischen Helix-VII und Helix-8 (M309A und N310A, siehe Abb. 43) festgestellt. Für 9-dm-F313A und 9-dm-Y306A wurde dieser Befund so interpretiert, dass durch den Verlust der hydrophoben Interaktion von Phe313 mit Tyr306 (im NPxxY-Motiv der Helix VII) weniger Energie aus dem Retinalisomerisierungsprozess auf das Protein übertragen werden muss um eine Meta-II-ähnliche

Konformation zu erreichen. Auch bei den anderen genannten Pigmenten könnte aufgrund sterischer Änderungen durch die Mutationen die korrekte Ausrichtung der achten Helix und mit dieser die Ausrichtung der aromatischen Seitenkette von Phe313 gestört worden sein, wodurch die Bildung einer Meta-II-ähnlichen Konformation erleichtert wird. Dieser Befund unterstreicht noch einmal die Bedeutung der achten Helix beim Mechanismus der Aktivierung bzw. bei der Fixierung der Dunkel-Konformation von Rhodopsin.

#### **b) Beitrag der Helix 8 zu einer Bindungsstelle für Transducin**

Frühere Arbeiten zeigten, dass Modifikationen bzw. auch eine Trunkierung des C-terminalen Teils der achten Helix kaum Einschränkungen der Fähigkeit, Transducin zu aktivieren, zur Folge hat (Marin et al., 2000; Weiss et al., 1994). Dies konnte insofern bestätigt werden, als dass der Austausch gegen die homologe Sequenz des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors sogar eine Aktivitätssteigerung um fast 80 % (bei CTr1, in Abb. 49 grün hervorgehoben) bewirkte.

Dagegen bewirkte der Austausch von nur drei Aminosäureresten N310S/K311P/Q312D im N-terminalen Teil der achten Helix (bei CTr2 und CTr4) einen fast vollständigen Aktivitätsverlust, der auch durch die Einführung der zusätzlichen E134Q-Mutation nicht aufgehoben werden konnte. Durch den Austausch wurde zum einen mit Q312D eine potentiell geladene Seitenkette eingebracht, zum anderen kann der Austausch des polaren Lys311 gegen eine unpolare Prolin-Seitenkette sterische Änderungen und damit den Aktivitätsverlust zur Folge gehabt haben. Prolin könnte an dieser Stelle eine Störung der Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix bewirken. Ein Rezeptor mit alleinigem Austausch von Lys311 gegen Prolin zeigt nach Marin *et al.* (2000) jedoch keine signifikante Abweichung von der Wildtyp-Aktivität. Auch der Austausch von Asn310 könnte von Bedeutung sein, diese Seitenkette wurde von Altenbach *et al.* (1999) anhand einer EPR-Studie als sehr immobil klassifiziert und ein Rezeptor mit N310C-Mutation zeigte keine Transducin-Aktivierung mehr (Cai et al., 1999). In dieser Arbeit wurde für N310A eine Aktivität von 40 % verglichen mit dem Wildtyp ermittelt (Abb. 44).

Fast vollständige Aktivität (94 % vom Wildtyp) wurde bei dem CTr6-Rezeptor gefunden, bei welchem die komplette achte Helix inklusive des Verbindungs-*Turns* durch die homologe, um einen Rest kürzere Sequenz des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors ersetzt wurde. Die bei CTr2 und CTr4 gefundene Aktivitätsverlust wurde somit durch die Verkürzung des Verbindungs-*Turns* und/oder die Einführung eines basischen Aminosäurerestes (Arginin) aufgehoben. Erwähnenswert ist auch, dass sich der bei der Bindungsstudie mit  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid beobachtete hohe Anteil an 9-dm-Meta-II in relativ hohen Aktivierungsraten für 9-dm-CTr5 und 9-dm-CTr6 widerspiegelt. Hier werden also selbst bei Anwesenheit des partiellen Agonisten 9-dm-Retinal hohe Aktivierungsraten erreicht. Verglichen mit den jeweiligen 11-*cis*-Pigmenten wurden für 9-dm-CTr5 und 9-dm-CTr6 Aktivitäten von mehr als 70 % gemessen. Bei 9-dm-Rhodopsin sind das nur ca. 20 %.

Diese Befunde untermauern die aktive Beteiligung der achten Helix bei der Interaktion mit Transducin. Der erleichterten Meta-II-Bildung bei den Pigmenten CTr2 und CTr4 steht ein starker

Aktivitätsverlust gegenüber. Analog zu den Betrachtungen zum  $Y(x)_{5,6}F$ -Teilmotiv des  $NPxxY(x)_{5,6}F$ -Motivs deutet dies auf eine Störung einer Gt-Bindungsstelle durch die Mutationen hin. Im Gegensatz dazu ist die Bindungsstelle bei CTr1, CTr5 und CTr6 intakt geblieben, was sich in einer Umsetzung der erleichterten Meta-II-Bildung zu hohen Aktivierungsraten auch mit 9-dm-Retinal widerspiegelt.

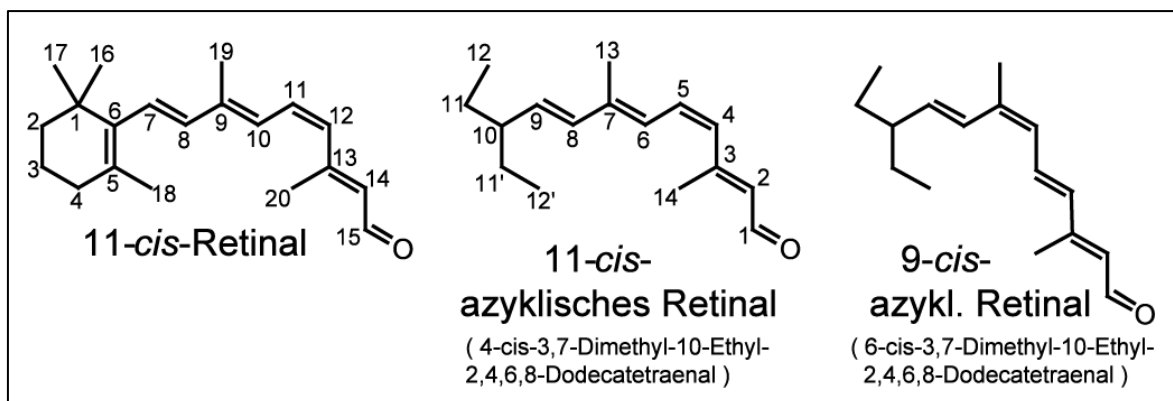
**c) Bedeutung der gefundenen voll funktionsfähigen Rezeptorchimäre**

Anhand der untersuchten Rezeptorchimäre CTr6 konnte gezeigt werden, dass der Aktivierung eines G-Proteins durch einen GPCR ein übergreifender Mechanismus zugrunde liegt, da selbst der Austausch der kompletten Helix-8 des Rhodopsins (15 Aminosäurereste von Ile307 bis Leu321) gegen die homologe Sequenz des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors keine signifikante Einschränkung der Fähigkeit der Katalyse des Nukleotid-Austauschs am Transducin bewirkte. Bereits unter 3.13b wurden Hinweise diskutiert, die für eine Bindung der Lipid-modifizierten Gt-Domänen (myristylierter  $G\alpha$ -N-Terminus und farnesylierter  $G\gamma_1$ -C-Terminus) in der hydrophoben, Membran-zugewandten Region zwischen Helix-VII und Helix-I sprechen. Die Funktionalität der Rezeptorchimäre weist auf eine geringe Spezifität der bindenden Gt-Domäne hin, was auch im Einklang mit der gängigen Meinung ist, dass der C-Terminus der  $G\alpha$ -Untereinheit die Rezeptorspezifität determiniert.

## 5. ROLLE DES RETINAL-RINGS BEI DER RHODOPSIN-AKTIVIERUNG

Die visuelle Signaltransduktion in der Stäbchenzelle wird durch die Absorption eines Photons durch den Chromophor des Rhodopsins, das 11-*cis*-Retinal, initiiert, gefolgt von einer *cis/trans* Isomerisierung der Polyenkette des Retinals. Dabei wird angenommen, dass die Ringstruktur des Retinals benötigt wird, um die Energie des absorbierten Photons in konformative Änderungen des Rezeptors umzusetzen, bis hin zum aktiven mit dem G-Protein interagierenden Meta-II-Intermediat des Rhodopsins.

Im folgenden wird die Rolle der Ring-Struktur des Retinals anhand eines azyklischen Retinals studiert, bei welchem 4 Kohlenstoff-Atome des Retinal-Rings sowie die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoff-Atomen C5 und C6 fehlen (siehe Abb. 50).



**Abb. 50: Struktur der azyklischen Retinale im Vergleich zu 11-*cis*-Retinal**

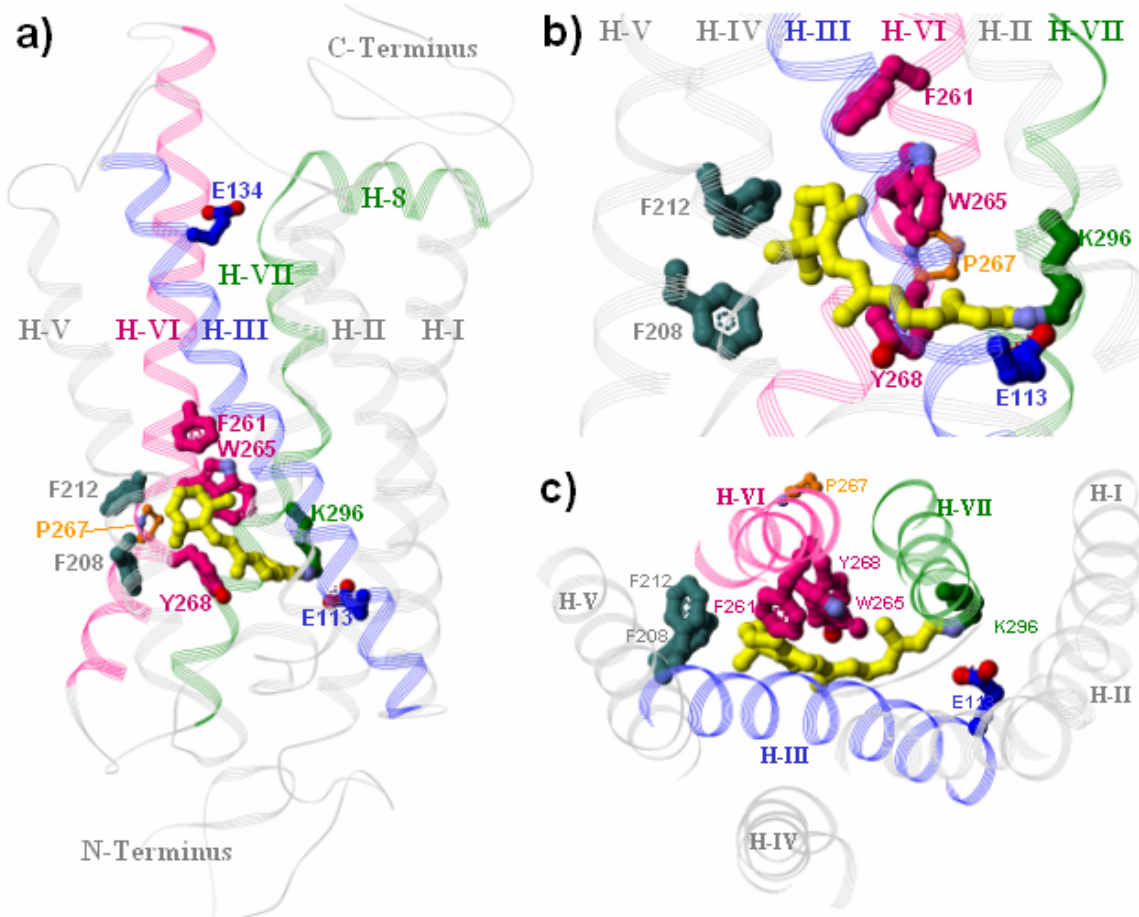
11-*cis*-Retinal, 4-*cis*-3,7-Dimethyl-10-Ethyl-2,4,6,8-Dodecatetraenal (11-*cis*-azyklisches Retinal) und 6-*cis*-3,7-Dimethyl-10-Ethyl-2,4,6,8-Dodecatetraenal (9-*cis*-azyklisches Retinal)

Bereits 1983 wurde von Crouch *et al.* festgestellt, dass ein intakter  $\beta$ -Ionon-Ring nicht essentiell ist für die Bildung eines stabilen Pigments. Weiterhin publizierte diese Arbeitsgruppe Studien am 9-*cis*-azyklischen Retinal, in welchen sie zeigten, dass das Retinal nur bei Vorhandensein der 12- und 12'-Methylgruppen im Rezeptor verbleibt und das gebildete Pigment im Dunkeln auch bei Anwesenheit von Hydroxylamin, welches mit zugänglichem Retinal Retinaloxim bilden kann, stabil bleibt. Bezüglich des Retinal-Rings klassifizierten sie die Struktur des 9-*cis*-azyklischen Retinals als „Minimal-Struktur“ des Retinals (Crouch und Or, 1983). Allerdings konnte anhand von UV/Vis-Spektren nach Belichtung dieser Rezeptoren bei pH 4,5 und 20 °C kein Übergang zur aktiven Meta-II-Konformation beobachtet werden (Renk und Crouch, 1989). Ähnliche Resultate bezüglich des 9-*cis*-azyklischen Retinals wurden 1994 von Jäger *et al.* publiziert. Weiterführende Experimente an regenerierten Disk-Membranen zeigten eine Aktivität von 18 % verglichen mit der Transducin-Aktivierung von Disk-Membranen mit 11-*cis*-Retinal. Nach Solubilisierung der regenerierten Membranen in Detergens wurde jedoch ein vollständiger Aktivitätsverlust festgestellt (Jäger *et al.*, 1994). Weiterhin wurde von Karnaukhova (1999) ein azyklisches Retinal untersucht, bei welchem das hier gezeigte 11-*cis*-azyklische Retinal um je eine Methylgruppe an C11 und C11' sowie eine Doppelbindung zwischen C10-C11 erweitert wurde. Die mit diesem Retinal regenerierten Rezeptoren

zeigten in einem Phosphodiesterase-Assay (PDE-Assay) eine Aktivität von 80 % verglichen mit der Wildtyp-Aktivität.

Bezüglich der Funktion des  $\beta$ -Ionon-Ringes während des Aktivierungsmechanismus des Rhodopsins gibt es allerdings widersprüchliche Befunde. Die vorherrschende Meinung ist diesbezüglich dass ein vollständiger Ring für die Verspannung des Retinals in der Bindungstasche während des Aktivierungsprozesses essentiell ist.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Studien sprachen für starke Interaktionen zwischen den C-16/C-17-Methylgruppen mit der Bindungstasche (Spooner et al., 2004; Spooner et al., 2003) während der Aktivierung bis hin zu Meta-II, was so gedeutet wurde, dass der Retinal-Ring durch die Nähe zur Helix-VI aktiv an den konformativen Änderungen des Proteins teilnimmt. Für eine starke Veränderung der Position des  $\beta$ -Ionon-Rings während der Aktivierung sprachen hingegen Quervernetzungsstudien, nach denen der Ring beim Übergang von Batho- nach Lumirhodopsin von der Position bei TRP265 (Helix-VI) in Richtung Ala169 (Helix-IV) umklappt (Borhan et al., 2000).

In Abb. 51 ist ein Modell von bovinem Rhodopsin bzw. der Region der Retinalbindungstasche abgebildet.



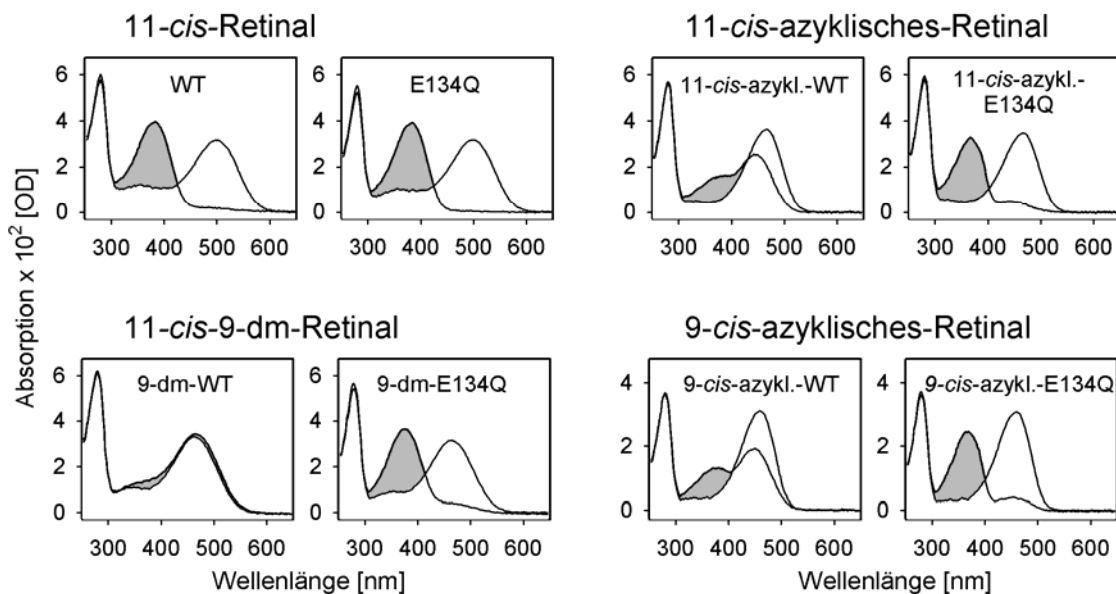
**Abb. 51: Dreidimensionales Modell der Retinal-Bindungstasche**

Gezeigt ist (a) die Seitenansicht von bovinem Rhodopsin bzw. (b) der Retinalbindungstasche sowie (c) eine Sicht auf die Retinalbindungstasche von der cytoplasmatischen Seite. Hervorgehoben sind Seitenketten von Aminosäureresten, die für die Fixierung des Retinal-Rings von Bedeutung sind sowie Seitenketten, die bei der Rezeptor-Aktivierung eine Rolle spielen (zur näheren Erläuterungen siehe Text). Basis des dargestellten Modells ist die Kristallstruktur von Rhodopsin mit 2,2 Å Auflösung (1U19, Okada et al., 2004).

Das Retinal (gelb) ist mittels protonierter Schiffbase kovalent an das in der Helix-VII befindliche Lys296 (grün hervorgehoben) gebunden. Die Schiffbase wird durch das in Helix-III befindliche Gegenion Glu113 (blau) stabilisiert. Der Chromophor-Ring ist durch einen in Helix-VI vorkommenden konservierten "aromatischen Cluster" bestehend aus Pro261, Trp265 und Tyr268 (rot hervorgehoben) sowie zwei weitere aromatische Seitenketten der Helix-V: Phe208 und Phe212 (grau) fixiert. Pro267 (orange) in Helix-VI verhindert die Fortsetzung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur und ermöglicht das Herausklappen des cytoplasmatischen Teils der Helix-VI (Hubbell et al., 2003; Menon et al., 2001). Glu134 (blau) am cytoplasmatischen Ende der Helix-III ist Teil des hochkonservierten E(D)RY-Motivs, welches mit Seitenketten der Helix-VI interagiert und für Protonen-Transfer-Reaktionen verantwortlich gemacht wird, die essentiell für den späten Aktivierungsprozess sind.

