

Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden durch den retinalen Photorezeptor Opsin

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur für medizinische Biotechnologie

Ronny Piechnick

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

– Dr.-Ing. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Roland Lauster

Gutachter: Prof. Dr. Peter Neubauer

Prof. Dr. Jens Kurreck

Prof. Dr. Klaus Peter Hofmann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14. September 2012

Berlin 2012

D 83

Die vorliegende Dissertation wurde in der Charité Universitätsmedizin Berlin, im Institut für medizinische Physik und Biophysik (IMPB), im Fachbereich Funktionsmodule der Signaltransduktion unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Peter Hofmann und unter der Betreuung von Dr. Martin Heck durchgeführt und angefertigt.

Die Betreuung seitens der Technischen Universität Berlin erfolgte durch die Fakultät III-Prozesswissenschaften, im Fachbereich Bioverfahrenstechnik des Instituts für Biotechnologie durch Prof. Dr. Peter Neubauer.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Peter Neubauer, der meine Arbeit seitens der Technischen Universität Berlin betreut hat und in den Vorgesprächen wertvolle Tipps zur Strukturierung der Promotionsphase sowie zur Anfertigung der Dissertationsschrift gegeben hat.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Klaus Peter Hofmann, der mir durch die Übertragung des Forschungsthemas die Möglichkeit bot am Institut für medizinische Physik und Biophysik der Charité meine Promotion durchführen zu können. Des Weiteren danke ich ihm für die Hilfe bei der globalen Interpretation meiner Daten. Durch sein umfassendes Wissen im Bereich der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnte er mir helfen die Ergebnisse dieser Arbeit um einiges besser zu verstehen.

Mein größtes Dankeschön geht an Dr. Martin Heck, der stets bereit war mit mir meine Ergebnisse zu diskutieren und mir immer neue Anregungen für neue Experimente gab um diese Dissertation zum Erfolg zu bringen. Ich danke ihm auch dafür, dass er sich immer die Zeit nahm um mir neue Sachverhalte darzustellen und zu erklären. Ich konnte während meiner Promotionsphase viel von ihm lernen. Durch seine stetige Unterstützung hat er sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein Dankeschön geht auch an Dr. Martha Sommer, die mich durch ihre Bereitschaft zur Diskussion auf neue Ideen gebracht hat und mir mit ihren Anregungen sehr weiterhelfen konnte.

Für die wissenschaftliche Kommunikation danke ich vor allem Dr. Peter Hildebrand, Patrick Scheerer, Bilal Qureshi, Eglof Ritter, Matthias Elgeti, Alexander Rose und Florent Beyriere.

Für die Unterstützung im Labor und die tatkräftige Hilfe bei der Herstellung der Rhodopsinmutanten bedanke ich mich sehr bei Anja Koch, Brian Bauer und Jana Engelmann, ohne deren starke Einsatzbereitschaft wäre ein derartiges Ausmaß an durchgeführten Experimenten nicht möglich gewesen. Des Weiteren danke ich Frau Ingrid Semjonow für die Präparation der nativen Proben und Birgit Schroeer für die intensive Unterstützung bei der Organisation zahlreicher Aufgaben. Ein weiteres Dankeschön geht an Frau Gabriele Chusainow, die sich immer mit voller Hilfsbereitschaft meinen Anliegen gewidmet hat.

Irene Meister danke ich ganz besonders für die aufopferungsvolle Hilfe bei der Korrektur meiner Dissertationsschrift und die guten Anregungen, die diese Arbeit verbessert haben.

Mein allergrößtes Dankeschön geht an meine Familie und Freundin Alexandra, die mir immer eine moralische Unterstützung während der Promotionsphase und bei der Verfassung der Dissertationsschrift waren. Ohne ihre liebevolle Hingabe und die ständige Bereitschaft sich meine Probleme anzuhören, wäre diese Dissertation um einiges schwerer gewesen.

Darüber hinaus danke ich allen, die mir auf vielfältige Weise während der Promotionsphase geholfen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Name: **Ronny Piechnick**

Matrikelnummer: **201507**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit, bis auf die offizielle Betreuung, selbstständig und ohne fremde Hilfe durch mich angefertigt wurde und benutzte Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben sind.

Berlin, September 2012

Ronny Piechnick

Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind die größte Gruppe der Zelloberflächenrezeptoren in Vertebraten. Rhodopsin ist der am besten untersuchte GPCR und diente lange als Vorlage für das Verständnis anderer GPCRs. Rhodopsin besteht aus dem Apoprotein Opsin und dem inversen Agonisten 11-*cis*-Retinal, der über eine Schiff'sche Base kovalent mit der Lys296-Seitenkette des Opsins verknüpft ist. Die lichtinduzierte Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zum Agonisten all-*trans*-Retinal führt zur Aktivierung des Rhodopsins. Nach der Entstehung der aktiven Konformation (Meta II) wird die Schiff'sche Base zwischen all-*trans*-Retinal und Opsin hydrolysiert und all-*trans*-Retinal verlässt das Protein. Anschließend kann 11-*cis*-Retinal aufgenommen werden, wodurch sich wiederum Rhodopsin bildet. Um die zugrunde liegenden Mechanismen der Rhodopsinregeneration und des Meta II-Zerfalls besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Interaktion von Opsin mit seinen Retinalliganden untersucht.

Ein Teil dieser Arbeit beschreibt die Aufnahme und Abgabe des Retinals durch Opsin. Die Kristallstrukturen des Meta II und aktiven Opsins ließen zwei Öffnungen eines mutmaßlichen Ligandenkanals erkennen, der die Retinalbindungstasche mit der hydrophoben Membranumgebung verbindet. Die Existenz dieses Kanals und die Rolle der zwei Öffnungen bei der Aufnahme und Abgabe des Retinals wurden durch die ortsgerichtete Mutagenese experimentell überprüft. Die Ergebnisse zusammengenommen zeigten, dass die Mutationen nicht lokal auf die Kanaldurchlässigkeit wirken, sondern weitreichende Effekte auf die Struktur des gesamten Rezeptors haben. In dieser Arbeit wurde ein Modell für die Rezeptor-Retinal-Interaktion entwickelt, in dem die aktive Rezeptorkonformation (Opsin*) für das Öffnen des Retinalkanals notwendig ist. Darüber hinaus kann gesagt werden, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung des Rhodopsins oder beim Zerfall des Meta II die richtige Positionierung des Liganden innerhalb der Bindungstasche am Lys296 ist.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschreibt die Rolle des Opsin* bei der Retinalaufnahme. Die Bindung des C-terminalen Endes des G_iα-Proteins führt zur Verschiebung des Opsin/Opsin*-Gleichgewichts und stabilisiert Opsin*. Die Untersuchungen zeigten, dass die Opsin*-Konformation all-*trans*-Retinal reversibel aufnehmen und es über eine Schiff'sche Base kovalent an Lys296 binden kann. Basierend auf diesen Untersuchungen kann Opsin auch als ein Rezeptor für diffusionsfähige Liganden aufgefasst werden.