### 5.1. UV/Vis-Spektroskopie zum Einfluss des Retinals auf das Meta-I/Meta-II Gleichgewicht

In Abb. 52 sind zum Vergleich die UV/Vis-Spektren von gereinigtem Wildtyp sowie der E134Q-Mutante mit nativem 11-*cis*-Retinal, 9-dm-Retinal, 11-*cis*-azyklischem Retinal oder 9-*cis*-azyklischem Retinal gezeigt.



**Abb. 52: UV/Vis-Spektren von Wildtyp-Rhodopsin und der E134Q-Mutante mit 11-*cis*-Retinal, 9-dm-Retinal, 9-*cis*-azyklischem und 11-*cis*-azyklischem Retinal**  
Gezeigt sind Spektren vor der Belichtung (nicht schattiert) und danach (schattiert) bei pH 7,5 und 20 °C.

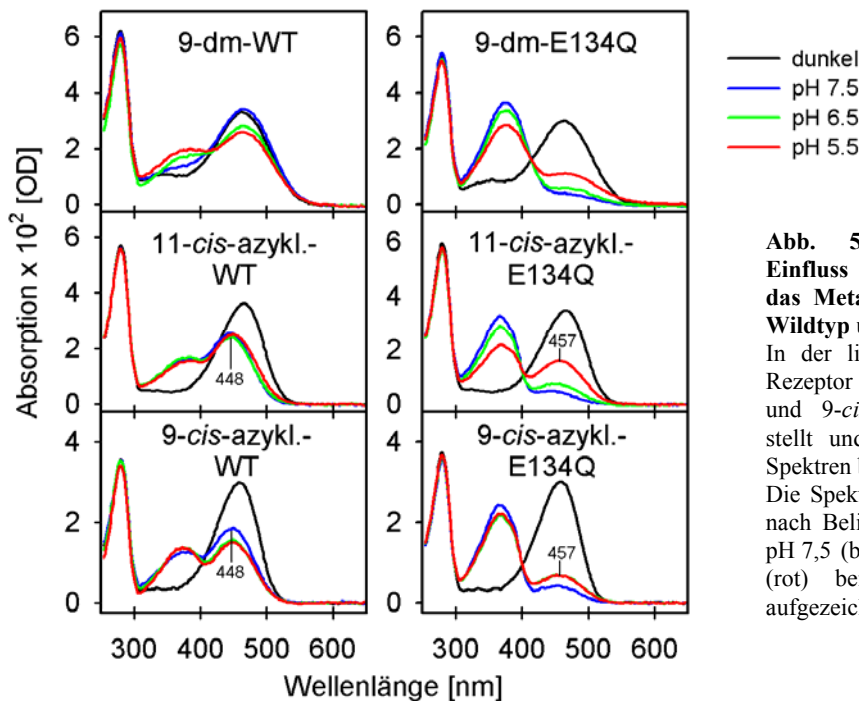
Aus der Arbeit von Meyer *et al.* (2000) ist bekannt, dass durch das Fehlen der Methylgruppe am C9-Atom des Retinals der Wildtyp-Rezeptor nach Belichtung in der Meta-I-Konformation verbleibt (siehe 3.2). Erst durch die E134Q-Mutation wird dieser Effekt wieder aufgehoben und die aktive Meta-II-Konformation erreicht (s. Abb. 52), was sich in der katalytischen Fähigkeit bezüglich des Nukleotidaustausches am Transducin widerspiegelt. Ein ähnliches Verhalten war beim Wildtyp-Rezeptor mit azyklischem Retinal (9-*cis*-, wie auch 11-*cis*-) zu beobachten, bei welchem sich nach der



Belichtung das Absorptionsmaximum von 468 nm nach 448 nm nur leicht verschob. Es war allerdings auch eine Absorptionssteigerung bei ca. 366 nm erkennbar, was für einen Anteil an Rezeptoren mit azyklischem Retinal und deprotonierter Schiffbase (also azykl.-Meta-II) spricht. Bemerkenswert ist, dass das Fehlen der C9-Methylgruppe einen größeren Einfluss auf das Meta-I/Meta-II-Gleichgewicht hat, als die starke Modifizierung des  $\beta$ -Ionon-Rings.

Bei der E134Q-Mutante mit azyklischem Retinal wird nach Belichtung das Absorptionsmaximum von 468 nm im wesentlichen nach 369 nm verschoben, nur ein kleiner Teil verbleibt mit protonierter bzw. - bei stark erniedrigtem pH-Wert - reprotonierter Schiffbase (Absorption bei ca. 455 nm).

Die mittels FTIR-Spektroskopie ermittelte Verschiebung des Meta-Gleichgewichts des belichteten Wildtyp-Rezeptors mit azyklischem Retinal nach Meta-II bei Erniedrigung des pH (siehe Bartl *et al.* 2005) ist in der UV/Vis-Spektroskopie nicht direkt ersichtlich (siehe Abb. 53).



**Abb. 53: UV/Vis-Spektren zum Einfluss des azyklischen Retinals auf das Meta-I/Meta-II-Gleichgewicht bei Wildtyp und E134Q**  
 In der linken Spalte ist der Wildtyp-Rezeptor mit 9-dm-Retinal sowie 11-*cis*- und 9-*cis*-azyklischem Retinal dargestellt und in der rechten Spalte sind Spektren bei E134Q-Mutante gezeigt. Die Spektren wurden vor (schwarz) und nach Belichtung mit orangem Licht bei pH 7,5 (blau), pH 6,5 (grün) und pH 5,5 (rot) bei 20 °C und 0,03 % DM aufgezeichnet.

Im Gegensatz zum 9-dm-Wildtyp ist beim Wildtyp mit azyklischem Retinal kaum eine pH-Abhängigkeit des belichteten Rezeptors im UV/Vis-Spektrum zu beobachten. Eine Erklärung dafür ist eine Überlagerung zweier pH-abhängiger gekoppelter Gleichgewichte: zum einen das Gleichgewicht zwischen den Meta-I- und Meta-II-ähnlichen Spezies und zum anderen zwischen deprotonierter (azykl.-Meta-II) und einer Meta-II-ähnlichen Spezies mit reprotonierter Schiffbase (azykl.-Meta-II<sub>PSB</sub>).



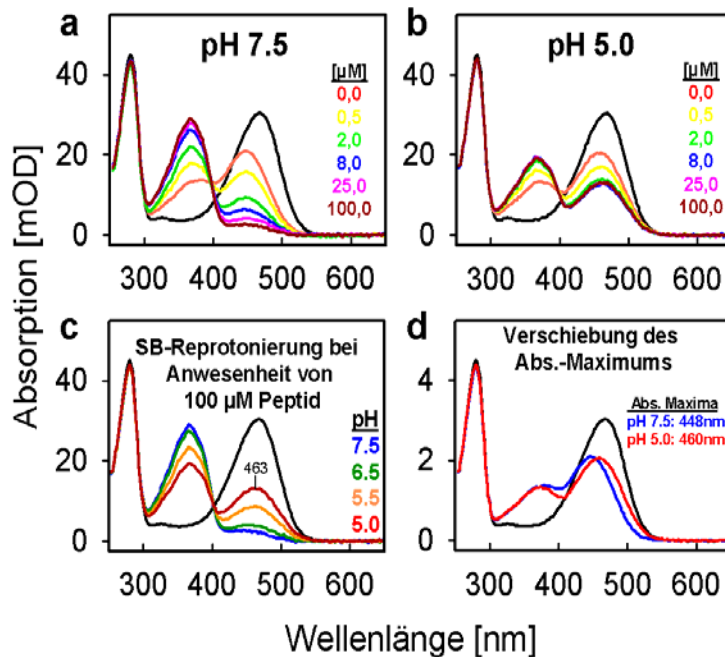
Anhand von FTIR-Spektren ist diese Reprotonierung der Schiffbase in der Meta-II-Konformation jedoch nachweisbar (siehe 5.2.2) und auch in den UV/Vis-Spektren (von 11-*cis*- bzw. 9-*cis*-azykl.-WT) ist eine leichte Rotverschiebung des Absorptionsmaximums um 1-2 nm bei pH 6,5 und pH 5,5



auf 450 nm gegenüber 448 nm bei pH 7,5 sichtbar (siehe auch Abb. 54). Dies spricht für eine Koexistenz zweier Spezies mit einem Absorptionsmaximum von ca. 449 nm.

Die Reprotonierung der Schiffbase bei niedrigem pH wurde schon bei 9-dm-E134Q beobachtet (Meyer et al., 2000) und wurde auch bei E134Q mit azyklischem Retinal wiedergefunden. Bei E134Q mit azyklischem Retinal ist für den Zustand mit reprotonierter Schiffbase ein Absorptionsmaximum bei 457 nm erkennbar.

Bezüglich der Charakterisierung der Meta-II-ähnlichen Konformation mit azyklischem Retinal wurde ein weiteres Experiment durchgeführt (s. Abb. 54). Es wurde eine Peptid-Bindungsstudie anhand des bereits beschriebenen Meta-II-stabilisierenden hochaffinen  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptids (s. 3.7) bei leicht basischem und saurem pH-Wert durchgeführt.



**Abb. 54: UV/Vis-Spektren zu azyklischem Meta-II mit reprotonierter Schiffbase**

Gezeigt sind UV/Vis-Spektren von Wildtyp-Rezeptor mit 9-*cis*-azyklischem Retinal bei Anwesenheit von steigender Konzentration des  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptids bei pH 7,5 (a) bzw. 5,0 (b) vor (schwarz) und nach Belichtung (farbig). Zudem ist die Schiffbase-Reprotonierung bei unterschiedlichem pH-Wert bei Anwesenheit von 100  $\mu$ M  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid (c) sowie die Verschiebung des Absorptionsmaximums durch die Präsenz von Rezeptoren mit reprotonierter Schiffbase (d) gezeigt.

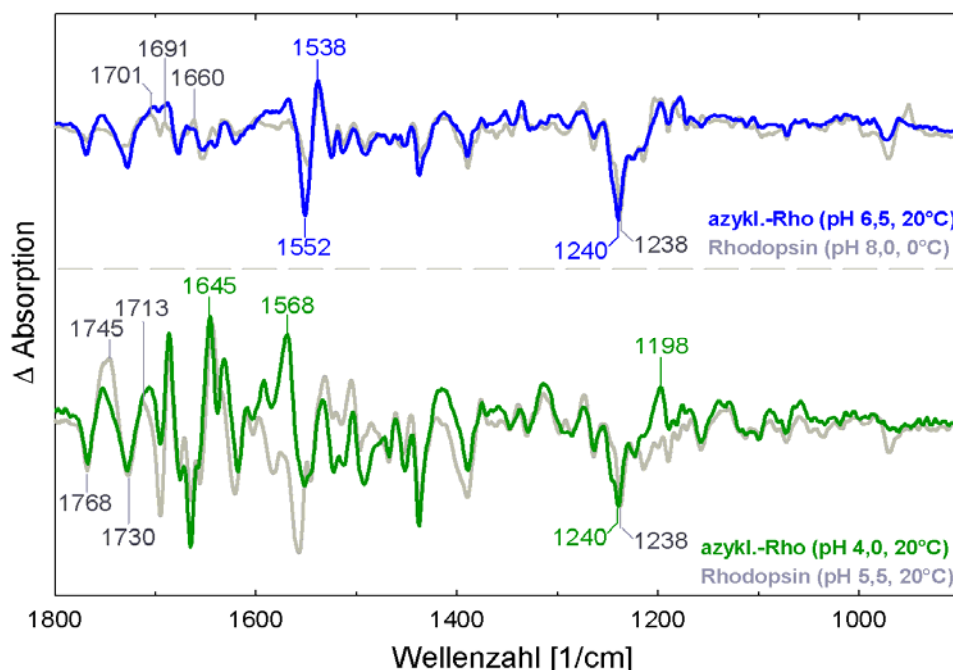
Bei pH 7,5 ist die Meta-I ähnliche Konformation des Wildtyp-Rezeptors mit azyklischem Rezeptor durch ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 448 nm gekennzeichnet. Bei Anwesenheit des Meta-II stabilisierenden  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptids wurde eine konzentrationsabhängige Erhöhung der für azykl.-Meta-II charakteristischen Absorption bei 366 nm festgestellt. Der isosbestische Punkt ist bei einer Wellenlänge von 398 nm. Bei pH 5,0 gibt es bereits ohne Peptid ein um 12 nm rotverschobenes Absorptionsmaximum (s. Abb. 54d). Bei Annahme einer vollständigen Verschiebung des Meta-Gleichgewichts nach azykl.-Meta-II bei Anwesenheit von 100  $\mu$ M  $G\alpha(340-350)$ HAA Peptid ist bei pH 5,0 für Meta-II mit reprotonierter Schiffbase ein Absorptionsmaximum von 463 nm zu erkennen.

## 5.2. FTIR-Spektroskopie

Um strukturelle Eigenschaften der untersuchten Pigmente mit azyklischem Retinal zu prüfen, wurden wie nachfolgend beschrieben FTIR-Spektren aufgezeichnet und Differenzspektren errechnet, bei welchen das Spektrum der Probe vor Belichtung vom Spektrum der Probe nach Belichtung abgezogen wurde (siehe auch 2.6.4).

### 5.2.1. Meta-Intermediate von Rhodopsin mit azyklischem Retinal

Gewaschene Membranen aus Stäbchenaußensegmenten (s. 2.3.2), die mit azyklischem Retinal regeneriert wurden, zeigen bei pH 6,5 und 20 °C Meta-I-Charakteristika im FTIR-Differenzspektrum, die vergleichbar zu nativen Disk-Membranen sind. Das gleiche gilt für Meta-II-Charakteristika bei pH 4,5 und 20 °C. In Abb. 55 ist ein Vergleich der Differenzspektren von Opsin, regeneriert mit 11-*cis*-azyklischem Retinal oder 11-*cis*-Retinal in Diskmembranen, gezeigt.



**Abb. 55: FTIR-Differenzspektren der Meta-Zustände von mit azyklischem Retinal regenerierten Opsin-Membranen im Vergleich zu Rhodopsin**

Das Differenzspektrum von azykl.-Rhodopsin bei pH 6,5 und 20 °C (blau) ist hinterlegt mit einem Meta-I-Spektrum von Rhodopsin bei pH 7,5, 0 °C (obere Hälfte, grau). Beide Spektren zeigen die im Text näher erläuterten Meta-I-Charakteristika. Bei pH 4,0 und 20 °C zeigt azykl.-Rhodopsin (grün) ein Spektrum, welches dem Meta-II-Referenzspektrum bei pH 5,5 und 20 °C sehr ähnlich ist (untere Hälfte, grau). Die Spektren wurden bezüglich des Peaks bei 1238/1240  $\text{cm}^{-1}$ , welcher charakteristisch für die Chromophor-Isomerisierung ist, normiert.

Bei pH 8,0 und einer Temperatur von 0 °C wurde in nativen Disk-Membranen nach Belichtung ein Meta-I-Differenz-Spektrum gemessen, welches durch die Meta-I spezifischen Banden bei 1701, 1691, 1660 und 1538  $\text{cm}^{-1}$  charakterisiert ist. Im Gegensatz dazu war bei mit azyklischem Retinal regeneriertem Opsin in Diskmembranen unter diesen Bedingungen keine Meta-I-Charakteristik zu finden (nicht gezeigt, siehe Bartl *et al.* 2005). Erst bei einem pH von 6,5 und einer Temperatur von

20 °C werden Banden im Differenzspektrum sichtbar, die dem Meta-I-Referenz-Spektrum sehr ähnlich sind (Abb. 55 oben).

Die starke negative Bande bei 1238 cm<sup>-1</sup> repräsentiert die *cis/trans*-Isomerisierung des Chromophors. Diese Bande ist beim 11-*cis*-azyklischen Retinal nur leicht nach 1240 cm<sup>-1</sup> verschoben. Somit werden diese Schwingungen durch das Fehlen des halben Retinal-Rings nur wenig beeinflusst. Leichte Unterschiede um 1550 cm<sup>-1</sup> (Amid-II und C=C-Streckschwingungen) sowie im HOOP-Bereich (hydrogen out of plane) zwischen 1000 und 900 cm<sup>-1</sup> sind Folge der unterschiedlichen chemischen Struktur der Retinale.

Bei weiterer Erniedrigung des pH stieg bei Rhodopsin mit azyklischem Retinal der Meta-II-ähnliche Anteil und der Meta-I-ähnliche Anteil sank. Die Bildung einer Meta-II-ähnlichen Spezies mit azyklischem Retinal war bei pH 4,0 durch Meta-II-spezifische Banden gekennzeichnet. Banden bei 1768, 1745 und 1730 cm<sup>-1</sup> reflektieren Änderungen von C=O-Streckungs-Vibrationen der protonierten Carboxylgruppen von Asp83 und Glu122 und die Bande bei 1713 cm<sup>-1</sup> zeigt die Protonierung des Gegenions Glu113 (in Analogie zu Rhodopsin, siehe Siebert, 1995).

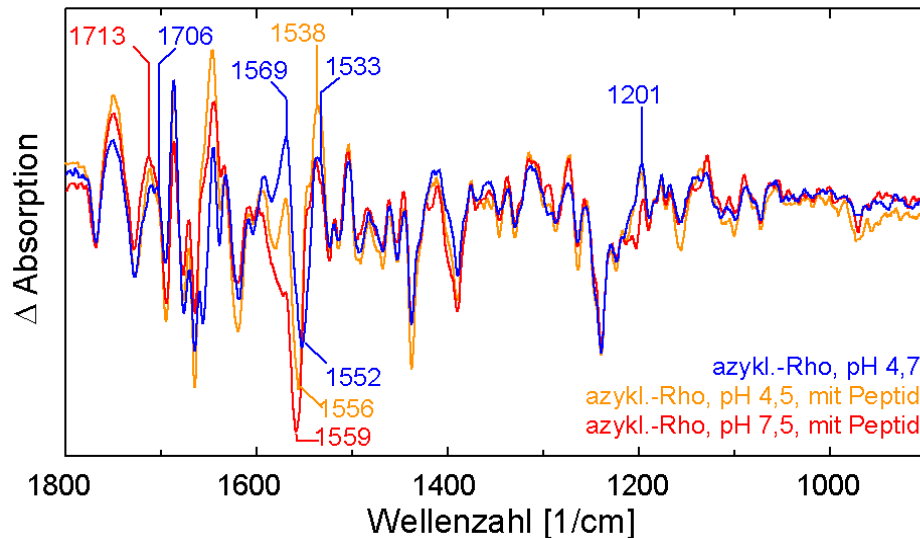
Beim Meta-II-ähnlichen Spektrum der Membranen mit azyklischem Retinal bei pH 4,0 und 20 °C war im Unterschied zu nativen Membranen eine starke positive Bande bei 1568 cm<sup>-1</sup> zu finden. Da der Bereich von 1500 bis 1580 cm<sup>-1</sup> Vibrationen durch C=C-Streckungen wiederspiegelt liegt es nahe anzunehmen, dass das Fehlen der C5=C6-Doppelbindung (bzgl. 11-*cis*-Retinal) im azyklischen Retinal einen Anteil daran hat. Den Hauptanteil am Vorhandensein dieser Bande hat jedoch wahrscheinlich die bereits beschriebene Reprotonierung der Schiffbase bei tiefem pH-Wert (nähere Erläuterung s. 5.2.2).