Ein letzter Teil dieser Arbeit beschreibt die Untersuchung der Hydrolyse der Schiff'schen Base durch die Verwendung von Hydroxylamin (HA) und seinen Derivaten. Die Ergebnisse zeigten, dass HA den Zerfall der lichtaktivierten Metarhodopsinspezies beschleunigte, während größere Derivate keinen signifikanten Einfluss hatten. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass ein Wasserkanal existiert, der sich nach der Lichtaktivierung des Rhodopsins öffnet und extrem stringent in Bezug auf die Größe und Polarität der einströmenden Substanzen ist.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass die aktive Konformation des Rezeptors eine zentrale Rolle bei der Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden spielt. Während die Hydrolyse und Abgabe des *all-trans*-Retinals durch die aktive Rezeptorkonformation induziert wird, folgt die Aufnahme des *11-cis*- und *all-trans*-Retinals verschiedenen Mechanismen. Diese Arbeit gibt Aufschluss über die komplexen kinetischen und strukturellen Mechanismen, die den Aufnahme- und Abgabeprozess des Retinalliganden steuern.

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) are one of the largest groups of cell surface receptors in vertebrates. Rhodopsin is the best investigated GPCR and has long stood as a model for understanding other GPCRs. Rhodopsin consists of the apoprotein opsin and the inverse agonist 11-*cis*-retinal, which is Schiff base-linked to residue Lys296. Light-induced isomerisation of 11-*cis*-retinal to the agonist all-*trans*-retinal leads to activation of rhodopsin. After formation of the active conformation (Meta II), the retinylidene Schiff base is hydrolysed and all-*trans*-retinal is released from opsin. 11-*cis*-retinal is then taken up, which reforms rhodopsin. In this thesis the interaction of opsin with its retinal ligands was investigated to better understand the underlying mechanisms of rhodopsin regeneration and Meta II decay.

A first part of this thesis explores the uptake and release of retinal from opsin. The crystal structures of Meta II and active opsin revealed two openings of a presumable ligand channel which connects the retinal binding pocket with the hydrophobic membrane environment. The existence of this ligand channel and the role of the openings in the uptake and release of retinal were experimentally tested by site-directed mutagenesis. Overall the results showed that the mutations did not have local effects on channel permeability, but rather had long ranging effects on the entire receptor structure. This study developed a model of receptor-ligand interactions, in which the active receptor conformation (Opsin*) is necessary for the retinal channel to be open. Furthermore, the rate limiting step for either the formation of rhodopsin or Meta II decay is the correct positioning of ligand within the binding pocket relative to Lys296.

In a second presented part of this thesis, the role of Opsin* in retinal uptake was further explored. Binding of the c-terminal end of G_tα protein was found to stabilize Opsin* relative to inactive opsin. Opsin* was observed to take up all-*trans*-retinal and form a retinylidene Schiff base with Lys296. Based on these observations, opsin can be understood as a receptor for diffusible ligands.

In a final presented part of this thesis, retinal Schiff base hydrolysis was investigated using hydroxylamine (HA) and its alkylated derivatives. Briefly, HA accelerated the decay of light-activated metarhodopsin species, while the larger derivatives had little influence. The results imply the existence of a water channel, which is opened in light-activated rhodopsin and is extremely stringent with regard to size and polarity of inflowing substances.

In summary, these results demonstrate that the active conformation of the receptor plays a central role in the uptake and release of retinal. While the hydrolysis

and release of all-*trans*-retinal is induced by the active receptor conformation, the uptake of 11-*cis*- and all-*trans*-retinal follows different mechanisms. The work presented in this thesis sheds light on the complex kinetic and structural mechanisms governing the uptake and release process of the retinal ligand.

Liste der Publikationen

Hildebrand P.W., Scheerer P., Park J.H., Choe H.W., Piechnick R., Ernst O.P., . . .
Heck M. (2009) A ligand channel through the G protein coupled receptor opsin. *PLoS One* 4, e4382.

Piechnick R., Heck M. und Sommer M.E. (2011) Alkylated hydroxylamine derivatives eliminate peripheral retinylidene Schiff bases but cannot enter the retinal binding pocket of light-activated rhodopsin. *Biochemistry* 50, 7168-7176.

Piechnick R., Ritter E., Hildebrand P.W., Ernst O.E., Scheerer P., Hofmann K.P. and Heck M. (2012) Effect of channel mutations on uptake and release of the retinal ligand in opsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, published ahead of print March 19, 2012, doi:10.1073/pnas.1117268109.

Liste der Posterpräsentationen

Hildebrand P.W., Scheerer P., Park J.H., Choe H.W., Piechnick R., Ernst O.P., Hofmann K.P. and Heck M. A ligand channel through the G protein coupled receptor opsin. *German Biophysical Society Meeting (2008) September 28 – October 1, Berlin.*

Hildebrand P.W., Scheerer P., Park J.H., Choe H.W., Piechnick R., Ernst O.P., Hofmann K.P. and Heck M. A ligand channel through the G protein coupled receptor opsin. *Membranes and Modules – International Symposium of Sonderforschungsbereiche 449 and 740 (2009) December 10 – 13, Berlin.*

Piechnick R., Hildebrand P.W., Scheerer P., Ernst O.P., Hofmann K.P. and Heck M. A ligand channel through the G protein coupled receptor opsin. *Keystone Symposia – G Protein-Coupled Receptors (2010) April 7 – 12, Breckenridge, Colorado, USA.*