Anhand einer pH-Titrations-Reihe wurde ermittelt, dass der apparente pK<sub>a</sub> der Meta-II-Bildung von Rhodopsin mit azyklischem Retinal um 2 Einheiten zu tieferem pH verschoben wurde (Bartl *et al.*, 2005). Dazu wurden FTIR-Differenzspektren aufgezeichnet, auf die Chromophor-Bande bei 1240 cm<sup>-1</sup> normiert und die Bildung der Meta-II-Spezies anhand der Doppelbande bei 1768 und 1751 cm<sup>-1</sup> quantifiziert. Der errechnete apparente pK<sub>a</sub> war für Rhodopsin mit 11-*cis*-azyklischem Retinal 5,2 gegenüber 7,5 für Rhodopsin mit 11-*cis*-Retinal.

Zudem sei zu erwähnen, dass eine Charakterisierung der Photoprodukte von Rhodopsin mit 9-*cis*-azyklischem- bzw. 11-*cis*-azyklischem Retinal nur geringe Unterschiede zeigte.

### 5.2.2. Meta-II mit reprotonierter Schiffbase bei Rhodopsin mit azyklischem Retinal

Anhand von FTIR-Differenzspektren wurde bestätigt, dass die schon in der UV/Vis Spektroskopie (s. 5.1) beobachtete Reprotonierung der Schiffbase bei dem Meta-II-Intermediat mit azyklischem Retinal bei tiefem pH auftritt. Ein weiteres Experiment ist in Abb. 56 dargestellt.



**Abb. 56: Infrarotspektroskopische Charakterisierung von Meta-II mit reprotonierter Schiffbase bei azyklischem Retinal**

Gezeigt sind Meta-II-ähnliche FTIR-Differenzspektren bei 22 °C von azykl.-Rhodopsin in Disk-Membranen bei pH 4,5 (blau) und bei Anwesenheit von 10 mM  $Gt\alpha(340-350)$ HAA Peptid bei pH 4,5 (orange) und pH 7,5 (rot). Charakteristisch für eine reprotonierte Schiffbase bei saurem pH sind Banden bei 1201 und 1569  $\text{cm}^{-1}$  sowie die Verschiebung der 1713  $\text{cm}^{-1}$  Bande nach 1706  $\text{cm}^{-1}$  (nähere Erläuterung siehe Text).

Da bekannt ist, dass das  $Gt\alpha(340-350)$ HAA Peptid (s. 3.7) die aktive Meta-II-Konformation stabilisiert (Martin et al., 1996), wurden zwei FTIR-Differenz-Spektren in Gegenwart sättigender Peptid-Konzentration bei pH 7,5 (Meta-I-Bedingungen) und pH 4,5 (Meta-II-Bedingungen) aufgezeichnet und mit einem Spektrum ohne Anwesenheit von Peptid bei pH 4,5 verglichen.

Das Spektrum bei pH 7,5 in Gegenwart von  $Gt\alpha(340-350)$ HAA Peptid (rote Linie) zeigt alle spektralen Charakteristika für azykl.-Meta-II, was dafür spricht, dass das Peptid die Meta-II ähnliche Konformation stabilisiert. Auch die Spektren bei pH 4,5 (mit und ohne Peptid) zeigen alle Banden-Muster für eine Meta-II-ähnliche Konformation, wobei es signifikante Unterschiede zum Spektrum bei pH 7,5 gibt. Die positiven Banden bei 1569 und 1201  $\text{cm}^{-1}$  und eine negative Bande bei 1552 bzw. 1556  $\text{cm}^{-1}$  reflektieren die Bildung einer protonierten Schiffbase (Vogel et al., 2001) und somit eine Meta-II-Konformation mit reprotonierter Schiffbase. Zudem ist die Bande bei 1713, die der Protonierung des Gegenions der Schiffbase Glu113 zugeordnet ist, nach 1706  $\text{cm}^{-1}$  verschoben, was durch eine stärkere Wasserstoff-Bindung durch die zusätzliche Ladung erklärbar ist (siehe auch Vogel et al., 2001).

Beim Vergleich der Spektren mit und ohne Peptid bei pH 4,5 zeigt sich, dass die Anwesenheit von  $Gt\alpha(340-350)$ HAA Peptid in sättigender Konzentration eine geringere Intensität der Bande bei 1569

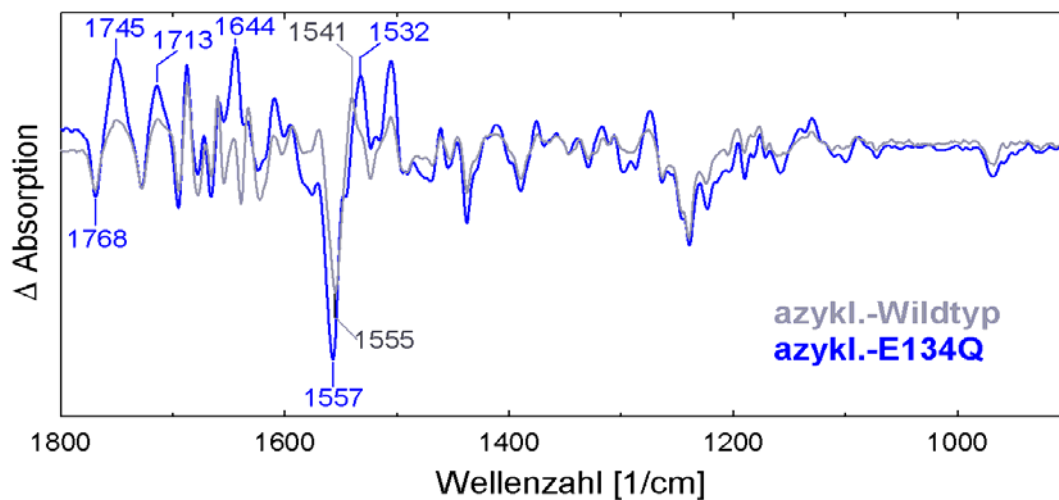
$\text{cm}^{-1}$  und eine Verschiebung der Bande bei 1552 nach  $1556 \text{ cm}^{-1}$  bewirkt, was einen geringeren Anteil an reprotonierter Spezies mit Meta-II-ähnlicher Konformation widerspiegelt.

Eine Reprotonierung der Schiffbase bei tiefem pH-Wert wurde bereits für Rhodopsin mit dem partiellen Agonisten 9-demethyl-Retinal beschrieben (Meyer et al., 2000; Vogel et al., 2000).

### 5.2.3. Erleichterte Bildung von Meta-II durch die E134Q Mutation im Pigment mit azyklischem Retinal

Im Folgenden werden anhand der strukturellen Aussagekraft von FTIR-Differenz-Spektren die UV/Vis-Ergebnisse bezüglich der erleichterten Meta-II-Bildung durch eine E134Q-Mutation bei Pigmenten mit azyklischem Retinal bestätigt. Im Unterschied zu den bisher beschriebenen FTIR-Experimenten handelt es sich um in COS-1-Zellen exprimiertes Opsin bzw. eine Opsin-Mutante, die mit azyklischem Retinal rekonstituiert und immuno-affinitätschromatographisch aufgereinigt wurden. Diese Pigmente lagen in solubilisierter Form vor. Die Solubilisierung in Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DM) bewirkte eine Erleichterung der Konformationsänderung und somit eine Verschiebung des Meta-Gleichgewichts in Richtung Meta-II (Arnis und Hofmann, 1993). Dadurch zeigte das FTIR-Differenzspektrum bei Meta-I-Bedingungen Charakteristika, die für die Änderung zur Meta-II-Konformation typisch sind.

In Abb. 57 sind FTIR-Differenz-Spektren von gereinigtem rekombinantem azykl.-Rhodopsin und azykl.-E134Q, aufgezeichnet bei pH 8,0 und  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ , dargestellt.



**Abb. 57: FTIR-Differenzspektrum zur Verschiebung des Meta-Gleichgewichts in Richtung Meta-II-ähnlicher Konformation bei azykl.-E134Q**

Gezeigt sind FTIR-Differenzspektren von gereinigtem rekombinanten azykl.-Wildtyp (blau) und azykl.-E134Q (grün) bei pH 8,0 und  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ . Charakteristische Banden für die Meta-II-ähnliche Konformation bei 1768, 1745, 1713, 1644 und  $1557 \text{ cm}^{-1}$  sind hervorgehoben.

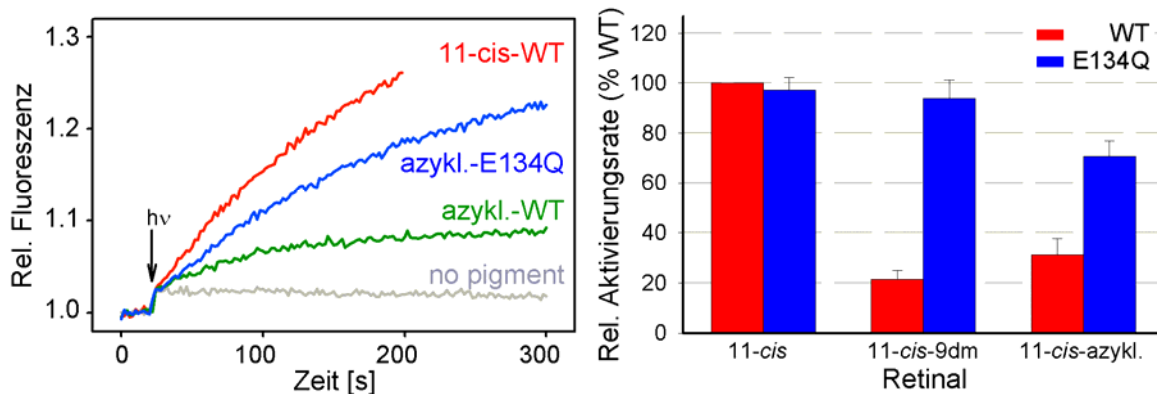
Das Differenzspektrum des in Detergens vorliegenden azykl.-Rhodopsin ist relativ schwer zu beurteilen, da es trotz der starken Meta-I-Bedingungen neben charakteristischen Meta-I-Banden auch Banden enthält, die für den Übergang nach Meta-II spezifisch sind. Als Referenzspektren können die in Abb. 55 gezeigten Differenzspektren für azykl.-Meta-I und azykl.-Meta-II in Membranen verwendet werden. Für einen großen Anteil an azykl.-Meta-I im Differenzspektrum von azykl.-Rhodopsin spricht das fast völlige Fehlen der Bande bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  sowie die typische positive Bande bei  $1532\text{ cm}^{-1}$ . Das für die Meta-II-Bildung charakteristische Bandenmuster zwischen  $1800$  und  $1700\text{ cm}^{-1}$  ist zwar zu erkennen, allerdings wurden diese Banden auch im azykl.-Meta-I-Differenzspektrum der Membranproben sichtbar.

Bei azykl.-E134Q haben die Banden bei  $1768$ ,  $1745$  und  $1730\text{ cm}^{-1}$  (Änderung der Wasserstoffbrückenumgebung der Carboxylgruppen von Asp83 und Glu122), die positive Bande bei  $1713\text{ cm}^{-1}$  (Protonierung des Gegenions Glu113) sowie die für die Bildung von Meta-II charakteristische Bande bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  eine signifikant höhere Intensität. Zudem spiegelt die Verschiebung der Bande bei  $1541$  nach  $1532\text{ cm}^{-1}$  wieder, dass nach Belichtung von azykl.-E134Q hauptsächlich azykl.-Meta-II gebildet wurde.

Die hier beobachtete Erleichterung des Übergangs zur Meta-II-Konformation durch die E134Q-Mutation bei Pigmenten mit azyklischem Retinal stimmt mit den UV/Vis-spektroskopischen Ergebnissen überein und spiegelt sich in der erhöhten katalytischen Aktivität von azykl.-E134Q wieder.

### 5.3. Katalytische Aktivität bezüglich des Nukleotidaustausches im Transducin

In Abb. 58 ist ein Vergleich der Fähigkeit zur Katalyse des Nukleotidaustausches im Transducin von Wildtyp und E134Q nach Rekonstitution mit dem nativen Chromophor 11-*cis*-Retinal oder mit dem modifizierten 11-*cis*-azyklischen Retinal dargestellt.



**Abb. 58: Transducin-Aktivierungsassay und lichtabhängige Transducin-Aktivierungsraten von Wildtyp und E134Q mit 11-*cis*-azyklischem Retinal**

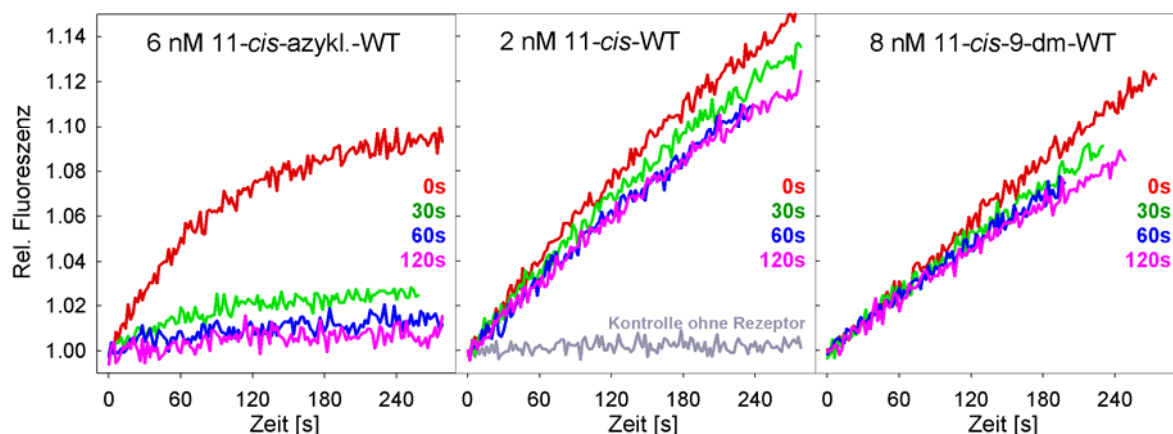
Dargestellt sind repräsentative Spuren des Transducin-Aktivierungsassays (links) sowie die errechneten Aktivierungsraten (rechts) für Wildtyp und E134Q, rekonstituiert mit 11-*cis*-Retinal, 9-dm-Retinal oder 11-*cis*-azyklischem Retinal. Aktivierungsraten: 100 % (Rhodopsin), 97 % (E134Q), 21 % (9-dm-Rhodopsin), 94 % (9-dm-E134Q), 31 % (azykl.-Rhodopsin) and 71 % (azykl.-E134Q).

Bei azykl.-WT wurde verglichen mit 11-*cis*-WT eine Aktivität von ca. 30 % ermittelt. Im Balkendiagramm in Abb. 58 sind vergleichend auch die Aktivierungsraten der entsprechenden 9-dm-Pigmente gezeigt. Erstaunlicherweise bewirkte das Fehlen des halben Retinal-Ringes einen geringeren Aktivitätsverlust als das Fehlen der Methylgruppe am C-9-Atom des Retinals. Doch der Aktivitätsverlust durch 9-dm-Retinal konnte durch die E134Q Mutation fast vollständig kompensiert werden (von 21 % auf 97 %). Im Gegensatz dazu wurde bei azykl.-E134Q nur eine unvollständige Restoration der WT-Aktivität (von 31 % auf 71 %) gefunden. Die Ursache dafür ist in dem sehr schnellen Zerfall der Pigmente mit azyklischem Retinal zu finden, auf den in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen wird.



#### 5.4. Beschleunigte Abnahme der Transducin-Aktivierung bei Pigmenten mit azyklischem Retinal

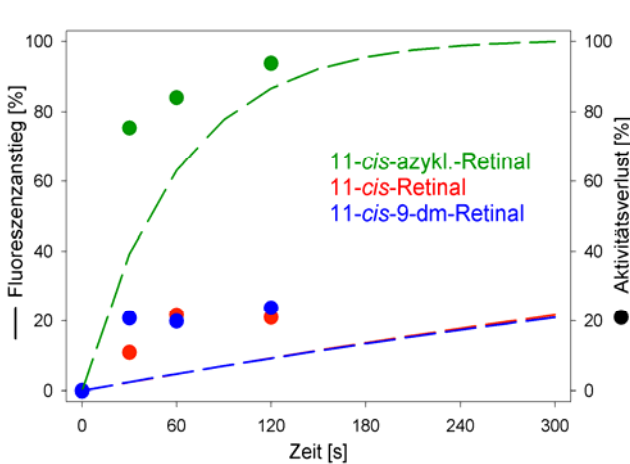
Bei den Experimenten zur Transducin-Aktivierung von Pigmenten mit azyklischem Retinal wurde ein drastischer zeitabhängiger Aktivitätsverlust nach Belichtung festgestellt. Zur genauen Analyse dieses Verlustes wurde der Assay insofern umgestellt, als dass das Pigment separat belichtet wurde und dann nach bestimmten Zeiten (0, 30, 60, 120 Sekunden) dem Messansatz mit Transducin und dem Nukleotid GTP $\gamma$ S während der Fluoreszenz-Aufzeichnung zugesetzt wurde.



**Abb. 59: Modifizierter Transducin-Aktivierungsassay zur Messung des schnellen Aktivitätsverlustes des lichtaktivierten Wildtyp-Rezeptors mit 11-cis-azyklischem Retinal**

Dargestellt ist der Fluoreszenzanstieg (Anregung: 300 nm, Emission: 345 nm) von aktiviertem Transducin nach Austausch von GDP gegen GTP, katalysiert durch lichtaktivierten Wildtyp-Rezeptor mit azyklischem (*links*), nativem 11-cis- (*mittig*) sowie 9-dm-Retinal (*rechts*). Die Rezeptoren wurden direkt in den Reaktionsansatz gegeben und dort für 20 Sekunden belichtet (*rot*), oder erst 30 s (*grün*), 60 s (*blau*) bzw. 120 s (*violett*) nach der Belichtung in den Reaktionsansatz gegeben. Die Konzentration des jeweiligen Rezeptors wurde so gewählt, dass sich bei allen Ansätzen eine vergleichbare Gt-Aktivierung einstellte und ist in der Abbildung angegeben. Das Messvolumen betrug 650  $\mu$ l, es wurde bei 20 °C gemessen und der vorgelegte Reaktionsansatz enthielt: 250 nM Gt und 5  $\mu$ M GTP $\gamma$ S in 20 mM BTP (pH 7,5), 130 mM NaCl, 1 mM MgCl $_2$  und 0,01 % DM (w/v).

In Abb. 59 ist sehr deutlich zu erkennen, dass im Gegensatz zum 11-cis- und 9-dm-Wildtyp beim Wildtyp mit azyklischem Retinal schon 30 Sekunden nach Belichtung ein starker Aktivitätsverlust (fast 80 %) zu verzeichnen ist. Zwei Minuten nach Belichtung ist nur noch eine Restaktivität von etwa 3 % der ursprünglichen Aktivität (direkt nach Belichtung) verblieben. Interessanterweise entspricht die Rate des Aktivitätsverlustes in etwa dem fluorometrisch bestimmten Zerfall des Rezeptors (s. 5.5 und Abb. 60). Wird der Aktivitätsverlust (in %) gegen die Zeit der Inkubation nach Belichtung aufgetragen und mit der Fluoreszenzzunahme nach Belichtung verglichen, so ist bei dem Rhodopsin mit azyklischem Retinal ein etwa 20-fach beschleunigter Verlauf (gegenüber 11-cis- und 9-dm-Rhodopsin) zu erkennen (Abb. 60).



**Abb. 60: Zeitlicher Verlauf der Aktivität der belichteten Pigmente und einhergehende Änderung der Trp-Fluoreszenz**

Dargestellt ist der prozentuale Aktivitätsverlust (Punkte) sowie der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei den Pigmenten nach Belichtung (gestrichelte Linie, nach Farrens et al., 1996) für Wildtyp-Rhodopsin mit azyklischem Retinal (grün), 11-*cis*-Retinal (rot) und 9-dm-Retinal (blau). Die Aktivität der Pigmente wurde aus Abb. 59 berechnet, wobei die Aktivität direkt nach Belichtung maximal war. Die Trp-Fluoreszenz (aus Abb. 64) wurde auf das initiale Intensitätsniveau (0 % Änderung) sowie auf das Endniveau normiert.

### 5.5. Beschleunigter Meta-II-Zerfall der Pigmente mit azyklischem Retinal

Der im vorigen Kapitel beschriebene rapide Aktivitätsverlust bei Pigmenten mit azyklischem Retinal wurde anhand der nachfolgend aufgeführten Experimente näher untersucht. Dazu wurde der Zerfall der aktiven G-Protein-bindenden Spezies anhand der Fluoreszenzzunahme nach Freisetzung des Retinals aus der Retinalbindungstasche (Farrens und Khorana, 1995) erforscht und die Kinetik der Hydrolyse der Schiffbase für Rhodopsin mit 11-*cis*-Retinal, 9-dm-Retinal und azyklischem Retinal gemessen.

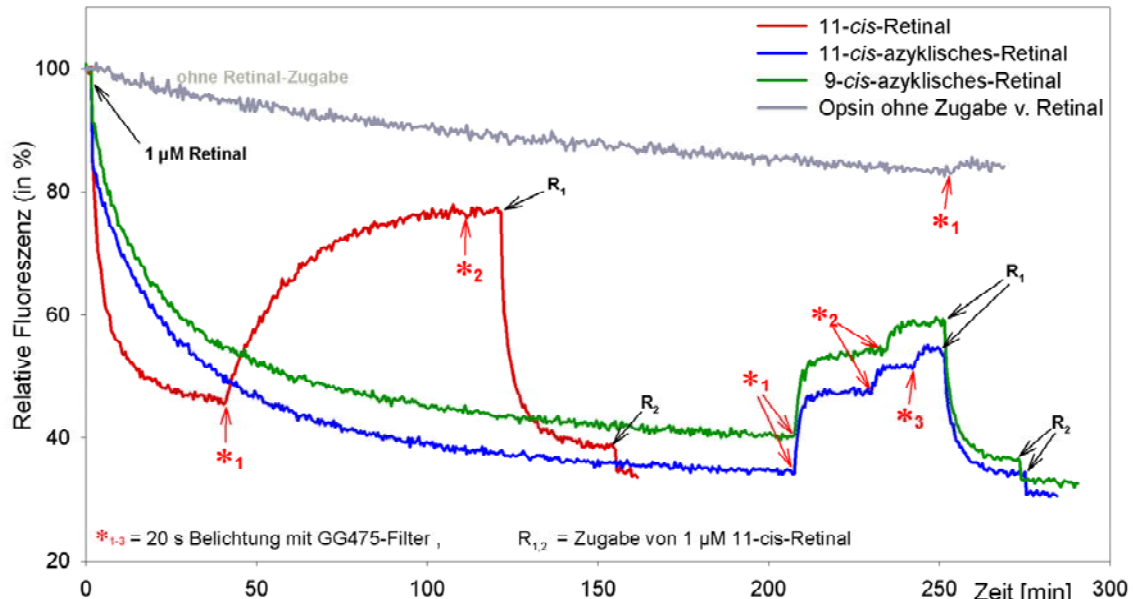
#### 5.5.1. Untersuchung der Rhodopsin-Regeneration und des Rhodopsin-Zerfalls an solubilisierten Opsin-Membranen

In Abb. 61 ist ein Experiment dargestellt, welches die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz (Anregung: 295 nm, Emission 330 nm) von solubilisierten Opsin-Membranen bei Aufnahme des Retinals in die Retinalbindungstasche sowie die Freisetzung des Retinals nach Belichtung und darauf folgender Konformationsänderung des Rezeptors zeigt. Dieses Experiment wurde nach Heck *et al.* (2003) durchgeführt. Die Autoren beschrieben am Rhodopsin eine Eingangstasche („*entrance site*“) und eine Ausgangstasche („*exit site*“) für das Retinal. Sie beobachteten an nicht-solubilisierten Opsin-Membranen ein zweiphasiges Aufnahmesignal bei Zugabe von 11-*cis*-Retinal und ordneten die schnelle Komponente der Aufnahme des Retinals in die Eingangstasche und die langsame Komponente der Aufnahme in die Retinal-Bindungstasche zu. Die schnelle Komponente wurde auch bei Zugabe von all-*trans*-Retinal beobachtet. Erst nach Solubilisierung des Rezeptors in 0.1 % Dodecylmaltosid (DM) konnte fluoreszenzspektroskopisch das alleinige Aufnahmesignal des Retinals in die Retinalbindungstasche verfolgt werden. In den mit DM solubilisierten Proben war auch keine Retinal-Ausgangstasche mehr vorhanden.

In Abb. 61 ist nach Zugabe aller drei untersuchten Retinale eine Unterdrückung („*quenching*“) der Fluoreszenz und somit eine Aufnahme des Retinals in die Retinalbindungstasche beobachtbar. Die Aufnahme von 11-*cis*-Retinal ist dabei mit einer Halbwertszeit von 2,2 min um ein Vielfaches schneller

als die Aufnahme der azyklischen Retinale ( $t_{1/2}$  von 14,7 bzw. 12,9 min für 11-*cis*- bzw. 9-*cis*-azyklisches Retinal). Die Fluoreszenz der Opsin-Probe ohne Retinal sinkt leicht, was wahrscheinlich auf den Einfluss des Detergens zurückzuführen ist, welches ca. 2 Minuten vor der Messung zugegeben wurde. Bei Opsin-Proben, die einen Tag vor der Messung solubilisiert wurden, wurde eine starke Verminderung der Fluoreszenz-Amplitude des Retinal-Aufnahmesignals festgestellt.

Halbwertszeiten	Regeneration [min]	Zerfall [min]
11- <i>cis</i> -Retinal	2,2	15,9
11- <i>cis</i> -azykl.Retinal	14,7	1,2
9- <i>cis</i> -azykl.Retinal	12,9	1,8



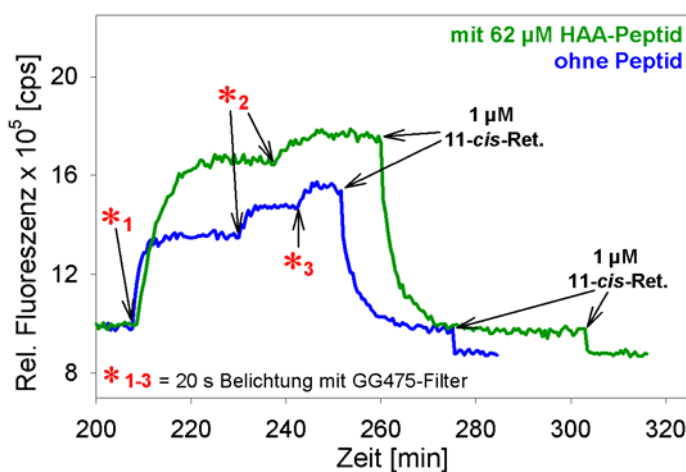
**Abb. 61: Fluoreszenzspektroskopische Verfolgung der Regeneration von solubilisierten Opsin-Membranen und Zerfall des Rhodopsins nach Belichtung**

Dargestellt ist die zeitabhängige Änderung der intrinsischen Fluoreszenz von solubilisierten Opsin-Membranen (1 µM, Solubilisierung 3 min vor der Messung) nach Zugabe von 0,9 µM 11-*cis*-Retinal (rot), 11-*cis*-azyklischem Retinal (blau) bzw. 9-*cis*-Retinal (grün). Nach Erreichen eines konstanten Fluoreszenzwertes (Plateau entspricht vollständiger Regeneration) wurde die Probe mit gelbem Licht (roter Stern;  $h\nu > 480$  nm (GG495-Filter) für 11-*cis*-Retinal und  $h\nu > 460$  nm (GG475-Filter) für azyklische Retinale) belichtet. Nach Erreichen eines weiteren Plateaus (abgeschlossener Zerfall) wurde 1 bis 2 weitere Male belichtet, um restliches Pigment umzusetzen. Um zu testen, ob der Rezeptor wieder aufnahmefähig für Retinal ist, wurde 1 µM 11-*cis*-Retinal zugegeben („R<sub>1</sub>“). Nach Erreichen eines Plateaus wurde abschließend 1 µM 11-*cis*-Retinal („R<sub>2</sub>“) zur Probe gegeben, um die Regeneration mit 11-*cis*-Retinal zu vervollständigen. Gemessen wurde in 20 mM BTP pH 6,5 mit 0,1 % DM bei 20 °C. Die Probe wurde bei 295 nm angeregt, und bei 330 nm emittiertes Licht wurde detektiert. Das initiale Fluoreszenzniveau der drei Spuren wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf 100 % normiert.

Nach Belichtung der Probe ist zu beobachten, dass der fluorometrisch messbare Zerfall des aktivierten Rhodopsins mit einer Halbwertszeit von weniger als zwei Minuten für die Pigmente mit azyklischem Retinal etwa 10-fach schneller verläuft als bei Pigmenten mit 11-*cis*-Retinal. Die Kinetik des Zerfalls spiegelt sich im Wesentlichen in dem im vorherigen Abschnitt (5.4) beschriebenen dramatischen Aktivitätsverlust der azyklischen Pigmente nach Belichtung wieder (zum Zerfall solubilisierter rekombinanter Pigmente siehe auch 5.5.2). Da das Meta-Gleichgewicht der Pigmente mit azyklischem Retinal in Richtung Meta-I verschoben ist und somit nach erfolgter Absorption eines Photons weitere Photonen absorbiert werden können, liegt es nahe anzunehmen, dass ein Teil der Pigmente nach der Belichtung wieder im Grundzustand mit 11-*cis*-Retinal oder als Isorhodopsine (7-*cis* und 9-*cis*-

Isomere) vorliegen. Letzteres spiegelt sich in dem nur teilweise erfolgten Zerfall bzw. in der Wiederbelichtbarkeit der Pigmente wieder, was anhand des weiteren Fluoreszenzanstieges bei nochmaliger Belichtung (im Gegensatz zum Wildtyp) erkennbar ist. Anhand des abschließenden Fluoreszenz-*quenching*-Signals nach Zugabe von 11-*cis*-Retinal ist zu beobachten, dass das Fluoreszenzniveau bei allen Rezeptoren auf ein vergleichbares Niveau absinkt und somit die Retinalbindungstasche mit 11-*cis*-Retinal neu besetzt wurde bzw. noch vorhandenes azyklisches Retinal von dem zugegebenen 11-*cis*-Retinal verdrängt wurde. Bei nochmaliger Gabe von 11-*cis*-Retinal ist kein weiteres Aufnahmesignal zu erkennen, das Sinken des Fluoreszenzniveaus ist auf den Verdünnungseffekt zurückzuführen.

In Abb. 62 ist dargestellt, wie der Zerfall durch Anwesenheit von G $\alpha$ (340-350)-Peptid, welches die aktive Meta-II Konformation stabilisiert, beeinflusst wird.

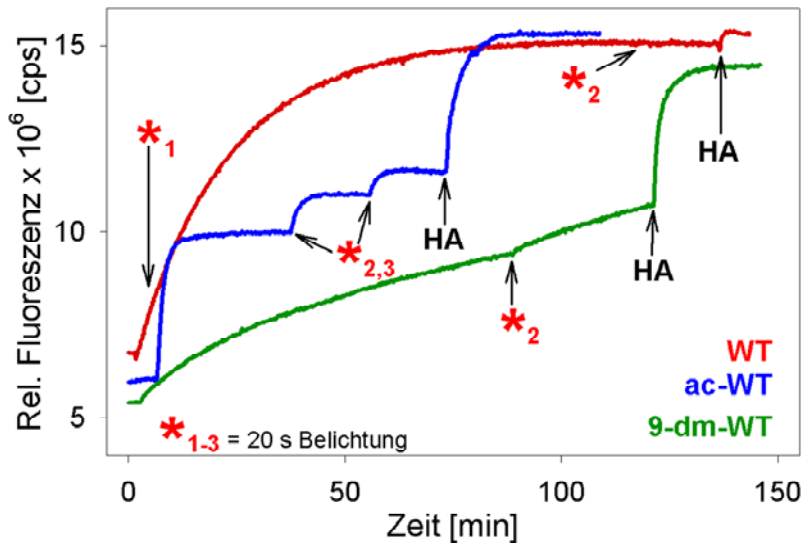


**Abb. 62: Zerfall des aktivierten Rhodopsinzustandes in Gegenwart von G $\alpha$ (340-350)HAA Peptid**

Zeitabhängige Änderung der intrinsischen Fluoreszenz von mit 11-*cis*-azyklischem Retinal regenerierten solubilisierten Opsin-Membranen (1  $\mu$ M) bei Anwesenheit von 62 $\mu$ M G $\alpha$ (340-350)HAA-Peptid (grün) bzw. ohne Peptid (blau). Der Messansatz ist wie in Abb. 61 beschrieben.

Zum einen ist zu beobachten, dass die Fluoreszenzänderung nach Belichtung größer ist als bei der Probe ohne Peptid. Das ist damit zu erklären, dass mit Peptid mehr azykl.-Meta-II gebildet wird, welches dann zerfällt. Zum anderen ist der Zerfall der Pigmente mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 3,2$  min gegenüber den Pigmenten ohne Peptid ( $t_{1/2} = 1,2$  min) leicht verzögert. Nach Zugabe von 11-*cis*-Retinal ist wieder ein Aufnahmesignal erkennbar und ein vergleichbares Fluoreszenzniveau wird erreicht.

In Abb. 63 ist das fluorometrische Zerfallssignal von Pigmenten mit 11-*cis*-Retinal, azyklischem Retinal und 9-dm-Retinal in Membranen vergleichend dargestellt. Der Zerfall der Pigmente mit azyklischem Retinal ist wie bereits beschrieben gegenüber Rhodopsin stark beschleunigt, mit 9-dm-Retinal dagegen etwa um die Hälfte verlangsamt. Auch bei 9-dm-Rhodopsin ist ein weiteres Zerfallssignal nach nochmaliger Belichtung zu erkennen, was, wie bei azykl.-Rhodopsin, auf den großen wiederbelichtbaren Meta-I-ähnlichen Anteil während der Belichtung zurückzuführen ist. Nach abschließender Zugabe von Hydroxylamin, welches das Retinal aus der Retinal-Bindungstasche verdrängt, erreichen alle Kurven ein vergleichbares Niveau, was die Fluoreszenzintensität des Retinal-freien Opsins widerspiegelt.

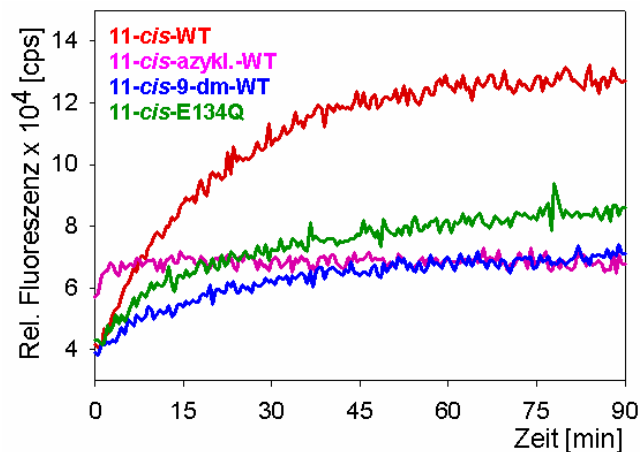


**Abb. 63: Fluorometrische Messung des R\*-Zerfalls bei solubilisierten Disk-Membranen , regeneriert mit 11-cis-Retinal, 11-cis-azyklischem Retinal oder 11-cis-9-dm-Retinal**

Dargestellt ist die zeitabhängige Änderung der intrinsischen Fluoreszenz von 1  $\mu\text{M}$  solubiliertem (0,1 % DM) Opsin aus Disk-Membranen, das sofort nach der Solubilisierung für 14 Stunden mit 0,9  $\mu\text{M}$  11-cis-Retinal (rot), 11-cis-azyklischem Retinal (blau) oder 11-cis-9-dm-Retinal (grün) regeneriert wurden. Die Proben wurden mit gelbem Licht (roter Stern;  $h\nu > 480 \text{ nm}$  (GG495-Filter) für 11-cis-Retinal und  $h\nu > 460 \text{ nm}$  (GG475-Filter) für azyklisches- und 9-dm-Retinal) belichtet. Nach Erreichen eines stabilen Fluoreszenzwertes (abgeschlossener Zerfall) wurde 1 bis 2 weitere Male belichtet und die Fluoreszenz-Endamplitude wurde nach Zugabe von 20 mM Hydroxylamin (HA) und gleichzeitiger Belichtung der Probe mit gelbem Licht erreicht. Gemessen wurde in 20 mM BTP pH 6,5 bei 20 °C. Die Probe wurde mit 295 nm angeregt, und bei 330 nm emittiertes Licht wurde detektiert.

### 5.5.2. Untersuchung des Zerfalls rekombinanter solubilisierter Pigmente

In Abb. 64 ist die zeitliche Änderung der intrinsischen Fluoreszenz nach der Belichtung für verschiedene exprimierte Pigmente gezeigt, die nach der Aufreinigung in Detergens-Mizellen vorliegen. Es wurden jeweils 0,5  $\mu\text{M}$  Rezeptor eingesetzt.



**Abb. 64: Fluorometrische Messung des R\*-Zerfallsignals für gereinigtes Wildtyp-Rhodopsin mit 11-cis-Retinal, azyklischem Retinal und 9-dm-Retinal sowie die E134Q-Mutante mit 11-cis-Retinal**

Dargestellt ist die zeitabhängige Änderung der intrinsischen Fluoreszenz von 0,5  $\mu\text{M}$  der aufgereinigten rekombinanten Pigmente mit den angegebenen Retinalen. Die Proben wurden mit gelbem Licht (GG495-Filter für 11-cis-Retinal und GG475 für azyklisches- und 9-dm-Retinal) für 15 s gelichtet. Gemessen wurde in 50 mM BTP pH 7,5 mit 0,03 % DM bei 20 °C. Die Probe wurde bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregt, und emittiertes Licht wurde bei 330 nm detektiert.