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	5
Eidesstattliche Erklärung	7
Zusammenfassung	9
Abstract	11
Liste der Publikationen	13
Liste der Posterpräsentationen	13
Inhaltsverzeichnis	14
1 EINLEITUNG	19
1.1 Rhodopsin als G-Protein-gekoppelter Rezeptor	19
1.2 Die vertebrale Photorezeptorzelle	21
1.2.1 Aufbau der Netzhaut (Retina)	21
1.2.2 Aufbau und Funktion der Photorezeptorzelle	22
1.2.3 Aufbau der Schnittstelle zwischen Photorezeptor und Retinalpigmentepithelium	24
1.3 Funktionelle Module der vertebrale Photorezeptorzelle	25
1.3.1 Lichtinduzierte Signaltransduktion	26
1.3.2 Lichtinduzierte Translokation von Signalproteinen	28
1.3.3 Regeneration des 11- <i>cis</i> -Retinals durch den Retinoidzyklus	29
1.4 Interaktion des Rhodopsins mit seinem Retinalliganden	31
1.4.1 Strukturelle Eigenschaften des Rhodopsins, seines Meta II-Zustands und des Opsins	31
1.4.2 Lichtsensitiver Retinalligand	36
1.4.3 Induzierung der aktiven Konformation des Rhodopsins durch Photoisomerisierung des Retinalliganden	39
1.4.4 Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden durch Opsin und Metarhodopsin II	41
1.4.4.1 Zerfall des Metarhodopsin II – Hydrolyse der Schiff'schen Base und Dissoziation des all- <i>trans</i> -Retinals	41
1.4.4.2 Regeneration des Rhodopsins – Aufnahme des 11- <i>cis</i> -Retinals und Bildung der Schiff'schen Base	42
1.4.4.3 Strukturelle Eigenschaften des Rezeptors, die die Funktion der Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden erklären könnten	43
1.4.4.4 Wechselwirkungen des Opsins mit dem G _t -Protein bei der Aufnahme und Abgabe des Agonisten all- <i>trans</i> -Retinal	45
1.5 Ziel der Arbeit	47

2 MATERIALIEN UND METHODEN	51
2.1 Materialien	51
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	51
2.1.2 COS-1 Zellen	51
2.1.3 pMT4-Plamid	51
2.1.4 Oligonukleotide	52
2.1.5 Retinoide	52
2.2 Methoden zur Probengewinnung	53
2.2.1 Mutagenese des Opsingens, Expression der Opsinmutanten und Präparation der Rhodopsin- und Opsinmutanten	53
2.2.1.1 Basenaustausch mittels Polymerase-Kettenreaktion	53
2.2.1.2 DpnI-Restriktionsverdau	54
2.2.1.3 Transformation der kompetenten XL1- <i>Blue-E. coli</i> -Bakterien	55
2.2.1.4 Kultivierung der <i>E. coli</i> -Bakterien	55
2.2.1.5 Plasmid-Aufreinigung	55
2.2.1.6 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	55
2.2.1.7 Dephosphorylierung der verdauten Plasmid-DNA	56
2.2.1.8 Isolierung und Reinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen	56
2.2.1.9 Ligation des kompletten Opsingens oder Teile dessen in den pMT4-Vektor	56
2.2.1.10 Kultivierung der COS-1 Zellen	57
2.2.1.11 Transfektion der COS-1 Zellen	57
2.2.1.12 Ernte der transfizierten COS-1 Zellen	57
2.2.1.13 Rekonstitution von COS-1 Zellen (Nur für die Rhodopsinproben)	58
2.2.1.14 Herstellung des 1D4-Immuno-Affinitätsgels	58
2.2.1.15 Aufreinigung des Pigments	59
2.2.1.16 Klonierungsstrategie	60
2.2.2 Gewinnung der Proben aus den Stäbchenzellen boviner Retinae	61
2.2.2.1 Präparation gereinigter Diskmembranen	61
2.2.2.2 Präparation des Apoproteins Opsin	62
2.2.2.3 Präparation des G-Proteins Transducin	62
2.2.3 Erzeugung von Metarhodopsin III	64
2.3 Allgemeine Detektionsmethoden	64
2.3.1 Konzentrationsbestimmung der DNA	64
2.3.2 DNA-Sequenzierung	65
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	65

2.4 Methoden zur funktionalen Charakterisierung von Opsin und Rhodopsin sowie deren Mutanten	65
2.4.1 Absorptionsspektroskopie	65
2.4.1.1 Regenerationsmessung mittels Absorptionsspektroskopie	66
2.4.2 Fluoreszenzspektroskopie	66
2.4.2.1 Meta II-Zerfallsmessung mittels Fluoreszenzspektroskopie	67
2.4.2.2 G _t -Proteinaktivierungsmessungen mittels Fluoreszenzspektroskopie	68
2.5 Datenanalyse	68
2.6 Geräte	71
3 ERGEBNISSE	73
3.1 Hydroxylamin und seine alkylierten Derivate als Mittel zur Charakterisierung biochemischer und struktureller Eigenschaften in Rhodopsin	73
3.1.1 Einfluss von Hydroxylamin und seiner alkylierten Derivate auf die peripheren Retinyliden-Schiff'schen Basen	74
3.1.2 Absorptionseigenschaften von Rhodopsin und Meta II in Anwesenheit der alkylierten Hydroxylaminderivate	75
3.1.3 Meta II-Zerfall in Anwesenheit der alkylierten Hydroxylamin-derivate	76
3.1.4 Meta III-Stabilität in Anwesenheit von <i>t</i> -BHA	78
3.2 Der Effekt der Kanalmutationen auf die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden durch das Opsinmolekül	80
3.2.1 Charakterisierung der Rhodopsinmutanten	81
3.2.2 Effekt der Mutationen auf die Aufnahme des 11- <i>cis</i> -Retinals in das Opsin und auf die Abgabe des all- <i>trans</i> -Retinals aus dem lichtaktivierten Rhodopsin	91
3.2.3 Effekt der K296G-Mutation auf die Aufnahme und Abgabe des Retinal-PrSB	98
3.3 Reversible Aufnahme des all-<i>trans</i>-Retinals durch aktives Opsin	102
4 DISKUSSION	111
4.1 Hydroxylamin und seine alkylierten Derivate als molekulares Werkzeug zur Untersuchung von Rhodopsin und seinen Metazuständen	111
4.1.1 Die Metarhodopsin-Spezies sind HA-sensitiv	112
4.1.2 Meta II und Meta III sind nicht <i>t</i> -BHA-sensitiv	113
4.1.3 Alkylierte Hydroxylaminderivate als molekulares Werkzeug zur Untersuchung der visuellen Signaltransduktion	114
4.2 Indizien für einen Wasserkanal im aktivierten Rhodopsin	116

4.3 Die Aufnahme und Abgabe des Retinals durch einen hypothetischen Ligandenkanal im aktivierten Rhodopsin	117
4.3.1 Effekte der Mutationen im Retinalligandenkanal auf die Struktur und Funktion des Rezeptors	117
4.3.2 Mutationen der Aminosäureseitenketten entlang des Retinalligandenkanals haben einen weitreichenden Einfluss auf die gesamte Funktion der Bindungstasche	119
4.3.3 Die Retinalpassage ist unidirektional	120
4.3.4 Die Aufnahme des inversen Agonisten 11- <i>cis</i> -Retinal benötigt die aktive Rezeptorkonformation	121
4.3.5 Die Abgabe des Agonisten all- <i>trans</i> -Retinal wird durch die Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base bestimmt	123
4.3.6 Ein hypothetischer Wasserkanal könnte mit dem Ligandenkanal funktionell gekoppelt sein	126
4.3.7 Detailliertes Schema der Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden	128
4.4 Aktiviertes Opsin als Rezeptor für diffusible Liganden	130
4.4.1 Das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem Opsin steuert die reversible Aufnahme des Agonisten all- <i>trans</i> -Retinal	131
4.4.2 Das kubisch-ternäre Komplexmodell beschreibt die reversible Aufnahme des Agonisten in Abhängigkeit vom Opsin*/Opsin-Gleichgewicht und vom CT α -Peptid	132
4.5 Die Aufnahme von 11-<i>cis</i>- und all-<i>trans</i>-Retinal könnte über zwei verschiedene Mechanismen verlaufen	134
4.6 Vergleich der Ligandenaufnahme und -abgabe des Rhodopsins mit anderen GPCRs	135
4.7 Abschließendes Fazit und Ausblick	138
5 ANHANG	143
Verzeichnis der Abkürzungen	143
Verzeichnis der Abbildungen	145
Literaturverzeichnis	148
Anlage	163
Oligonukleotide	163
G $_t$ -Proteinaktivierungsraten	166
Geschwindigkeiten der Retinalaufnahme und -abgabe	167

1 EINLEITUNG

1.1 Rhodopsin als G-Protein-gekoppelter Rezeptor

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCRs) bilden die größte Gruppe der Zelloberflächenrezeptoren in Säugetieren. Im humanen Genom kodieren näherungsweise 800 verschiedene Gene funktionale GPCRs, was mehr als 1 % des gesamten humanen Genoms ausmacht (Lander *et al.* 2001, Venter *et al.* 2001). Durch alternatives *Splicing* könnten schätzungsweise 1000 bis 2000 verschiedene Rezeptorproteine exprimiert werden. Diese evolutionäre Diversität ermöglichte es, dass GPCRs ein außergewöhnliches Aufgebot an extrazellulären Reizen (Neurotransmitter, Peptidhormone, Geruchsstoffe und Photonen) aufnehmen und weiterleiten können. Demnach spielen GPCRs unter anderem eine Rolle bei der Neurotransmission, Regulation der Hämodynamik und haben Einfluss auf das Wachstum, die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose von Zellen. Im Großen und Ganzen sehen, riechen und schmecken die Menschen die Welt durch die vielfältige Gruppe der GPCRs.

Als die Genomdaten von zahlreichen Spezies verfügbar waren, bestand die Möglichkeit, die Phylogenie der GPCRs detaillierter zu untersuchen. Die Analyse der chromosomalen Position und der Gensequenzen führte zur Klassifizierung der GPCRs in fünf Gruppen. Diese sogenannte GRAFS-Klassifizierung ordnet die humanen Rezeptoren in Glutamatrezeptoren, rhodopsinähnliche Rezeptoren, Adhäsionsrezeptoren, *Frizzled/Taste2*-Rezeptoren (Geschmacksrezeptoren) und Sekretinrezeptoren (Fredriksson *et al.* 2003, Perez 2003). Die GPCRs der Gruppe der rhodopsinähnlichen Rezeptoren besitzen als charakteristische Merkmale konservierte Bereiche in der Aminosäuresequenz (Motive), die funktionelle Wechselwirkungen miteinander eingehen. Die Gruppe der rhodopsinähnlichen GPCRs wurde in vier weitere Untergruppen (α , β , γ , δ) unterteilt. Zur α -Untergruppe gehören unter anderem die Opsinrezeptoren, die Prostaglandinrezeptoren und die Aminrezeptoren (z.B. β 2-adrenerger Rezeptor). Zur β -Untergruppe gehören alle Rezeptoren, die Peptide als Liganden binden, wie z.B. Neutensinrezeptoren. Die γ -Untergruppe beinhaltet unter anderen Chemokinrezeptoren und zur δ -Untergruppe gehören Glycoproteinrezeptoren und olfaktorische Rezeptoren (Fredriksson *et al.* 2003).

Die GPCRs bestehen aus sieben membrandurchspannenden α -Helices (Transmembranhelix 1-7, TM1 - TM7), welche durch drei intrazelluläre und

1 EINLEITUNG

extrazelluläre Peptidschleifen (Loops, IL1 - 3, EL1 - 3) miteinander verbunden sind. Der Transmembranbereich der GPCRs zeigt den höchsten Grad an Sequenzkonservierung auf, während die intrazellulären und extrazellulären Domänen erheblich in ihrer Größe und Komplexität variieren. Die extrazellulären Domänen und Transmembranregionen der Rezeptoren sind in die Ligandenbindung involviert, wohingegen die intrazellulären Domänen sehr wichtig für die Signaltransduktion und die Regulierung der Rezeptoraktivität sind. Die Röntgenstrukturkristallographie ermöglichte die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur einiger GPCRs, z.B. vom Rhodopsin und β 2-adrenergen Rezeptor, was die heptahelikale Struktur bestätigte und die Lage der konservierten funktionellen Motive innerhalb der Kristallstruktur darstellte (Palczewski *et al.* 2000, Rasmussen *et al.* 2007).

Im vereinfachten Modell der durch G-Protein vermittelten Signaltransduktion agieren die GPCRs als ligandenaktivierte Guanosin-Austauschfaktoren (*Guanosine Exchange Factor*, GEF) für das heterotrimere Guanosin-Bindungsprotein (G-Protein), welches das Signal intrazellulär durch die Aktivierung der Effektorenzyme oder durch Ionenkanäle überträgt. Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne oder im Transmembranbereich des GPCR induziert konformationelle Änderungen, welche die Bindung des heterotrimeren G-Proteins an die intrazelluläre Domäne ermöglichen. Der Rezeptor stimuliert die G-Proteinaktivierung durch die Katalyse des Austausches von GDP durch GTP in der α -Untereinheit. Die α -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert anschließend von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten regulieren die Aktivität von enzymatischen Effektoren, wie die Adenylatcyclase, Phospholipase C und Phosphodiesterase, welche wiederum dafür sorgen, dass die Konzentration von sogenannten *Second Messengers* geändert wird. Diese *Second Messengers* kontrollieren z.B. die Aktivität der Ionenkanäle in der Plasmamembran der Stäbchenzellen, welche dadurch die biologische Antwort in den Stäbchenzellen erzeugen.

Das Rhodopsin ist einer der wenigen GPCRs, die eine kovalente Verknüpfung ihres Liganden an das Apoprotein aufweisen. Durch die kovalente Bindung des 11-*cis*-Retinals wird Rhodopsin inaktiviert. Die lichtinduzierte Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zum all-*trans*-Retinal führt zu einer Konformationsänderung im Opsinmolekül und aktiviert den Rezeptor.