Nur der Zerfall von Rhodopsin konnte an eine monoexponentielle Zerfalls-Kinetik angepasst werden, wobei eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 11,9 \pm 0,5 \text{ min}$  ermittelt wurde. Der Zerfall des Wildtyp-Pigments mit azyklischem Retinal war auch hier deutlich beschleunigt ( $t_{1/2} = 1,4 \pm 0,1 \text{ min}$ ), es ist jedoch im Gegensatz zu den vermessenen solubilierten Membranproben zu erkennen, dass das initiale

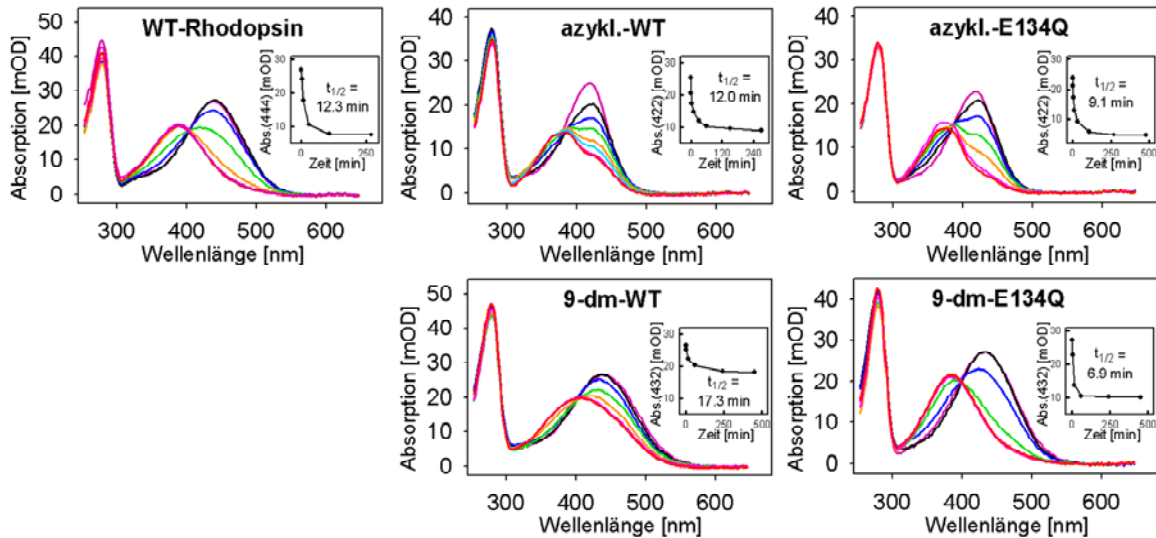
Fluoreszenzniveau verglichen mit den anderen Rezeptoren höher liegt. Offensichtlich bewirkt die Anwesenheit des Detergens eine andere Rezeptorkonformation, bei der das Retinal weniger mit der fluoreszierenden Gruppe interagiert. Für das azykl.-Rhodopsin wurde eine Intensitätsänderung von nur 10 % bezogen auf die Intensitätsänderung der Wildtyp-Fluoreszenz beobachtet. Dabei erhöhte sich die Fluoreszenzintensität wie auch beim 9-dm-Rhodopsin nur auf ca. 30 % des Wildtyp-Endniveaus. Der Grund dafür wird wahrscheinlich auch hier die Rückisomerisierung des Retinals zu den *cis*-Isomeren beim Belichten sein, da sich die Absorptionsmaxima von Meta-I und Grundzustand bei azykl.- und 9-dm-Retinal kaum unterscheiden. Bei Anwesenheit von 11-*cis*-Retinal stellt sich sofort Meta-II ( $\lambda_{\max}=380$  nm) ein, das das Anregungslicht ( $> 480$  nm) kaum absorbiert. Die Fluoreszenzintensität des E134Q-Rezeptors stieg kontinuierlich weiter an und erreichte nach 5,5 h ca. 90 % des Wildtyp-Niveaus (nicht dargestellt).

### 5.5.3. Untersuchung der Schiffbase-Hydrolyse von solubilisierten rekombinanten Pigmenten

Nach der Belichtung ist die Einstellung des Meta-I/Meta-II-Gleichgewichts überlagert vom Zerfall des Meta-II zu Opsin und all-*trans*-Retinal. Spektral ist Meta-II nicht von freiem Retinal zu unterscheiden, da beides charakterisiert ist durch ein Absorptionsmaximum von 380 nm.

Mittels Säuredenaturierung kann jedoch getestet werden, ob das Retinal noch kovalent über eine Schiffbase gekoppelt ist, oder ob das Pigment bereits zerfallen ist und freies Retinal vorliegt. Das mittels protonierter Schiffbase gebundene all-*trans*-Retinal hat ein Absorptionsmaximum von 444 nm, freies Retinal dagegen von 380 nm.

In der Abb. 65 sind Experimente zur Bestimmung der Rate der Schiffbase-Hydrolyse für Pigmente mit 11-*cis*-Retinal, azyklischem Retinal und 9-dm-Retinal mittels Säuredenaturierung gezeigt. Für das Wildtyp-Rhodopsin stimmt die Kinetik der Schiffbase-Hydrolyse mit der fluorometrisch ermittelten Zerfallsrate überein ( $t_{1/2}$  ca. 12 min), wie auch von Farrens & Khorana (1995) beschrieben. Für den Rezeptor mit azyklischem Retinal ist dies nicht der Fall. Hier steht dem schnellen fluorometrisch ermittelten Zerfall ( $t_{1/2} = 1,2$  min) eine dem Wildtyp entsprechende Rate für die Schiffbase-Hydrolyse ( $t_{1/2} = 12,0$  min) gegenüber. Dies würde bedeuten, dass die Hydrolyse der Schiffbase bei azyklischem Retinal und 11-*cis*-Retinal etwa gleich schnell erfolgt, während sich die intrinsische Fluoreszenz des belichteten azykl.-Rhodopsins ca. 10fach schneller ändert. Sichtbar wird anhand der verbleibenden Absorption bei 422 nm bzw. 432 nm, dass bei Rezeptoren mit azyklischem Retinal wie auch mit 9-dm-Retinal ein großer Teil des Retinals in gebundenem Zustand verbleibt, was vermutlich auf nicht umgesetztes bzw. während der Belichtung rückisomerisiertes Rhodopsin zurückzuführen ist. Der größere Meta-II-ähnliche Anteil bei azykl.-E134Q und 9-dm-E143Q bewirkt eine fast komplette sowie beschleunigte Hydrolyse der Schiffbase.



**Abb. 65: Bestimmung der Schiffbasen-Hydrolyse-Rate von rekombinanten solubilierten Rhodopsinen mittels Säuredenaturierung**

Um die Rate der Schiffbase-Hydrolyse infolge der Lichtaktivierung zu ermitteln wurde das Rhodopsin ( $0,6 \mu\text{M}$ ) zu bestimmten Zeiten nach der Belichtung durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Volumen 1 N HCl denaturiert und der verbliebene Anteil an Schiffbase gekoppeltem Retinal anhand der Absorption bei 444 nm für 11-*cis*-Retinal, 422 nm für 11-*cis*-azyklisches-Retinal und 432 nm für 11-*cis*-9-dm-Retinal UV/Vis-spektrometrisch bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse sowie die ermittelte Halbwertszeit ist jeweils in den einzelnen Abbildungen dargestellt. Folgende Halbwertszeiten für die Schiffbase-Hydrolyse wurden ermittelt: 12,3 min für Wildtyp, 12,0 min für azykl.-WT, 9,1 min für azykl.-E134Q, 17,3 min für 9-dm-WT und 6,9 min für 9-dm-E134Q.





## 5.6. Diskussion

Rhodopsin wird aufgrund seiner Eigenschaften den Photorezeptoren wie auch den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zugeordnet (siehe Filipek et al., 2003). Der komplexe Aktivierungsmechanismus, gestartet durch die Absorption eines Photons scheint kaum Ähnlichkeiten mit dem Aktivierungsmechanismus anderer GPCRs zu haben, die durch die Bindung von freien Liganden aktiviert werden. Doch die Analogie wird sichtbar, wenn die Bildung der aktiven Meta-II-Konformation als eine schrittweise Justierung der Protein-Struktur an das durch die Licht-Absorption entstandene *all-trans*-Retinal verstanden wird. Letzteres entsteht durch eine Isomerisierung aus dem inversen Agonisten *11-cis*-Retinal, welche wesentlich schneller abläuft, als das Protein folgen kann. Der Aktivierungsmechanismus kann in drei wesentliche Teilmechanismen untergliedert werden:

1.) die Speicherung der Energie eines absorbierten Photons durch *cis/trans*-Photoisomerisierung des Retinals, 2.) die thermische Entspannung des Retinal-Protein-Komplexes und die Übertragung der bei der Isomerisierung gespeicherten Photonen-Energie in das Protein und 3.) das späte Äquilibrium der Metarhodopsine in welchem eine zur Transducin-Aktivierung befähigte Proteinkonformation vorliegt und aufrecht erhalten wird (Okada et al., 2001). Die Resultate zeigen, dass das Fehlen eines intakten Retinal-Rings Auswirkungen auf alle drei Phasen hat. Werden die Konsequenzen der veränderten Ring-Struktur für alle drei Phasen verglichen, so ist die größte Bedeutung eines intakten Ringes in der 3. Phase, der Aufrechterhaltung der aktiven Konformation zu finden.

### a) Speicherung von Photonenenergie im Rhodopsin und Bildung der aktiven Konformation

Das *11-cis*-Retinal absorbiert ein Photon und infolge der Isomerisierung kommt es zu Verspannungen zwischen Retinal und Retinalbindungstasche und somit zur Speicherung eines Teils der Photonenenergie innerhalb des Rhodopsins.

Bereits 1983 wurde von Crouch *et al.* (1983) festgestellt, dass ein vollständiger  $\beta$ -Ionon-Ring nicht essentiell ist für die Bildung eines stabilen Pigments. Studien am *9-cis*-azyklischen Retinal zeigten aber, dass es eine „Minimal-Struktur“ des Retinals zur Bildung eines stabilen Pigments gibt, bei der mindestens die 12- und 12'-Methylgruppen des Retinals (siehe Abb. 50) vorhanden sein müssen. Es wurde angenommen, dass diese Methylgruppen zur Verankerung des Retinals in der Retinal-Bindungstasche nötig sind.

Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden, sowohl mit *9-cis*-azyklischem- wie auch mit *11-cis*-azyklischem Retinal wurden stabile Pigmente gebildet, die im unbelichteten Zustand auch bei Anwesenheit von Hydroxylamin stabil blieben. Die Regenerationszeit war allerdings bei solubilisierten Opsin-Membranen für die azyklischen Retinale mit einer Halbwertszeit von 15 Minuten fast sieben Mal so lang wie bei *11-cis*-Retinal.

Anhand von FTIR-Differenz-Spektren, die eine nur leichte Verschiebung der markanten Bande für die Isomerisierung von 11-*cis*-azyklischem Retinal zu all-*trans*-Retinal (bei 1238 cm<sup>-1</sup> (Siebert 1995)), zeigten, wurde der Schluss gezogen, dass durch die Ring-Modifikation am azyklischen Retinal der Isomerisierungs-Prozess nicht wesentlich verändert ist.

Darüber hinaus geht aus FTIR-Untersuchungen hervor, dass auch die für die frühen Batho- und Lumi-Intermediate typischen Banden im Differenzspektrum bei Anwesenheit von azyklischem Retinal nach der Belichtung des Rezeptors gefunden wurden (ausführlich dargelegt in Bartl *et al.* 2005) und somit davon ausgegangen werden kann, dass auch der Rezeptor mit azyklischem Retinal analog zum Wildtyprezeptor mit 11-*cis*-Retinal die strukturellen Veränderungen der frühen Batho- und Lumi-Intermediate durchläuft.

Die aktive Rezeptorkonformation von Rhodopsin, wie auch anderer GPCRs ist unter anderem durch die Aufnahme eines Protons gekennzeichnet (Arnis und Hofmann, 1993; Cohen et al., 1992; Scheer et al., 1997). Diese Protonenaufnahme benötigt Energie für den Fall, dass der pH-Wert der Lösung höher ist als der intrinsische pK<sub>a</sub>-Wert des Proteins. Somit ist der effektive pH-Wert, bei welchem Rhodopsin die aktive Meta-II-Konformation erreicht ein Maß dafür, wie viel Lichtenergie bei verschiedenen Chromophoren schließlich für die Konformationsänderung des Proteins zur Verfügung steht (Hofmann, 2000; Vogel et al., 2000).

Die Bildung der aktiven Meta-II-Konformation wurde in Bartl *et al.* (2005) anhand von FTIR-Differenzspektren für mit 11-*cis*-, 11-*cis*-azyklischem- sowie 11-*cis*-9-dm-Retinal regeneriertem Opsin bestimmt. Für azykl.-Rhodopsin wurde ein pK<sub>a</sub> von 5,2, für 9-dm-Rhodopsin ein pK<sub>a</sub> von 5,0 gegenüber einem pK<sub>a</sub> von 7,5 für natives Rhodopsin (Parkes und Liebman, 1984) ermittelt. Aus biologischer Sicht würde das gravierende Konsequenzen haben, da bei den Rezeptoren mit azyklischem Retinal wie auch mit 9-dm-Retinal keine ausreichenden Mengen (nur ca. 5 %) an Meta-II bei neutralem pH gebildet werden. Somit wäre die Verstärkung des Lichtsignals minimal.

Frühere Arbeiten zeigten, dass das Retinal insbesondere bei der Kontrolle der letzten Schritte des Aktivierungsprozesses eine Rolle spielt und die letzten konformativen Änderungen zum Erreichen von Meta-II determiniert (DeGrip und Rothschild, 2000; Meyer et al., 2000). Der Übergang zur aktiven Meta-II-Konformation ist durch einen Protonentransfer (Gegenion Glu113) und eine Protonenaufnahme (Beteiligung von Glu134) gekennzeichnet und es wird angenommen, dass das Retinal in der all-*trans*-Konformation diese Protonen-Transfer-Reaktionen determiniert (Arnis et al., 1994; Jäger et al., 1994; Meyer et al., 2000).

Anhand der Resultate kann das azyklische Retinal wie das 9-dm-Retinal als neuer partieller Agonist für Rhodopsin eingestuft werden. Damit stimmen auch die Ergebnisse der Versuche mit dem E134Q-Pigment überein. Durch das Ersetzen von Glu134 gegen Gln werden Ladungsänderungen in der hochkonservierten D(E)RY-Region vorweggenommen und die Folgen des partiellen Agonismus von azyklischem Retinal wie auch 9-dm-Retinal wieder aufgehoben.

**b) Rolle des Retinal-Rings bei der Aufrechterhaltung der aktiven Konformation**

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass Pigmente mit dem Ring-modifizierten azyklischen Retinal nach Belichtung und Bildung der aktiven Meta-II Konformation einem schnellen Aktivitätsverlust unterliegen. Daher liegt der Schluss nahe, dass der Ring in Meta-II fixiert sein muss. In Bartl *et al.* (2001) wurde bereits beschrieben, dass auch der zentrale Bereich der Polyen-Kette des all-*trans*-Retinals in Meta-II fixiert ist, womit eine Rück-Isomerisierung zur *cis*-Konformation verhindert wird. Der unter 5.4 beschriebene Aktivitätsverlust des Rezeptors mit azyklischem Retinal geht mit einem beobachtbaren Anstieg der Tryptophanfluoreszenz einher. Dagegen wurden keine signifikante Änderung der Rate der Schiffbase-Hydrolyse zwischen Retinal und Lys296 am Rezeptor mit azyklischem Retinal festgestellt (siehe 5.5.3). Wie die beiden letzten Befunde miteinander in Einklang gebracht werden können ist noch nicht vollständig geklärt. Diese Ergebnisse könnten so interpretiert werden, dass der beschleunigte Aktivitätsabfall von azykl.-Meta-II auf eine eingeschränkte Verankerung des Retinal-Rings (verglichen mit dem intakten  $\beta$ -Ionon-Ring) in der Retinal-Bindungstasche zurückzuführen ist, was eine höhere Flexibilität von Teilen des Proteins und somit den Verlust der aktiven Konformation zur Folge hat. Andererseits spricht die unveränderte Rate der Schiffbase-Hydrolyse dafür, dass die Polyenkette des Retinals in der Retinal-Bindungstasche fixiert bleibt und der normalen Zerfalls-Kinetik folgt, die mit der Weiterleitung der all-*trans*-Form des Retinals zur "exit-site" (nach Heck et al., 2003) korreliert ist.

Bei zukünftigen Untersuchungen wäre es interessant, die Auswirkung des Vorhandenseins weiterer Teile des Rings bezüglich der Verhinderung des beschleunigten Zerfalls zu untersuchen, z.B. die Anwesenheit der C17 Methylgruppe des 11-*cis*-Retinals oder der Doppelbindung zwischen den C-Atomen C5 und C6 (siehe Abb. 50).

Die Annahme, dass der Retinal-Ring eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der aktiven Meta-II-Konformation hat, wird durch eine NMR-Studie gestützt, in welcher gezeigt wurde, dass die C16/C17-Methyl-Gruppen in der Meta-II-Form stärker fixiert sind als im Grundzustand (Spooner et al., 2004).

**c) Resumé zur Funktion eines vollständigen  $\beta$ -Ionon-Rings des Retinal**

Im Fokus dieses Teils der vorliegenden Arbeit steht die Rolle des Retinal- $\beta$ -Ionon-Rings bei der Aktivierung des GPCRs Rhodopsin. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das azyklische Retinal als ein neuer partieller Agonist klassifiziert wurde.

Auch wenn Unterschiede bei der Aktivierung von Rhodopsin und azykl.-Rhodopsin gefunden wurden, so ist die initiale Energieaufnahme durch die Retinal-Isomerisierung sowie die Weiterleitung der Lichtenergie ins Protein für beide Pigmente im Wesentlichen gleich. Die veränderte Ringstruktur beim azyklischen Retinal kommt erst zum tragen, wenn durch Protonierungsreaktionen an konservierten Aminosäureresten und die damit verbundenen Helixbewegungen eine veränderte Umgebung des Retinals geschaffen wurde. Während dieser mikrostrukturellen Änderungen verbleibt

der zentrale Teil der Polyen-Kette des Chromophors festgehalten in der Retinal-Bindungstasche, so dass eine Rückisomerisierung verhindert (Ritter et al., 2004) und nur noch eine translative Bewegung des Chromophors (Patel et al., 2004) ermöglicht wird. Durch diese starke Einschränkung der Bewegungsmöglichkeiten des all-*trans*-Retinals könnte eine minimale translative Bewegung in Richtung Helix VI die beobachtete starke Bewegung des cytoplasmatischen Teils dieser Helix bewirken. Bei einem solchen Mechanismus würde die Halbierung des Rings zwangsläufig zu einer Destabilisierung der aktiven Rezeptor-Konformation führen. Es liegt nahe anzunehmen, dass andere GPCRs auf ähnliche Weise durch partielle Agonisten aktiviert werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels spektroskopischer Methoden Aspekte der Lichtaktivierung von Rhodopsin untersucht. Im Fokus der Arbeit standen dabei drei Teilbereiche: 1.) die Funktion des in GPCRs hoch konservierten NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motivs bei der Rezeptoraktivierung und bei der Kopplung an Gt, 2.) die Rolle der achten Helix bei der Interaktion mit dem G-Protein sowie 3.) die Funktion des  $\beta$ -Ionon-Rings des Retinals bei der Rezeptoraktivierung. Im Folgenden werden die Ergebnisse zusammengefasst.

### a) Die korrekte Positionierung der Helix-8 als strukturelle Determinante der Rhodopsinaktivierung

Neben der D(E)RY-Region am cytoplasmatischen Ende der Helix-III sowie dem Netzwerk aus Protonentransfergruppen zur Stabilisierung der Schiffbase zwischen Retinal und Opsin wurde mit der korrekten Positionierung der achten Helix eine weitere strukturelle Determinante des Aktivierungsmechanismus von Rhodopsin identifiziert. Eine ganze Reihe von Mutationen in dieser Region wurde charakterisiert, die einen Übergang des Rhodopsins zur aktiven Meta-II Konformation erleichtern, wie Studien mit dem partiellen Agonisten 9-dm-Retinal zeigten (siehe Abb. 15, Abb. 34, Abb. 43 und Abb. 46). Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass eine hydrophobe Brücke zwischen den aromatischen Seitenketten von Tyr306 und Phe313 den cytoplasmatischen Teil der siebten Transmembran-Helix mit der cytoplasmatischen achten Helix verbindet. Es ist gelungen, diese hydrophobe Brücke bezüglich der Funktionalität bei der Rhodopsinaktivierung durch eine Disulfidbrücke zu imitieren. Es bleibt jedoch die Frage, ob die anderen Mutationen (insbesondere im N-terminalen Bereich der Helix-8) nur eine Störung dieser hydrophoben Brücke und somit den erleichterten Meta-II Übergang bewirkten, oder ob durch die Mutationen die  $\alpha$ -helikale Struktur der Helix-8 gestört wird und diese strukturelle Änderung den beobachteten Effekt zur Folge hatte. Nähere Aufschlüsse könnten diesbezüglich zeitaufgelöste Fluoreszenz-Depolarisations-Messungen (nach Alexiev et al., 2003) bringen, bei welchen Cys316 mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird und anhand der zeitlichen Fluoreszenz-Depolarisation Rückschlüsse zur Mobilität der achten Helix bei Störung der hydrophoben Brücke zur Helix-VII gezogen werden. Auch kalorimetrische Messungen wären denkbar, bei welchen Aussagen zu einer möglichen veränderten Aktivierungsenergie getroffen werden könnten. Die Bereitstellung der für kalorimetrische Messungen nötigen Probenmengen (mg-Bereich) von den exprimierten Pigmenten ist allerdings sehr aufwendig.

Nicht zuletzt bleibt der Nachweis offen, dass der beobachtete erleichterte Meta-II-Übergang durch die erwähnten Mutationen in der Helix-8 auch funktionelle Folgen hat, nämlich die Destabilisierung des Rhodopsin-Grundzustandes. Mit den bisher verwendeten Methoden konnte noch keine signifikante Dunkelaktivität bei den rekombinanten Pigmenten festgestellt werden.

**b) Das NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv besteht aus mehreren Teilmotiven mit verschiedenen Funktionen**

Aus dieser Arbeit ging hervor, dass das NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv in mehrere Teilmotive mit verschiedenen Funktionen untergliedert werden muss. Wie bereits oben beschrieben wurde eine hydrophobe Brücke zwischen den aromatischen Seitenketten von Tyr306 und Phe313 identifiziert.

Prolin an Position 303 bewirkt eine Störung der  $\alpha$ -helikalen Struktur der siebten Helix, wodurch der cytoplasmatische Helixteil in der Dunkel-Konformation um ca. 40° abgelenkt ist (siehe Kristallstruktur). Die gesteigerte Fähigkeit des untersuchten Pigments P303A, Transducin zu aktivieren, ließe sich insofern erklären, als dass die Einführung eines Alanins an Position 303 eine  $\alpha$ -helikale Struktur der gesamten Helix-VII begünstigen würde und somit eine strukturelle Änderung dieser Helix während der Rhodopsinaktivierung vorweggenommen wäre. Eine solche starke strukturelle Änderung der Helixstruktur könnte möglicherweise durch EPR-Messungen (EPR engl. für „*electron paramagnetic resonance*“) nachgewiesen werden, bei welchen Distanzen innerhalb des Proteins zwischen speziell markierten Seitenketten ermittelt werden können (Altenbach et al., 1999).

Bei den Untersuchungen zum Pigment N302A wurden Indizien gefunden, dass Asn302 an der Informationsleitung von der Retinalbindungstasche zur cytoplasmatischen Oberfläche des Rezeptors beteiligt ist. In der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin ist eine große hydrophile Tasche mit vier Wassermolekülen sichtbar an deren Vernetzung innerhalb des Proteins neben Asp83, Met257 und Tyr301 auch die Seitenkette von Asn302 beteiligt ist. Änderungen von Wasserstoff-Bindungen an Asp83 werden bei der FTIR-Spektroskopie zur Charakterisierung des Meta-II Übergangs genutzt und die M257Y Mutante zeigt konstitutive Opsin-Aktivität (Kim et al., 2004). Diesbezüglich wäre es von großem Interesse mittels Mutagenesestudie die Funktion dieses Netzwerkes weiter aufzuklären.

Weiterhin sollen die veränderten Pigmente hinsichtlich einer veränderten Kinetik der Meta-II-Bildung untersucht werden. Dazu könnte der von Emeis *et al.* (1982) etablierte Versuchsaufbau genutzt werden, bei welchem Absorptionsänderungen nach einem Blitz im Millisekunden-Bereich aufgezeichnet werden können.

Es bleibt hervorzuheben, dass Asn302, Pro303 sowie Tyr306 nicht nur in unmittelbarer Nähe zueinander, sondern auch nur zwei Helixwindungen von Lys296, also der Retinal-Bindungsstelle am Opsin, entfernt lokalisiert sind, weshalb dem NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F-Motiv mit seinen verschiedenen Funktionen eine zentrale koordinative Rolle bei der Rezeptoraktivierung zugeordnet werden muss.

**c) Die Y(x)<sub>5,6</sub>F-Region ist an einer Bindungsstelle für Transducin beteiligt**

Der unter a) erwähnte erleichterte Übergang zur aktiven Meta-II Konformation nach Mutationen in der achten Helix spiegelte sich bei den meisten mutierten Pigmenten allerdings nicht in einer gesteigerten Fähigkeit Gt zu aktivieren wieder. Insbesondere bei Pigmenten, bei denen die hydrophobe Brücke zwischen Helix-VII und Helix-VIII gestört war, wurde ein drastischer Verlust der katalytischen Aktivität trotz ausgebildeter Meta-II Konformation (anhand von UV/Vis- und FTIR-Spektren) beobachtet. Dies ist ein klares Indiz für eine Beteiligung dieser Region an einer Gt-Bindungsstelle.

Doch die Frage bleibt offen, welche Gt-Domäne in der Region der achten Helix bindet. Die Stabilisierung von Meta-II (in Diskmembranen) durch das farnesylierte G $\gamma$ <sub>1</sub>(50-71)-Peptid wurde bereits 1999 von Kisselev *et al.* publiziert. UV/Vis-spektrometrisch konnten jedoch an den Detergensolubilisierten exprimierten 9-dm-Pigmenten keine signifikante Bindung des farnesylierten G $\gamma$ <sub>1</sub>(50-71)-Peptids beobachtet werden. Mithilfe des von Meyer *et al.* (2000) etablierten Photoregenerationsassays könnte eine solche Bindung des G $\gamma$ <sub>1</sub>-Peptids analysiert werden. Eine weitere Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Echtzeit stellt die kinetische Nahinfrarot-Lichtstreuung dar (Heck und Hofmann, 1993). Die dazu nötige Rekonstitution der exprimierten Pigmente in Phospholipid-Vesikeln ist etabliert (Beck *et al.*, 1998). Mit diesen Vesikeln könnten dann kinetische Messungen der Nahinfrarot-Lichtstreuung analog zu Herrmann *et al.* (2004) durchgeführt und mögliche Unterschiede bei der Gt-Bindung durch Änderungen in der Struktur der achten Helix festgestellt werden.

#### **d) Die Funktion des $\beta$ -Ionon-Rings vom Retinal**

In dieser Arbeit wurde die Funktion des Retinal-Rings bei der Rhodopsinaktivierung anhand eines Retinals studiert, bei welchem Teile des  $\beta$ -Ionon-Rings fehlten, dem sogenannten "azyklischen Retinal" (azykl.-Retinal). Dabei wurde herausgefunden, dass der intakte Ring, anders, als bisher vermutet, keine notwendige Voraussetzung für die lichtinduzierte Rhodopsinaktivierung ist. Dem azykl.-Retinal können Eigenschaften eines partiellen Agonisten zugeschrieben werden. Dabei ist die initiale Energieaufnahme durch die Retinal-Isomerisierung sowie die Weiterleitung der Lichtenergie ins Protein, trotz kleiner Unterschiede zur Aktivierung von Pigmenten mit 11-*cis*-Retinal, für beide Pigmente im Wesentlichen gleich. Diesbezüglich konnten die frühen Batho- und Lumi- wie auch die späten Meta-Intermediate anhand von FTIR-Differenzspektren identifiziert werden und somit kann davon ausgegangen werden, dass auch der Rezeptor mit azyklischem Retinal analog zum Wildtyprezeptor mit 11-*cis*-Retinal die strukturellen Veränderungen aller Photointermediate während der Aktivierung durchläuft. Allerdings wird durch das azykl.-Retinal weniger Energie auf das Protein übertragen, wodurch wesentlich weniger der aktiven Gt-bindenden Rezeptorkonformation gebildet wird. Als wichtigste Funktion des Retinal-Rings wurde jedoch die Aufrechterhaltung der aktiven Meta-II-Konformation identifiziert. Es wurde festgestellt, dass Pigmente mit dem Ring-modifizierten azyklischen Retinal nach Belichtung und Bildung der aktiven Meta-II Konformation einem schnellen Aktivitätsverlust unterliegen. Dabei wurde allerdings keine signifikante Änderung der Hydrolyserate der Schiffbase zwischen azyklischem Retinal und Opsin festgestellt. Beide Befunde weisen darauf hin, dass der beschleunigte Aktivitätsabfall von azykl.-Meta-II auf eine eingeschränkte Verankerung des Retinal-Rings (verglichen mit dem intakten  $\beta$ -Ionon-Ring) in der Retinal-Bindungstasche zurückzuführen ist, was eine höhere Flexibilität von Teilen des Proteins und somit den Verlust der aktiven Konformation zur Folge hat.





## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdulaev, N. G. und Ridge, K. D. (1998): Light-induced exposure of the cytoplasmic end of transmembrane helix seven in rhodopsin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 [22], Seite 12854-12859.
- Ablonczy, Z. ; Goletz, P. ; Knapp, D. R. und Crouch, R. K. (2002): Mass spectrometric analysis of porcine rhodopsin, *Photochemistry and Photobiology* 75 [3], Seite 316-321.
- Alexiev, U.; Rimke, I. und Pohlmann, T. (2003): Elucidation of the Nature of the Conformational Changes of the EF-interhelical Loop in Bacteriorhodopsin and of the Helix VIII on the Cytoplasmic Surface of Bovine Rhodopsin: A Time-resolved Fluorescence Depolarization Study, *J Mol Biol* 328 [3], Seite 705-19.
- Altenbach, C. ; Cai, K. ; Khorana, H. G. und Hubbell, W. L. (1999): Structural features and light-dependent changes in the sequence 306-322 extending from helix VII to the palmitoylation sites in rhodopsin: a site-directed spin-labeling study, *Biochemistry* 38 [25], Seite 7931-7937.
- Altenbach, C. ; Yang, K. ; Farrens, D. L. ; Farahbakhsh, Z. T. ; Khorana, H. G. und Hubbell, W. L. (1996): Structural features and light-dependent changes in the cytoplasmic interhelical E-F loop region of rhodopsin: a site-directed spin-labeling study, *Biochemistry* 35 [38], Seite 12470-12478.
- Arnis, S. ; Fahmy, K. ; Hofmann, K. P. und Sakmar, T. P. (1994): A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin, *Journal of Biological Chemistry* 269 [39], Seite 23879-23881.
- Arnis, S. und Hofmann, K. P. (1993): Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 [16], Seite 7849-7853.
- Arnis, S. und Hofmann, K. P. (1995): Photoregeneration of bovine rhodopsin from its signaling state, *Biochemistry* 34 [29], Seite 9333-9340.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. und Struhl, K. (1987): *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons, New York.
- Barak, L. S. ; Menard, L. ; Ferguson, S. S. ; Colapietro, A. M. und Caron, M. G. (1995): The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)<sub>2</sub>3Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the beta 2-adrenergic receptor, *Biochemistry* 34 [47], Seite 15407-15414.
- Bartl, F. ; Ritter, E. und Hofmann, K. P. (2000): FTIR spectroscopy of complexes formed between metarhodopsin II and C- terminal peptides from the G-protein alpha- and gamma-subunits, *FEBS Letters* 473 [2], Seite 259-264.
- Bartl, F. J.; Ritter, E. und Hofmann, K. P. (2001): Signaling States of Rhodopsin. Absorption of light in active metarhodopsin II generates an all-trans-retinal bound inactive state, *Journal of Biological Chemistry* 276 [32], Seite 30161-30166.
- Bartl, Franz J.; Fritze, Olaf; Ritter, Eglof; Herrmann, Rolf; Kuksa, Vladimir; Palczewski, Krzysztof; Hofmann, Klaus Peter und Ernst, Oliver P. (2005): Partial agonism in a G protein-coupled receptor: Role of the retinal ring structure in rhodopsin activation, *J. Biol. Chem.*, Seite M505260200.
- Beck, M. ; Sakmar, T. P. und Siebert, F. (1998): Spectroscopic evidence for interaction between transmembrane helices 3 and 5 in rhodopsin, *Biochemistry* 37 [20], Seite 7630-7639.

- Bennett, N. und Dupont, Y. (1985): The G-protein of retinal rod outer segments (transducin). Mechanism of interaction with rhodopsin and nucleotides, *Journal of Biological Chemistry* 260 [7], Seite 4156-4168.
- Borhan, B. ; Souto, M. L. ; Imai, H. ; Shichida, Y. und Nakanishi, K. (2000): Movement of retinal along the visual transduction path, *Science* 288 [5474], Seite 2209-2212.
- Bourne, H. R. (1997): How receptors talk to trimeric G proteins, *Curr Opin Cell Biol* 9 [2], Seite 134-42.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, Seite 248-254.
- Breikers, G. ; Bovee-Geurts, P. H. ; DeCaluwe, G. L. und DeGrip, W. J. (2001): A structural role for Asp83 in the photoactivation of rhodopsin, *Biological Chemistry* 382 [8], Seite 1263-1270.
- Cai, K. ; Klein Seetharaman, J. ; Farrens, D. ; Zhang, C. ; Altenbach, C. ; Hubbell, W. L. und Khorana, H. G. (1999): Single-cysteine substitution mutants at amino acid positions 306-321 in rhodopsin, the sequence between the cytoplasmic end of helix VII and the palmitoylation sites: sulfhydryl reactivity and transducin activation reveal a tertiary structure, *Biochemistry* 38 [25], Seite 7925-7930.
- Cai, K. ; Langen, R. ; Hubbell, W. L. und Khorana, H. G. (1997): Structure and function in rhodopsin: topology of the C-terminal polypeptide chain in relation to the cytoplasmic loops, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 [26], Seite 14267-14272.
- Chabre, M.; Cone, R. und Saibil, H. (2003): Biophysics: is rhodopsin dimeric in native retinal rods?, *Nature* 426 [6962], Seite 30-1; discussion 31.
- Cohen, G. B. ; Oprian, D. D. und Robinson, P. R. (1992): Mechanism of activation and inactivation of opsin: role of Glu113 and Lys296, *Biochemistry* 31 [50], Seite 12592-12601.
- Coleman, D. E.; Lee, E.; Mixon, M. B.; Linder, M. E.; Berghuis, A. M.; Gilman, A. G. und Sprang, S. R. (1994): Crystallization and preliminary crystallographic studies of Gi alpha 1 and mutants of Gi alpha 1 in the GTP and GDP-bound states, *J Mol Biol* 238 [4], Seite 630-4.
- Crouch, R. und Or, Y. S. (1983): Opsin pigments formed with acyclic retinal analogues : Minimum 'ring portion' requirements for opsin pigment formation, *FEBS Letters* 158 [1], Seite 139-142.
- Davis, L. G.; Kuehl, W. M. und Battey, J. F. (1994): *Basic Methods in Molecular Biology*, 2nd edition. Auflage, Edition, 2nd, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, ISBN: 0838506429.
- DeCaluwe, G. L. ; Bovee Geurts, P. H. ; Rath, P. ; Rothschild, K. J. und de Grip, W. J. (1995): Effect of carboxyl mutations on functional properties of bovine rhodopsin, *Biophysical Chemistry* 56 [1-2], Seite 79-87.
- DeGrip, W.J. und Rothschild, K.J. (2000): Structure and mechanism of vertebrate visual pigments, Stavenga, D.G. ; DeGrip, W.J. und Pugh, E.N. Jr., *Molecular Mechanism in visual transduction* 3 Seite 1-54, Elsevier, Amsterdam.
- Dohlman, H. G.; Thorner, J.; Caron, M. G. und Lefkowitz, R. J. (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors, *Annu Rev Biochem* 60, Seite 653-88.
- Edwards, P. C.; Li, J.; Burghammer, M.; McDowell, J. H.; Villa, C.; Hargrave, P. A. und Schertler, G. F. (2004): Crystals of native and modified bovine rhodopsins and their heavy atom derivatives, *J Mol Biol* 343 [5], Seite 1439-50.
- Elling, C. E. ; Thirstrup, K. ; Holst, B. und Schwartz, T. W. (1999): Conversion of agonist site to metal-ion chelator site in the beta(2)- adrenergic receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 [22], Seite 12322-12327.