1.2 Die vertebrale Photorezeptorzelle

1.2.1 Aufbau der Netzhaut (Retina)

Die humane Retina ist eine neuronale Gewebeschicht, die ca. 0,4 mm dick ist. Die Retina kleidet die hintere Oberfläche der Innenseite des Auges aus und dehnt sich bis zur optischen Einheit (Kornea, Iris und Linse) des menschlichen Auges aus. Die Retina besitzt neben den fünf Neuronenklassen, d.h. Photorezeptorzellen, Bipolarzellen, Ganglienzellen, Horizontalzellen und Amakrinzellen, zwei Faserschichten, welche diese in drei deutlich getrennte Bereiche gliedert (Abb. 1.1a und b). Eine Retina besteht aus ungefähr 100 Millionen Photorezeptoren, 10 Millionen Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen sowie ungefähr 1,25 Millionen Ganglienzellen.

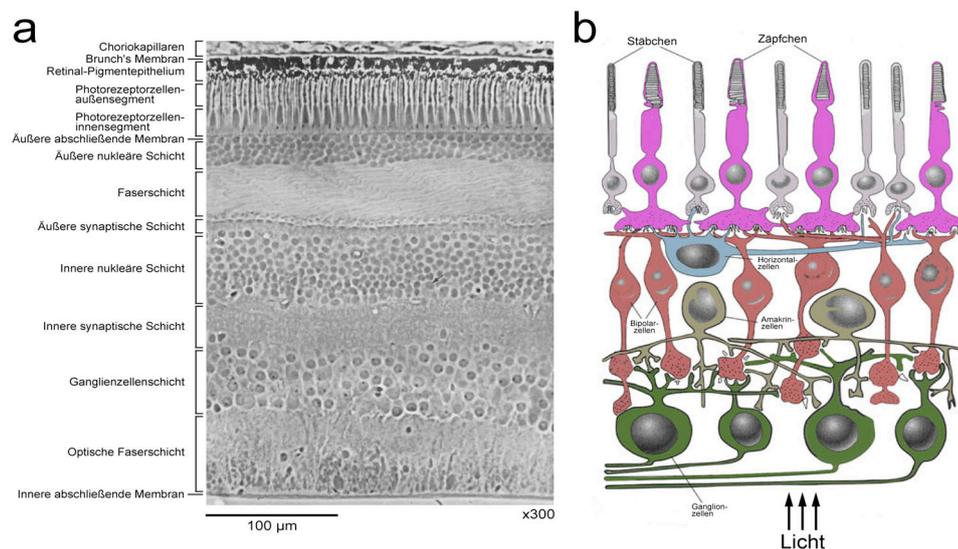


Abbildung 1.1: Anatomischer Aufbau der vertebrale Netzhaut. (a) Querschnitt durch die Retina eines Primaten (300-fache Vergrößerung, Boycott 1969). Das einfallende Licht betritt die Retina durch die innere abschließende Membran (unten) und muss alle Gewebeschichten der Retina durchqueren, um das in der Photorezeptorzelle lokalisierte Rhodopsin aktivieren zu können (oben). (b) Der Aufbau der neuronalen Schicht (Retina) lässt bei vereinfachter Darstellung die fünf Neuronenklassen (Photorezeptorzellen, Bipolarzellen, Ganglienzellen, Horizontalzellen und Amakrinzellen) sowie die Stäbchen- und Zapfenzellen erkennen. Das Licht aktiviert die Photorezeptorzelle, diese wandelt das Lichtsignal in ein neuronales Signal um und gibt dieses an die Bipolarzellen weiter. Diese wiederum leiten das Signal über die Ganglienzellen weiter ans Gehirn. Die Horizontalzellen und die Amakrinzellen sorgen für eine Verschaltung der einzelnen Neuronen und regulieren die Signalweiterleitung. Quelle der Abbildung (b): (www.skidmore.edu), leicht modifiziert.

Das neuronale Signal, welches nach der lichtinduzierten Aktivierung des Rhodopsins im Photorezeptor generiert wird, gelangt über die Bipolarzellen in der äußeren synaptischen Schicht zu den Ganglienzellen (Abb. 1.1b) und wird über den Sehnerv zum Gehirn weitergeleitet. Die Horizontalzellen verschalten die Photorezeptoren und Bipolarzellen lateral (Abb 1.1b). Sie haben eine *Feedback*-Wirkung auf die Photorezeptoren und können somit die Intensität des neuronalen

Signals beeinflussen. Die Amakrinzellen liegen in der inneren synaptischen Schicht der Netzhaut (Abb. 1.1a und b). Sie schaffen synaptische Kontakte zu Bipolarzellen und Ganglienzellen und regulieren die neuronale Signalweiterleitung zum Gehirn. Die Photorezeptoren befinden sich in der Retina am weitesten vom einstrahlenden Licht entfernt. Das Licht muss also die anderen Zellen der Retina und die Photorezeptorzellen bis zu deren äußerem Segment passieren, um das dort liegende Rhodopsin zu aktivieren. Diese vermeintlich „falsche“ Anatomie der Retina hat den Vorteil, dass das sehr aktive Photorezeptoraußensegment nahe dem Retinalpigmentepithelium (RPE) und den kapillaren Blutgefäßen liegt und somit ein effektiver Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet wird (Übersicht: Rodieck 1998). Des Weiteren reduziert diese Lage der Photorezeptorzellen in der Retina die Absorption von Streulicht, welches an anderen Stellen durch die Retina reflektiert werden kann und somit die Auflösung des betrachteten Bildes verringern könnte.

1.2.2 Aufbau und Funktion der Photorezeptorzelle

In vielen vertebraten Retinae existieren zwei Typen von Photorezeptorzellen. Diese werden nach ihrer Form des Außensegments mit Stäbchen- und Zapfenzellen bezeichnet (Abb. 1.1). Beide Arten bestehen aus einem Außensegment (in Stäbchenzellen: *Rod Outer Segment*, ROS), einem Innensegment (IS) und einer synaptischen Endregion (Abb. 1.2). Die Stäbchenzellen sind daran angepasst im Dämmerungslicht zu arbeiten, während die Zapfenzellen optimal unter Bedingungen operieren, die im Bereich der Lichtsättigung der Stäbchenzellen liegen. Die 100 Millionen Stäbchenzellen existieren in der humanen Retina nur in einer Ausführung, wobei es bei den insgesamt 3 - 5 Millionen Zapfenzellen drei verschiedene Typen gibt (Übersichten: Müller und Kaupp 1998, Rodieck 1998). Die Zapfenzellen befinden sich in der Retina mehrheitlich im Bereich des schärfsten Sehens (beim Menschen: *Fovea centralis*) und ermöglichen durch die drei verschiedenen Typen (L, M und S) das Farbsehen. Die Dichte der Stäbchenzellen dagegen ist im Bereich des schärfsten Sehens gleich null und erreicht ihr Maximum 5 - 7 mm um diesen Punkt herum. Die Stäbchenzellen besitzen die Fähigkeit, mit nur einem Photon die Signaltransduktion in Gang zu setzen und sind somit 300-mal sensitiver als die Zapfenzellen (Rodieck 1998).