- Emeis, D. und Hofmann, K. P. (1981): Shift in the relation between flash-induced metarhodopsin I and metarhodopsin II within the first 10% rhodopsin bleaching in bovine disc membranes, FEBS Letters 136 [2], Seite 201-207.
- Emeis, D. ; Kühn, H. ; Reichert, J. und Hofmann, K. P. (1982): Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes leads to a shift of the photoproduct equilibrium, FEBS Letters 143 [1], Seite 29-34.
- Ernst, O. P. ; Bieri, C. ; Vogel, H. und Hofmann, K. P. (2000): Intrinsic biophysical monitors of transducin activation: fluorescence, UV-visible spectroscopy, light scattering, and evanescent field techniques, Methods in Enzymology 315, Seite 471-489.
- Ernst, O. P. ; Hofmann, K. P. und Sakmar, T. P. (1995): Characterization of rhodopsin mutants that bind transducin but fail to induce GTP nucleotide uptake. Classification of mutant pigments by fluorescence, nucleotide release, and flash-induced light-scattering assays, Journal of Biological Chemistry 270 [18], Seite 10580-10586.
- Ernst, O. P. ; Meyer, C. K. ; Marin, E. P. ; Henklein, P. ; Fu, W. Y. ; Sakmar, T. P. und Hofmann, K. P. (2000): Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin alpha and gamma subunits, Journal of Biological Chemistry 275 [3], Seite 1937-1943.
- Ernst, O. P. ; Hofmann, K. P. und Palczewski, K. (2003): Vertebrate rhodopsin, Batschauer, A., Photoreceptors and light signalling 3 Seite 77-123, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Fahmy, K. ; Jäger, F. ; Beck, M. ; Zvyaga, T. A. ; Sakmar, T. P. und Siebert, F. (1993): Protonation states of membrane-embedded carboxylic acid groups in rhodopsin and metarhodopsin II: a Fourier-transform infrared spectroscopy study of site-directed mutants, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 [21], Seite 10206-10210.
- Fahmy, K. ; Sakmar, T. P. und Siebert, F. (2000): Transducin-dependent protonation of glutamic acid 134 in rhodopsin, Biochemistry 39 [34], Seite 10607-10612.
- Farahbakhsh, Z. T. ; Ridge, K. D. ; Khorana, H. G. und Hubbell, W. L. (1995): Mapping light-dependent structural changes in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin: a site-directed spin labeling study, Biochemistry 34 [27], Seite 8812-8819.
- Farrens, D. L. ; Altenbach, C. ; Yang, K. ; Hubbell, W. L. und Khorana, H. G. (1996): Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin, Science 274 [5288], Seite 768-770.
- Farrens, D. L. und Khorana, H. G. (1995): Structure and function in rhodopsin. Measurement of the rate of metarhodopsin II decay by fluorescence spectroscopy, Journal of Biological Chemistry 270 [10], Seite 5073-5076.
- Faurobert, E. ; Chen, C. K. ; Hurley, J. B. und Teng, D. H. (1996): Drosophila neurocalcin, a fatty acylated, Ca<sup>2+</sup>-binding protein that associates with membranes and inhibits in vitro phosphorylation of bovine rhodopsin, Journal of Biological Chemistry 271 [17], Seite 10256-10262.
- Fawzi, A. B. und Northup, J. K. (1990): Guanine nucleotide binding characteristics of transducin: essential role of rhodopsin for rapid exchange of guanine nucleotides, Biochemistry 29 [15], Seite 3804-3812.
- Ferretti, L. ; Karnik, S. S. ; Khorana, H. G. ; Nassal, M. und Oprian, D. D. (1986): Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83 [3], Seite 599-603.

- Filipek, S.; Stenkamp, R. E.; Teller, D. C. und Palczewski, K. (2003): G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RHODOPSIN: A Prospectus, *Annu Rev Physiol* 65, Seite 851-79.
- Fliesler, S. J. und Basinger, S. F. (1985): Tunicamycin blocks the incorporation of opsin into retinal rod outer segment membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [4], Seite 1116-20.
- Fliesler, S. J.; Rayborn, M. E. und Hollyfield, J. G. (1985): Membrane morphogenesis in retinal rod outer segments: inhibition by tunicamycin, *J Cell Biol* 100 [2], Seite 574-87.
- Fotiadis, D.; Liang, Y.; Filipek, S.; Saperstein, D. A.; Engel, A. und Palczewski, K. (2003): Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes, *Nature* 421 [6919], Seite 127-8.
- Fotiadis, D.; Liang, Y.; Filipek, S.; Saperstein, D. A.; Engel, A. und Palczewski, K. (2003): Biophysics (communication arising): Is rhodopsin dimeric in native retinal rods?, *Nature* 426 [6962], Seite 31.
- Fotiadis, D.; Liang, Y.; Filipek, S.; Saperstein, D. A.; Engel, A. und Palczewski, K. (2004): The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane, *FEBS Lett* 564 [3], Seite 281-8.
- Franke, R. R. ; König, B. ; Sakmar, T. P. ; Khorana, H. G. und Hofmann, K. P. (1990): Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transducin, *Science* 250 [4977], Seite 123-125.
- Franke, R. R. ; Sakmar, T. P. ; Graham, R. M. und Khorana, H. G. (1992): Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin, *Journal of Biological Chemistry* 267 [21], Seite 14767-14774.
- Franke, R. R. ; Sakmar, T. P. ; Oprian, D. D. und Khorana, H. G. (1988): A single amino acid substitution in rhodopsin (lysine 248----leucine) prevents activation of transducin, *Journal of Biological Chemistry* 263 [5], Seite 2119-2122.
- Fritze, O.; Filipek, S.; Kuksa, V.; Palczewski, K.; Hofmann, K. P. und Ernst, O. P. (2003): Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [5], Seite 2290-2295.
- Fukuda, M. N. ; Papermaster, D. S. und Hargrave, P. A. (1979): Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH2 terminus, *Journal of Biological Chemistry* 254 [17], Seite 8201-8207.
- Fung, B. K. und Nash, C. R. (1983): Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. II. Evidence for distinct binding sites and conformational changes revealed by limited proteolysis with trypsin, *Journal of Biological Chemistry* 258 [17], Seite 10503-10510.
- Garcia, P. D. ; Onrust, R. ; Bell, S. M. ; Sakmar, T. P. und Bourne, H. R. (1995): Transducin-alpha C-terminal mutations prevent activation by rhodopsin: a new assay using recombinant proteins expressed in cultured cells, *EMBO Journal* 14 [18], Seite 4460-4469.
- Gibson, N. J. und Brown, M. F. (1993): Lipid headgroup and acyl chain composition modulate the MI-MII equilibrium of rhodopsin in recombinant membranes, *Biochemistry* 32 [9], Seite 2438-2454.
- Gibson, S. K. ; Parkes, J. H. und Liebman, P. A. (2000): Phosphorylation Modulates the Affinity of Light-Activated Rhodopsin for G Protein and Arrestin, *Biochemistry* 39 [19], Seite 5738-5749.
- Gluzman, Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants, *Cell* 23 [1], Seite 175-82.
- Grassetti, D. R. und Murray, J. F., Jr. (1967): Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine, *Arch Biochem Biophys* 119 [1], Seite 41-9.
- Gudermann, T. ; Kalkbrenner, F. und Schultz, G. (1996): Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36, Seite 429-459.

- Hamm, H. E. (1998): The many faces of G protein signaling, *Journal of Biological Chemistry* 273 [2], Seite 669-672.
- Hamm, H. E. (2001): How activated receptors couple to G proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 [9], Seite 4819-4821.
- Hamm, H. E. ; Deretic, D. ; Arendt, A. ; Hargrave, P. A. ; Koenig, B. und Hofmann, K. P. (1988): Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit, *Science* 241 [4867], Seite 832-835.
- Han, M. ; Groesbeek, M. ; Smith, S. O. und Sakmar, T. P. (1998): Role of the C9 methyl group in rhodopsin activation: characterization of mutant opsins with the artificial chromophore 11-cis-9-demethylretinal, *Biochemistry* 37 [2], Seite 538-545.
- Han, M. und Sakmar, T. P. (2000): Assays for activation of recombinant expressed opsins by all-trans-retinals, *Methods in Enzymology* 315, Seite 251-267.
- Han, M. ; Smith, S. O. und Sakmar, T. P. (1998): Constitutive activation of opsin by mutation of methionine 257 on transmembrane helix 6, *Biochemistry* 37 [22], Seite 8253-8261.
- Hargrave, P. A. ; Hamm, H. E. und Hofmann, K. P. (1993): Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin, *Bioessays* 15 [1], Seite 43-50.
- Hargrave, P. A. und McDowell, J. H. (1992): Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors, *FASEB Journal* 6 [6], Seite 2323-2331.
- He, W.; Cowan, C. W. und Wensel, T. G. (1998): RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction, *Neuron* 20 [1], Seite 95-102.
- Heck, M. und Hofmann, K. P. (1993): G-protein-effector coupling: a real-time light-scattering assay for transducin-phosphodiesterase interaction, *Biochemistry* 32 [32], Seite 8220-8227.
- Heck, M. und Hofmann, K.P. (2001): Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism, *Journal of Biological Chemistry* 276 [13], Seite 10000-10009.
- Heck, M. ; Pulvermüller, A. und Hofmann, K. P. (2000): Light scattering methods to monitor interactions between rhodopsin- containing membranes and soluble proteins, *Methods in Enzymology* 315, Seite 329-347.
- Heck, M.; Schädel, S. A.; Marezki, D.; Bartl, F. J.; Ritter, E.; Palczewski, K. und Hofmann, K. P. (2003): Signaling States of Rhodopsin. Formation of the storage form, metarhodopsin III, from active metarhodopsin II, *J. Biol. Chem.* 278 [5], Seite 3162-3169.
- Heck, M.; Schädel, S. A.; Marezki, D. und Hofmann, K. P. (2003): Secondary binding sites of retinoids in opsin: characterization and role in regeneration, *Vision Res* 43 [28], Seite 3003-10.
- Helmreich, E. J. und Hofmann, K. P. (1996): Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer, *Biochimica et Biophysica Acta* 1286 [3], Seite 285-322.
- Hermans, E. (2003): Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors, *Pharmacol Ther* 99 [1], Seite 25-44.
- Herrmann, R.; Heck, M.; Henklein, P.; Henklein, P.; Kleuss, C.; Hofmann, K. P. und Ernst, O. P. (2004): Sequence of interactions in receptor-G protein coupling, *J Biol Chem* 279, Seite 24283-24290.
- Hessel, E. ; Müller, P. ; Herrmann, A. und Hofmann, K. P. (2001): Light induced reorganization of phospholipids in rod disc membranes, *Journal of Biological Chemistry* 276, Seite 2538-2543.

- Higashijima, T. ; Ferguson, K. M. ; Sternweis, P. C. ; Smigel, M. D. und Gilman, A. G. (1987): Effects of Mg<sup>2+</sup> and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins, *Journal of Biological Chemistry* 262 [2], Seite 762-766.
- Hofmann, K. P. (1985): Effect of GTP on the rhodopsin-G-protein complex by transient formation of extra metarhodopsin II, *Biochimica et Biophysica Acta* 810 [2], Seite 278-281.
- Hofmann, K. P. und Ernst, O. P. (2001): [To see from light--biophysics of visual signal transduction], *Zeitschrift für Medizinische Physik* 11 [4], Seite 217-225.
- Hofmann, K.P. (1999): Signalling states of photoactivated rhodopsin., *Rhodopsins and phototransduction* 224 Seite 159-175, John Wiley & Sons, Chichester.
- Hofmann, K.P. (2000): Late photoproducts and signaling states of bovine rhodopsin, Stavenga, D.G. ; DeGrip, W.J. und Pugh, E.N. Jr., *Molecular Mechanism in visual transduction* 3 Seite 91-142, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Hubbell, W. L.; Altenbach, C.; Hubbell, C. M. und Khorana, H. G. (2003): Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking, *Adv Protein Chem* 63, Seite 243-90.
- Jäger, F. ; Fahmy, K. ; Sakmar, T. P. und Siebert, F. (1994): Identification of glutamic acid 113 as the Schiff base proton acceptor in the metarhodopsin II photointermediate of rhodopsin, *Biochemistry* 33 [36], Seite 10878-10882.
- Jäger, F. ; Jäger, S. ; Kräutle, O. ; Friedman, N. ; Sheves, M. ; Hofmann, K. P. und Siebert, F. (1994): Interactions of the beta-ionone ring with the protein in the visual pigment rhodopsin control the activation mechanism. An FTIR and fluorescence study on artificial vertebrate rhodopsins, *Biochemistry* 33 [23], Seite 7389-7397.
- Jensen, F. C.; Girardi, A. J.; Gilden, R. V. und Koprowski, H. (1964): Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 52, Seite 53-9.
- Kahlert, M. ; König, B. und Hofmann, K. P. (1990): Displacement of rhodopsin by GDP from three-loop interaction with transducin depends critically on the diphosphate beta-position, *Journal of Biological Chemistry* 265 [31], Seite 18928-18932.
- Karnaukhova, E.; Hu, S. H.; Boonyasai, R.; Tan, Q. und Nakanishi, K. (1999): Bioactivity of visual pigments with sterically modified retinal analogs, *Bioorganic Chemistry* 27 [5], Seite 372-382.
- Kaushal, S. ; Ridge, K. D. und Khorana, H. G. (1994): Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 [9], Seite 4024-4028.
- Kean, E. L. (1999): The dolichol pathway in the retina and its involvement in the glycosylation of rhodopsin, *Biochim Biophys Acta* 1473 [2-3], Seite 272-85.
- Khorana, H. G. (1993): Two light-transducing membrane proteins: bacteriorhodopsin and the mammalian rhodopsin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 [4], Seite 1166-1171.
- Kim, J. M.; Hwa, J.; Garriga, P.; Reeves, P. J.; Rajbhandary, U. L. und Khorana, H. G. (2005): Light-Driven Activation of beta(2)-Adrenergic Receptor Signaling by a Chimeric Rhodopsin Containing the beta(2)-Adrenergic Receptor Cytoplasmic Loops, *Biochemistry* 44 [7], Seite 2284-92.
- Kim, J.-M.; Altenbach, C.; Kono, M.; Oprian, D. D.; Hubbell, W. L. und Khorana, H. G. (2004): Structural origins of constitutive activation in rhodopsin: Role of the K296/E113 salt bridge, *PNAS* 101 [34], Seite 12508-12513.

- Kisselev, O. ; Ermolaeva, M. und Gautam, N. (1995): Efficient interaction with a receptor requires a specific type of prenyl group on the G protein gamma subunit, *Journal of Biological Chemistry* 270 [43], Seite 25356-25358.
- Kisselev, O. G. ; Ermolaeva, M. V. und Gautam, N. (1994): A farnesylated domain in the G protein gamma subunit is a specific determinant of receptor coupling, *Journal of Biological Chemistry* 269 [34], Seite 21399-21402.
- Kisselev, O. G. ; Kao, J. ; Ponder, J. W. ; Fann, Y. C. ; Gautam, N. und Marshall, G. R. (1998): Light-activated rhodopsin induces structural binding motif in G protein alpha subunit, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, Seite 4270-4275.
- Kisselev, O. G. ; Meyer, C. K. ; Heck, M. ; Ernst, O. P. und Hofmann, K. P. (1999): Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: evidence for a two-site sequential fit mechanism., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 [9], Seite 4898-4903.
- Kisselev, O. G. und Downs, M. A. (2003): Rhodopsin Controls a Conformational Switch on the Transducin gamma Subunit, *Structure (Camb)* 11 [4], Seite 367-73.
- Kochendoerfer, G. G. ; Lin, S. W. ; Sakmar, T. P. und Mathies, R. A. (1999): How color visual pigments are tuned, *Trends in Biochemical Sciences* 24 [8], Seite 300-305.
- König, B. ; Arendt, A. ; McDowell, J. H. ; Kahlert, M. ; Hargrave, P. A. und Hofmann, K. P. (1989): Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 [18], Seite 6878-6882.
- Kropf, A. ; Whittenberger, B. P. ; Goff, S. P. und Waggoner, A. S. (1973): The spectral properties of some visual pigment analogs, *Experimental Eye Research* 17 [6], Seite 591-606.
- Kühn, H. (1982): Light-regulated binding of proteins to photoreceptor membranes and its use for the purification of several rod cell proteins, *Methods in Enzymology* 81, Seite 556-564.
- Kühne, W. (1878): Über den Sehpurpur, *Untersuchungen aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg 1*, Carl Winters Universitätsbuchhandlung, Heidelberg, Deutschland.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [259], Seite 680-685.
- Lambright, D. G. ; Noel, J. P. ; Hamm, H. E. und Sigler, P. B. (1994): Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein [see comments], *Nature* 369 [6482], Seite 621-628.
- Lambright, D. G. ; Sondek, J. ; Bohm, A. ; Skiba, N. P. ; Hamm, H. E. und Sigler, P. B. (1996): The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein [see comments], *Nature* 379 [6563], Seite 311-319.
- Lewis, J. W. ; Szundi, I. und Kliger, D. S. (2000): Structural constraints imposed by a non-native disulfide cause reversible changes in rhodopsin photointermediate kinetics, *Biochemistry* 39 [27], Seite 7851-7855.
- Liang, Y. ; Fotiadis, D. ; Filipek, S. ; Saperstein, D. A. ; Palczewski, K. und Engel, A. (2003): Organization of the G Protein-coupled Receptors Rhodopsin and Opsin in Native Membranes, *J. Biol. Chem.* 278, Seite 21655-21662.
- Longstaff, C. ; Calhoun, R. D. und Rando, R. R. (1986): Deprotonation of the Schiff base of rhodopsin is obligate in the activation of the G protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 [12], Seite 4209-4213.
- Ludeke, S. ; Beck, M. ; Yan, E. C. ; Sakmar, T. P. ; Siebert, F. und Vogel, R. (2005): The Role of Glu181 in the Photoactivation of Rhodopsin, *J Mol Biol.*

- Marin, E. P. ; Krishna, A. G. und Sakmar, T. P. (2002): Disruption of the alpha5 Helix of Transducin Impairs Rhodopsin- Catalyzed Nucleotide Exchange, *Biochemistry* 41 [22], Seite 6988-6994.
- Marin, E. P. ; Krishna, A. G. ; Zvyaga, T. A. ; Isele, J. ; Siebert, F. und Sakmar, T. P. (2000): The amino terminus of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin modulates rhodopsin-transducin interaction, *Journal of Biological Chemistry* 275 [3], Seite 1930-1936.
- Martin, E. L. ; Rens Domiano, S. ; Schatz, P. J. und Hamm, H. E. (1996): Potent peptide analogues of a G protein receptor-binding region obtained with a combinatorial library, *Journal of Biological Chemistry* 271 [1], Seite 361-366.
- Melia, T. J. Jr; Cowan, C. W. ; Angleson, J. K. und Wensel, T. G. (1997): A comparison of the efficiency of G protein activation by ligand-free and light-activated forms of rhodopsin, *Biophysical Journal* 73 [6], Seite 3182-3191.
- Menon, S. T. ; Han, M. und Sakmar, T. P. (2001): Rhodopsin: Structural Basis of Molecular Physiology, *Physiological Reviews* 81 [4], Seite 1659-1688.
- Meyer, C. K. ; Böhme, M. ; Ockenfels, A. ; Gärtner, W. ; Hofmann, K. P. und Ernst, O. P. (2000): Signaling states of rhodopsin: Retinal provides a scaffold for activating proton transfer switches, *Journal of Biological Chemistry* 275, Seite 19713-19718.
- Mirzadegan, T.; Benko, G.; Filipek, S. und Palczewski, K. (2003): Sequence analyses of g-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin, *Biochemistry* 42 [14], Seite 4310.
- Mitchell, R. ; McCulloch, D. ; Lutz, E. ; Johnson, M. ; MacKenzie, C. ; Fennell, M. ; Fink, G. ; Zhou, W. und S.C., Sealfon (1998): Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D, *Nature* 392, Seite 411-414.
- Molday, R. S. und MacKenzie, D. (1983): Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-reactivity, and application as structural probes, *Biochemistry* 22 [3], Seite 653-60.
- Molday, R.S. und Kaupp, U.B. (2000): Ion channels of vertebrate photoreceptors, Pugh, E.N. Jr., *Molecular Mechanism in visual transduction* 3 Seite 143-182, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Muller, F. und Kaupp, U. B. (1998): [Signal transduction in photoreceptor cells], *Naturwissenschaften* 85 [2], Seite 49-61.
- Natochin, M. ; Moussaif, M. und Artemyev, N. O. (2001): Probing the mechanism of rhodopsin-catalyzed transducin activation, *Journal of Neurochemistry* 77 [1], Seite 202-210.
- Noel, J. P. ; Hamm, H. E. und Sigler, P. B. (1993): The 2.2 Å crystal structure of transducin-alpha complexed with GTP gamma S [see comments], *Nature* 366 [6456], Seite 654-663.
- Ohguro, H. ; Palczewski, K. ; Ericsson, L. H. ; Walsh, K. A. und Johnson, R. S. (1993): Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites, *Biochemistry* 32 [21], Seite 5718-5724.
- Okada, T. ; Ernst, O.P. ; Palczewski, K. und Hofmann, K.P. (2001): Activation of rhodopsin: New insights from structural and biochemical studies, *Trends in Biochemical Sciences* 26, Seite 318-324.
- Okada, T. ; Fujiyoshi, Y. ; Silow, M. ; Navarro, J. ; Landau, E. M. und Shichida, Y. (2002): Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by x- ray crystallography, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Entel, P. und Buss, V. (2004): The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure, *J Mol Biol* 342 [2], Seite 571-83.



- Oprian, D. D. ; Molday, R. S. ; Kaufman, R. J. und Khorana, H. G. (1987): Expression of a synthetic bovine rhodopsin gene in monkey kidney cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 [24], Seite 8874-8878.
- Osawa, S. und Weiss, E. R. (1994): The carboxyl terminus of bovine rhodopsin is not required for G protein activation, *Molecular Pharmacology* 46 [6], Seite 1036-1040.
- Palczewski, K. ; Hargrave, P. A. ; McDowell, J. H. und Ingebritsen, T. S. (1989): The catalytic subunit of phosphatase 2A dephosphorylates phosphoropsin, *Biochemistry* 28 [2], Seite 415-419.
- Palczewski, K. ; Jäger, S. ; Buczylo, J. ; Crouch, R. K. ; Bredberg, D. L. ; Hofmann, K. P. ; Asson Batres, M. A. und Saari, J. C. (1994): Rod outer segment retinol dehydrogenase: substrate specificity and role in phototransduction, *Biochemistry* 33 [46], Seite 13741-13750.
- Palczewski, K. ; Kumasaka, T. ; Hori, T. ; Behnke, C. A. ; Motoshima, H. ; Fox, B. A. ; Le Trong, I. ; Teller, D. C. ; Okada, T. ; Stenkamp, R. E. ; Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000): Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, *Science* 289 [5480], Seite 739-745.
- Palczewski, K. ; Van Hooser, J. P. ; Garwin, G. G. ; Chen, J. ; Liou, G. I. und Saari, J. C. (1999): Kinetics of visual pigment regeneration in excised mouse eyes and in mice with a targeted disruption of the gene encoding interphotoreceptor retinoid-binding protein or arrestin, *Biochemistry* 38 [37], Seite 12012-12019.
- Palings, I.; Pardoën, J. A.; van den Berg, E.; Winkel, C.; Lugtenburg, J. und Mathies, R. A. (1987): Assignment of fingerprint vibrations in the resonance Raman spectra of rhodopsin, isorhodopsin, and bathorhodopsin: implications for chromophore structure and environment, *Biochemistry* 26 [9], Seite 2544-56.
- Panico, J. ; Parkes, J. H. und Liebman, P. A. (1990): The effect of GDP on rod outer segment G-protein interactions, *Journal of Biological Chemistry* 265 [31], Seite 18922-18927.
- Papermaster, D.S. (1982): Preparation of retinal rod outer segments, *Methods in Enzymology* 81, Seite 48-52.
- Parkes, J. H. und Liebman, P. A. (1984): Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions, *Biochemistry* 23 [21], Seite 5054-5061.
- Patel, A. B.; Crocker, E.; Eilers, M.; Hirshfeld, A.; Sheves, M. und Smith, S. O. (2004): Coupling of retinal isomerization to the activation of rhodopsin, *PNAS*, Seite 0402848101.
- Peroutka, S. J. und Howell, T. A. (1994): The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors, *Neuropharmacology* 33 [3-4], Seite 319-24.
- Phillips, W. J. und Cerione, R. A. (1988): The intrinsic fluorescence of the alpha subunit of transducin. Measurement of receptor-dependent guanine nucleotide exchange, *Journal of Biological Chemistry* 263 [30], Seite 15498-15505.
- Phillips, W. J. und Cerione, R. A. (1992): Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin-beta gamma subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy, *Journal of Biological Chemistry* 267 [24], Seite 17032-17039.
- Prasad, A. V.; Plantner, J. J. und Kean, E. L. (1992): Effect of enzymatic deglycosylation on the regenerability of bovine rhodopsin, *Exp Eye Res* 54 [6], Seite 913-20.
- Prioleau, C. ; Visiers, I. ; Ebersole, B. J. ; Weinstein, H. und Sealton, S. C. (2002): Conserved helix 7 tyrosine acts as a multistate conformational switch in the 5HT2C receptor. Identification of a novel "locked-on" phenotype and double revertant mutations, *Journal of Biological Chemistry* *J Biol Chem* 277 [39], Seite 36577-36584.

- Probst, W. C. ; Snyder, L. A. ; Schuster, D. I. ; Brosius, J. und Sealfon, S. C. (1992): Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily, *DNA and Cell Biology* 11 [1], Seite 1-20.
- Pugh, E. N. Jr. und Lamb, T. D. (1993): Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction, *Biochimica et Biophysica Acta* 1141 [2-3], Seite 111-149.
- Rao, V. R. und Oprian, D. D. (1996): Activating mutations of rhodopsin and other G protein-coupled receptors, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 25, Seite 287-314.
- Reeves, P. J. ; Thurmond, R. L. und Khorana, H. G. (1996): Structure and function in rhodopsin: high level expression of a synthetic bovine opsin gene and its mutants in stable mammalian cell lines, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 [21], Seite 11487-11492.
- Renk, G. und Crouch, R. K. (1989): Analogue pigment studies of chromophore-protein interactions in metarhodopsins, *Biochemistry* 28 [2], Seite 907-912.
- Rios, C. D. ; Jordan, B. A. ; Gomes, I. und Devi, L. A. (2001): G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function, *Pharmacology & Therapeutics* 92 [2-3], Seite 71-87.
- Ritter, E.; Zimmermann, K.; Heck, M.; Hofmann, K. P. und Bartl, F. J. (2004): Transition of rhodopsin into the active metarhodopsin II state opens a new light induced pathway linked to Schiff base isomerization, *J. Biol. Chem.* 279, Seite 48102-11.
- Robinson, P. R. ; Cohen, G. B. ; Zhukovsky, E. A. und Oprian, D. D. (1992): Constitutively active mutants of rhodopsin, *Neuron* 9 [4], Seite 719-725.
- Rodieck, R.W. (1998): *The first steps in seeing*, Sinauer Associated, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Rondard, P. ; Iiri, T. ; Srinivasan, S. ; Meng, E. ; Fujita, T. und Bourne, H. R. (2001): Mutant G protein alpha subunit activated by Gbeta gamma : A model for receptor activation?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 [11], Seite 6150-6155.
- Rosevear, P.; VanAken, T.; Baxter, J. und Ferguson-Miller, S. (1980): Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome c oxidase, *Biochemistry* 19 [17], Seite 4108-15.
- Sakmar, T. P. ; Franke, R. R. und Khorana, H. G. (1989): Glutamic acid-113 serves as the retinylidene Schiff base counterion in bovine rhodopsin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 [21], Seite 8309-8313.
- Sakmar, T.P. (1998): Rhodopsin: A prototypical G protein-coupled receptor, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 59, Seite 1-34.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 [12], Seite 5463-7.
- Schädel, S. A.; Heck, M.; Maretzki, D.; Filipek, S.; Teller, D. C.; Palczewski, K. und Hofmann, K. P. (2003): Ligand Channeling within a G-protein-coupled Receptor: The entry and exit of retinals in native opsin, *J. Biol. Chem.* 278 [27], Seite 24896-24903.
- Scheer, A. ; Fanelli, F. ; Costa, T. ; De Benedetti, P. G. und Cotecchia, S. (1997): The activation process of the alpha1B-adrenergic receptor: potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 [3], Seite 808-813.
- Schenborn, E. T. und Goiffon, V. (2000): DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells, *Methods Mol Biol* 130, Seite 147-53.

- Schiller, P. H. (1992): The ON and OFF channels of the visual system, *Trends Neurosci* 15 [3], Seite 86-92.
- Schöneberg, T.; Schulz, A. und Gudermann, T. (2002): The structural basis of G-protein-coupled receptor function and dysfunction in human diseases, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 144, Seite 143-227.
- Siebert, F. (1995): Application of FTIR spectroscopy to the investigation of dark structures and photoreactions of visual pigments, *Israel Journal of Chemistry* 35, Seite 309-323.
- Siebert, F. ; Mäntele, W. und Gerwert, K. (1983): Fourier-transform infrared spectroscopy applied to rhodopsin. The problem of the protonation state of the retinylidene Schiff base re- investigated, *European Journal of Biochemistry* 136 [1], Seite 119-127.
- Smith, R. G.; Freed, M. A. und Sterling, P. (1986): Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network, *J Neurosci* 6 [12], Seite 3505-17.
- Sondek, J. ; Bohm, A. ; Lambright, D. G. ; Hamm, H. E. und Sigler, P. B. (1996): Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1Å resolution [see comments] [corrected] [published erratum appears in *Nature* 1996 Feb 29;379(6568):847], *Nature* 379 [6563], Seite 369-374.
- Sondek, J. ; Lambright, D. G. ; Noel, J. P. ; Hamm, H. E. und Sigler, P. B. (1994): GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4 [see comments], *Nature* 372 [6503], Seite 276-279.
- Spooner, P. J.; Sharples, J. M.; Goodall, S. C.; Bovee-Geurts, P. H.; Verhoeven, M. A.; Lugtenburg, J.; Pistorius, A. M.; Degrip, W. J. und Watts, A. (2004): The ring of the rhodopsin chromophore in a hydrophobic activation switch within the binding pocket, *J Mol Biol* 343 [3], Seite 719-30.
- Spooner, P. J.; Sharples, J. M.; Goodall, S. C.; Seedorf, H.; Verhoeven, M. A.; Lugtenburg, J.; Bovee-Geurts, P. H.; DeGrip, W. J. und Watts, A. (2003): Conformational Similarities in the beta-Ionone Ring Region of the Rhodopsin Chromophore in Its Ground State and after Photoactivation to the Metarhodopsin-I Intermediate, *Biochemistry* 42 [46], Seite 13371-13378.
- Struthers, M. ; Yu, H. und Oprian, D. D. (2000): G protein-coupled receptor activation: analysis of a highly constrained, "straitjacketed" rhodopsin, *Biochemistry* 39 [27], Seite 7938-7942.
- Takemoto, D. J. ; Morrison, D. ; Davis, L. C. und Takemoto, L. J. (1986): C-terminal peptides of rhodopsin. Determination of the optimum sequence for recognition of retinal transducin, *Biochemical Journal* 235 [1], Seite 309-312.
- Teller, D. C. ; Okada, T. ; Behnke, C. A. ; Palczewski, K. und Stenkamp, R. E. (2001): Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of g-protein-coupled receptors (GPCRs), *Biochemistry* 40 [26], Seite 7761-7772.
- Vogel, R. ; Fan, G. B. ; Sheves, M. und Siebert, F. (2000): The molecular origin of the inhibition of transducin activation in rhodopsin lacking the 9-methyl group of the retinal chromophore: a UV-Vis and FTIR spectroscopic study, *Biochemistry* 39 [30], Seite 8895-8908.
- Vogel, R. ; Fan, G. B. ; Sheves, M. und Siebert, F. (2001): Salt dependence of the formation and stability of the signaling state in G protein-coupled receptors: evidence for the involvement of the Hofmeister effect, *Biochemistry* 40 [2], Seite 483-493.
- Vogel, R. ; Fan, G. B. ; Siebert, F. und Sheves, M. (2001): Anions stabilize a metarhodopsin II-like photoproduct with a protonated Schiff base, *Biochemistry* 40 [44], Seite 13342-13352.
- Vogel, R.; Ludeke, S.; Radu, I.; Siebert, F. und Sheves, M. (2004): Photoreactions of Metarhodopsin III, *Biochemistry* 43 [31], Seite 10255-10264.

- Wall, M. A. ; Coleman, D. E. ; Lee, E. ; Iniguez Lluhi, J. A. ; Posner, B. A. ; Gilman, A. G. und Sprang, S. R. (1995): The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2, *Cell* 83 [6], Seite 1047-1058.
- Watson, S. und Arkininstall, S. (1994): *The G-protein linked receptor FactsBook.*, Academic Press.
- Wedegaertner, P. B.; Wilson, P. T. und Bourne, H. R. (1995): Lipid modifications of trimeric G proteins, *J Biol Chem* 270 [2], Seite 503-6.
- Weiss, E. R. ; Osawa, S. ; Shi, W. und Dickerson, C. D. (1994): Effects of carboxyl-terminal truncation on the stability and G protein-coupling activity of bovine rhodopsin, *Biochemistry* 33 [24], Seite 7587-7593.
- Wess, J. (1997): G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition, *FASEB Journal* 11 [5], Seite 346-54.
- Wess, J. ; Nanavati, S. ; Vogel, Z. und Maggio, R. (1993): Functional role of proline and tryptophan residues highly conserved among G protein-coupled receptors studied by mutational analysis of the m3 muscarinic receptor, *EMBO Journal* 12 [1], Seite 331-338.
- Wessel, R.; Schweizer, J. und Stahl, H. (1992): Simian virus 40 T-antigen DNA helicase is a hexamer which forms a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication, *J Virol* 66 [2], Seite 804-15.
- Wessling Resnick, M. und Johnson, G. L. (1987): Transducin interactions with rhodopsin. Evidence for positive cooperative behavior, *Journal of Biological Chemistry* 262 [26], Seite 12444-12447.
- Wilden, U. ; Hall, S. W. und Kühn, H. (1986): Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 [5], Seite 1174-1178.
- Yan, Elsa C. Y.; Kazmi, Manija A.; Ganim, Ziad; Hou, Jian-Min; Pan, Douhai; Chang, Belinda S. W.; Sakmar, Thomas P. und Mathies, Richard A. (2003): Retinal counterion switch in the photoactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin, *PNAS* 100 [16], Seite 9262-9267.
- Yan, M; Manor, D; Weng, G; Chao, H; Rothberg, L; Jedju, TM; Alfano, RR und Callender, RH (1991): Ultrafast Spectroscopy of the Visual Pigment Rhodopsin, *PNAS* 88 [21], Seite 9809-9812.
- Yu, H.; Kono, M. und Oprian, D. D. (1999): State-dependent disulfide cross-linking in rhodopsin, *Biochemistry* 38 [37], Seite 12028-32.
- Zhukovsky, E. A. ; Robinson, P. R. und Oprian, D. D. (1991): Transducin activation by rhodopsin without a covalent bond to the 11-cis-retinal chromophore, *Science* 251 [4993], Seite 558-560.
- Zhukovsky, E. A. ; Robinson, P. R. und Oprian, D. D. (1992): Changing the location of the Schiff base counterion in rhodopsin, *Biochemistry* 31 [42], Seite 10400-10405.
- Zimmermann, K.; Ritter, E.; Bartl, F. J.; Hofmann, K. P. und Heck, M. (2004): Interaction with transducin depletes metarhodopsin III: A regulated retinal storage in visual signal transduction?, *J. Biol. Chem.* 279, Seite 48112-9.

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Peter Hofmann am Institut für Medizinische Physik und Biophysik (IMPB) der Charité, Berlin, durchgeführt. Für die Themenstellung, und die Arbeitsmöglichkeiten am IMPB möchte ich Prof. Hofmann vielmals danken. Seine enorme nicht nur wissenschaftliche Kompetenz, viele fruchtbare Diskussionen und Anregungen waren eine große Unterstützung und Motivation für das Gelingen der Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Oliver Ernst, der mit seinen umfassenden Kenntnissen, seiner Hilfsbereitschaft und seinem beachtlichen Ideenreichtum wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ihnen beiden und allen anderen Mitgliedern des Instituts danke ich für die freundliche und kooperative Arbeitsatmosphäre, insbesondere Kerstin Zimmermann, Eglof Ritter sowie Verena Gramse.

Herrn Eglof Ritter gilt zudem mein besonderer Dank für die FTIR-spektroskopische Untersuchung meiner Pigmente.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Christine Koch, Frau Romana Hauer, Frau Helena Seibel, Frau Ingrid Semjonow und Frau Jana Engelmann für die tatkräftige Unterstützung sowie die angenehme Atmosphäre im Labor bedanken.

Ich danke auch Dr. Martin Heck, Dr. Alexander Pulvermüller, PD Dr. Franz Bartl, PD Dr. Dieter Maretzki und PD. Dr. Wolfgang Meier dafür, dass sie jederzeit bereitwillig ihr Wissen mit mir teilten.

Auch Herrn Thomas Penzok, Herrn Andreas von Garnier und Dr. Sigurd Magnus möchte ich für die Hilfe bei technischen Problemen danken.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Renate Raddatz, Frau Martina Wittling und Frau Margit Neumann für die wertvolle Hilfe in organisatorischen Angelegenheiten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Zara, meiner Mutter und all meinen Freunden für die moralische Unterstützung beim Anfertigen der Arbeit bedanken.



## LEBENS LAUF

Name : Olaf Fritze

Geburtsdatum : 13.10.1970

Geburtsort : Pasewalk

Familienstand : ledig

Kinder : Marie Anastasia, geb. am 29.1.2004 und  
Greta Louise, geb. am 17.2.2006

Schule : 1977-1987      Albert-Einstein-Schule      Polytechnische Ober-  
in Torgelow      schule

Beruf und Abitur : 1987-1990      BBS Wilhelm Pieck      Berufsausbildung zum  
in Jürgenstorf      Facharbeiter für Tier-  
produktion mit Abitur

Wehrdienst : 09/90-08/91      in Basepohl

Hochschule : 10/91-08/99      Technische Universität      Fach: Biotechnologie  
Berlin      Abschluss: Diplom

Diplomarbeit an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité Berlin

Thema: „Entwicklung eines *in-vitro* Modells der Lyme-Arthritis: Etablierung dreidimensionaler Gewebekulturen zur Untersuchung der Interaktion von *Borrelia burgdorferi* und humanen Synoviozyten“

Berufspraxis : 01/99-12/99      Cell-Lining Gesellschaft      Wiss. Mitarbeiter  
für Zellkultivierung mbH

02/00-04/00      Charité Berlin,      Wiss. Mitarbeiter  
Rheumatologie

Promotion : seit 01.07.00 am Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité –  
Universitätsmedizin Berlin, unter Betreuung von Prof. Dr. Klaus-Peter Hofmann  
von 07/00-05/03 gefördert durch das Graduiertenkolleg „Dynamik und  
Evolution zellulärer und makromolekularer Prozesse“

Thema: Der Aktivierungsmechanismus von Rhodopsin – Untersuchungen zur  
Rolle der siebenten und achten Helix sowie des  $\beta$ -Ionon-Rings





Ich erkläre, dass ich diese Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind.

Berlin, 22. März 2006