Die synaptische Endregion gewährleistet die Kommunikation der Photorezeptorzellen mit nachgeschalteten Neuronen. Im Innensegment der Photorezeptorzellen befinden sich nahezu alle Komponenten, die für den

Metabolismus der Zellen notwendig sind (Zellkern, Mitochondrien, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum usw.). Das Außensegment der Photorezeptorzellen beinhaltet alle notwendigen Komponenten für die Umwandlung des Lichts in ein elektrochemisches Signal. Die Außensegmente beider Photorezeptortypen (Stäbchen- und Zapfenzellen) besitzen einen ähnlichen Mechanismus für die Umwandlung der Photonen in ein neuronales Signal. Das dafür verantwortliche Molekül ist das Rhodopsin, das in Stäbchenzellen in so genannten Diskmembranen organisiert ist und in Zapfenzellen in der eingestülpten Plasmamembran zu finden ist. Im Außensegment der humanen Stäbchenzelle stapeln sich bis zu 1000 Disks übereinander und nehmen in etwa die Hälfte des Volumens dieses Außensegments ein. Eine einzelne humane Diskmembran enthält ungefähr 50 000 Rhodopsinmoleküle, die jeweils ein Lichtphoton für ihre Aktivierung absorbieren können, was die hohe Leistungsfähigkeit und Sensitivität der Stäbchenzelle widerspiegelt (Abb. 1.2). Das Außensegment beider Photorezeptorzelltypen ist mit dem Innensegment durch das Zilium verbunden und ermöglicht dadurch den Transport von Molekülen, die im Innensegment synthetisiert werden.

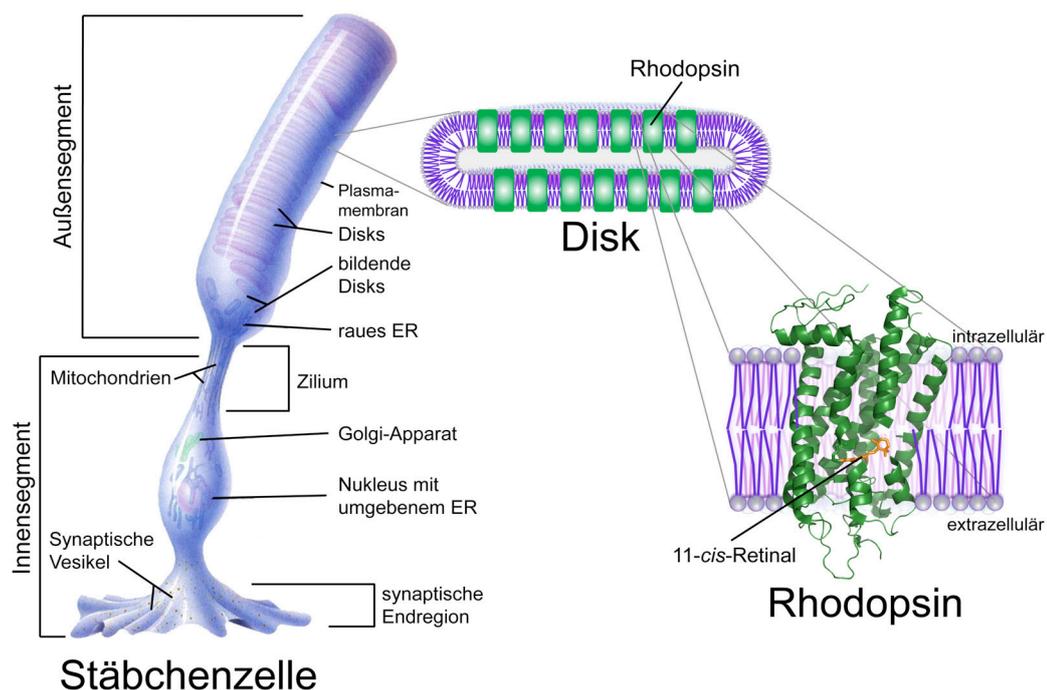


Abbildung 1.2: Aufbau einer vertebreten Stäbchenzelle. Diese besteht aus einer synaptischen Endregion, in der die Kontakte zu den nachgeschalteten Neuronen gewährleistet wird, einem Innensegment, in dem sich der Zellkern (Nukleus) und nahezu alle notwendigen Komponenten des Zellmetabolismus befinden, und einem durch das Zilium verbundenen Außensegment, in dem sich alle für die Umwandlung des Lichtsignals notwendigen Komponenten befinden. In den Membranen der bis zu 1000 Disks des humanen Stäbchenzellenaußensegments befinden sich bis zu 50 Millionen Moleküle des Sehpigments Rhodopsin. Diese Disks werden von der Plasmamembran des Außensegments umgeben. Jedes einzelne Rhodopsinmolekül besitzt einen lichtsensitiven Liganden (11-*cis*-Retinal), der kovalent mit dem Apoprotein verknüpft ist. Die Abbildung der Stäbchenzelle stammt von der Seite (www.vetmed.vt.edu) und wurde leicht modifiziert. ER, endoplasmatisches Retikulum.

Der Unterschied zwischen den Stäbchen- und Zapfenzellen bezieht sich neben der Form des Außensegments und dem *Cocktail* der Proteine auch auf den Proteinanteil des Rhodopsins (Opsin). Die unterschiedliche Aminosäuresequenz führt zu einer leicht veränderten Opsinstruktur (für Details siehe: Hargrave und McDowell 1992), was bei gleich bleibenden Liganden zu einer unterschiedlichen Sensitivität für die verschiedenen Bereiche des einstrahlenden sichtbaren Lichts führt.

1.2.3 Aufbau der Schnittstelle zwischen Photorezeptor und Retinalpigmentepithelium

Der anatomische Zusammenhang zwischen dem Photorezeptor und dem Retinalpigmentepithelium (RPE) ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die mikroskopische Darstellung einer Primatenretina (Abb. 1.3b, Boycott 1969) und die schematische Darstellung des Querschnitts dieser (Abb. 1.3c) zeigt das Retinalpigmentepithelium als eine einzelne Schicht an Endothelzellen (Abb. 1.3, RPE), das Stäbchenzellenaußensegment (OS) und die Interphotorezeptormatrix (IPM) als eine dünne extrazelluläre Lücke zwischen dem OS und dem RPE (Abb. 1.3, IPM).

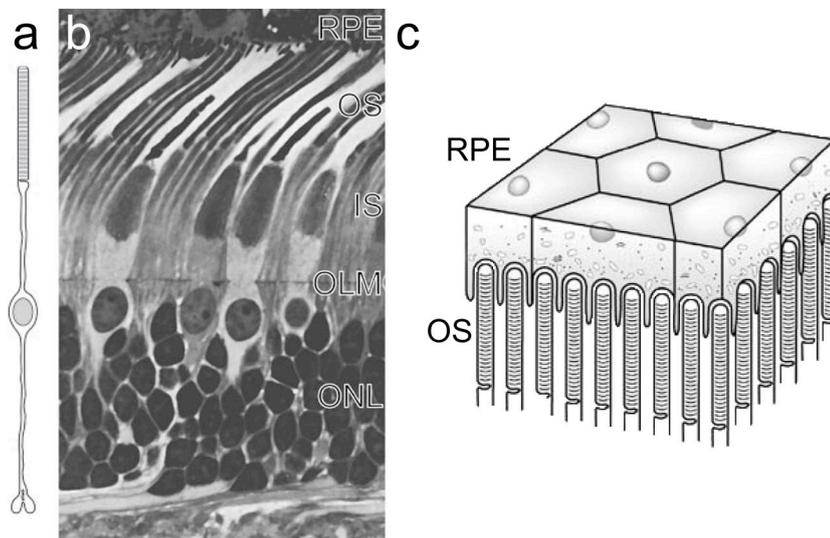


Abbildung 1.3: Anatomische Eigenschaften der äußeren Retina, des Retinalpigmentepitheliums und des Photorezeptors. (a) Schematische Darstellung eines Stäbchenzellenphotorezeptors von Säugetieren in Relation zu (b). (b) Lichtmikroskopische Darstellung der parafovealen Region einer Rhesusaffenchoroidea (Aderhaut), RPE und distalen Retina. (c) Schematischer Querschnitt durch das Retinalpigmentepithelium (RPE) und die Spitzen des Stäbchenzellenaußensegments (OS) (Übersicht: Lamb und Pugh 2004).

Das RPE ist eine Art Blut-Hirn-Schranke, in diesem Fall genauer gesagt eine Blut-Retina-Schranke. Das RPE besteht aus einer einzelnen Schicht von

Endothelzellen, die eine hexagonale Form besitzen und symmetrisch gepackt sind. In humanen Augen haben diese Endothelzellen eine Größe von 10 – 16 µm im Durchmesser und sind 7 – 8 µm dick (Garron 1963, Sakuragawa und Kuwabara 1976, Ts'o und Friedman 1968). Neben der Aufgabe die Retina vom kapillaren Blutsystem zu trennen und die Retinoide zu recyceln, hat das RPE mit dem aktiven Transport von zum Beispiel Vitamin A, der Phagozytose von alten, abgestoßenen Stäbchenaußensegmenten, der Absorption von Streulicht durch Melaningranulate, der Adhäsion der Retina an die darunter liegende Aderhaut (Choroidea) und der Aufrechterhaltung des Milieus der Interphotorezeptormatrix (IPM) weitere wichtige Funktionen (Lamb und Pugh 2004).

Als Interphotorezeptormatrix wird der extrazelluläre Raum zwischen dem Stäbchenzellenaußensegment und der apikalen Oberfläche des RPE's bezeichnet. Die IPM ist gefüllt mit extrazellulärem Matrixmaterial (z.B. Proteoglycane). Außerdem beinhaltet die IPM Proteine wie das interphotorezeptorretinoidbindende Protein (IRBP) sowie Enzyme wie Metalloproteinasen und Mucine (Lamb und Pugh 2004).

1.3 Funktionelle Module der vertebraten Photorezeptorzelle

Funktionelle Module sind per Definition ein molekulares Ensemble mit einer weitgehend autonomen Funktion in den Zellen von Organismen (Hofmann *et al.* 2006). Diese funktionellen Module schließen die Lücke zwischen den einzelnen Molekülen und den biologischen Systemen. Jedes Modul ist wiederum in funktionalen Ebenen (molekulare Funktion, modulare Subfunktion und modulare Funktion) organisiert. In den Photorezeptorzellen sind drei verschiedene Module bekannt: die Signaltransduktion, die Proteintranslokation und die Rezeptorregeneration (Retinoidzyklus). Der GPCR Rhodopsin spielt in allen drei funktionellen Modulen eine Schlüsselrolle und agiert in seiner aktiven Form als Schrittmacher, der den übergreifenden Takt kontrolliert. Die Struktur der Modularisierung des Retinoidzyklus beschreibt auf molekularer Ebene die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden durch den Rezeptor. Auf submodularer Ebene wird der Einfluss der Membrenumgebung, der Rezeptoroligomerisierung und der Interaktion mit Signalproteinen (z.B. Arrestin) auf den Retinalaustausch im Opsinmolekül beschrieben. Die modulare Ebene zeigt das Zusammenspiel aller Proteine des Retinoidzyklus auf.

1.3.1 Lichtinduzierte Signaltransduktion

Die visuelle Signaltransduktion beschreibt die Umwandlung eines einfallenden Lichtreizes (Photons) in ein bioelektrisches Signal in der Photorezeptorzelle. Diese Aktivierungskaskade kann in fünf Schritten zusammengefasst werden. Die ersten drei Schritte finden assoziiert an der Diskmembran und die letzten beiden Schritte im Cytoplasma und an der Plasmamembran statt (Abb. 1.4).

Der erste Schritt in der visuellen Phototransduktionskaskade ist die Aktivierung des Rhodopsins durch ein Photon (Abb. 1.4). Rhodopsin besteht aus dem Apoprotein Opsin und dem lichtsensitiven Liganden 11-*cis*-Retinal, der kovalent mit dem Apoprotein verknüpft ist. Die Absorption eines einzelnen Photons erzeugt im Retinalliganden die all-*trans*-Konfiguration, was wiederum zur aktiven Konformation des Rhodopsins (R^* oder Metarhodopsin II, Meta II) führt. Eine detaillierte Beschreibung der Aktivierung des Rezeptors ist in Abschnitt 1.4.3 zu finden. Meta II präsentiert cytoplasmatisch Bindungsstellen, mit denen das membranassoziierte heterotrimere G_t -Protein (Transducin) interagieren kann. Die katalytische Aktivierung des G_t -Proteins beschreibt den zweiten Schritt der Phototransduktionkaskade (Abb. 1.4). Das G_t -Protein besteht aus drei Untereinheiten ($G_{t\alpha}$, $G_{t\beta}$ und $G_{t\gamma}$), wobei die $G_{t\alpha}$ -Untereinheit die GDP/GTP-Bindungstasche besitzt und katalytisch durch Meta II aktiviert wird. Im inaktiven Zustand des G_t -Proteins ist GDP an der $G_{t\alpha}$ -Untereinheit gebunden, wodurch die drei Untereinheiten miteinander assoziiert sind. Meta II katalysiert den Austausch von GDP zu GTP im heterotrimeren G_t -Protein. Anschließend dissoziiert das aktivierte G_t -Protein vom Meta II und zerfällt in die $G_{t\alpha}$ - und $G_{t\beta\gamma}$ -Untereinheiten. Im dritten Schritt der Phototransduktionkaskade übermittelt die $G_{t\alpha}$ -Untereinheit das Signal an das nächste Element, die cGMP-spezifische Phosphodiesterase (PDE) (Abb. 1.4). Die PDE ist ein Enzym, das cGMP in biologisch inaktives 5'-GMP umwandelt. Im Dunkelzustand wird die PDE inhibiert. Diese Inhibierung wird durch Bindung der $G_{t\alpha}$ -Untereinheit an die PDE aufgehoben. Die um mehrere Größenordnungen erhöhte Aktivität des Enzyms sorgt im vierten Schritt der Phototransduktionkaskade für eine drastische Verringerung der cGMP-Konzentration im Außensegment (Abb. 1.4). Die Abnahme der cGMP-Konzentration im Cytosol bewirkt eine Schließung von cGMP-gesteuerten Ca^{2+} - und Na^+ -Kanälen, was den Einstrom von Ca^{2+} und Na^+ verhindert. Durch diesen fünften Schritt der Phototransduktionkaskade findet an der Plasmamembran des Außensegments eine Reduzierung der zirkulierenden elektrischen Spannung statt, die bis zur Synapse weitergeleitet wird (Abb. 1.4). Im synaptischen Spalt wird das Signal durch die

Reduzierung der Glutamatausschüttung an die Bipolarzellen weitergeleitet (Lamb und Pugh 2006, Nelson 2001, Rodieck 1998).

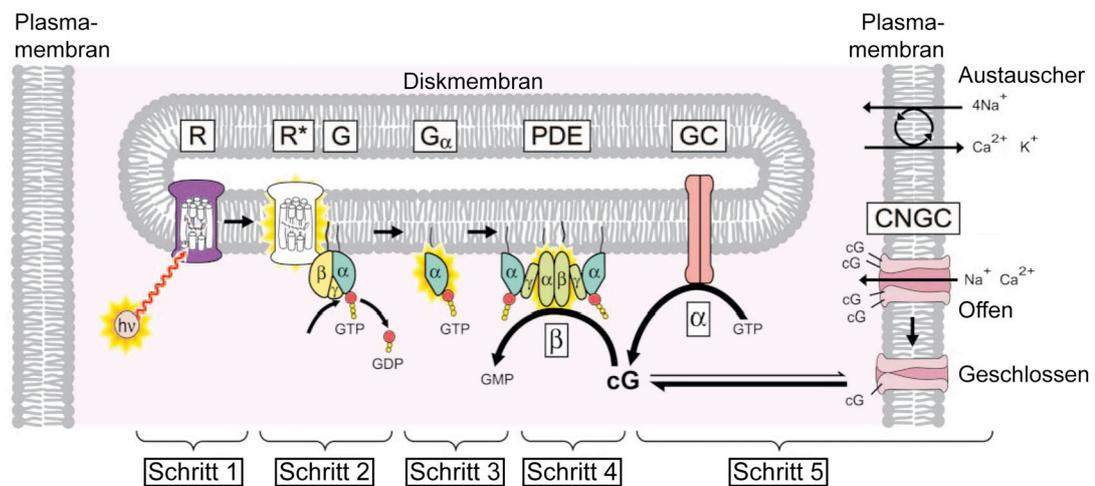


Abbildung 1.4: Die visuelle Phototransduktionskaskade. Nach der Absorption eines Photons ($h\nu$) kontaktiert das aktivierte Rhodopsin (R^*) wiederholt Moleküle des heterotrimeren G_t -Proteins (G), katalysiert den Austausch von GDP zu GTP und produziert dadurch die aktive Konformation des $G_t\alpha$ -GTP (G^*). Zwei G^* binden an die inhibitorischen γ -Untereinheiten der Phosphodiesterase (PDE), wodurch eine oder beide der korrespondierenden α - und β -Untereinheiten aktiviert werden und die Hydrolyse des zyklischen GMPs (cG) katalysieren. Die Abnahme der cytoplasmatischen Konzentration des cGMPs führt zur Schließung der cGMP-gesteuerten Ionenkanäle (CNGC, *Cyclic Nucleotide Gated Channel*) und dadurch zur Blockade des Na^+ - und Ca^{2+} -Einstroms, was wiederum zur Reduzierung der zirkulierenden elektrischen Spannung führt. Der $Na^+/Ca^{2+}, K^+$ -Austauscher ist nicht direkt in diesen Prozess involviert, er pumpt aber während der Lichtantwort Ca^{2+} aus der Photorezeptorzelle heraus, so dass die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration abnimmt, was wiederum die Guanylylcyclaseaktivität (GC) und andere Calcium-Feedback-Mechanismen stimuliert. Abbildung aus Lamb und Pugh 2006, leicht modifiziert.

Da eine permanente Aktivierung weiterer G_t -Proteinmoleküle durch Meta II erfolgt und eine Abschaltung des aktivierten Rezeptors durch die lichtinduzierte Reiseromerisierung von 11-*cis*-Retinal minimal ist, erfordert dies eine Inaktivierung des Rezeptors auf anderen Wegen bzw. eine Unterbrechung der Signaltransduktion. Die Terminierung des visuellen Signals erfolgt auf zwei Ebenen. Die erste Ebene erfolgt am Meta II. Da ein Molekül Meta II bei Raumtemperatur mehr als 400 G_t -Proteine pro Sekunde aktivieren kann (Heck und Hofmann 2001) und der Zerfall des Meta II unter physiologischen Bedingungen eine Halbwertszeit von *circa* zwei Minuten hat (Heck *et al.* 2003a), muss die Signalübertragung vom aktivierten Rhodopsin zum G_t -Protein unterbrochen werden. Dies wird durch die Bindung von Arrestin an das Meta II erreicht. Diese Bindung setzt aber die Phosphorylierung C-terminaler Serin- und Threoninreste voraus. Die Phosphorylierung wird durch die serin-/threoninspezifische Rhodopsinkinase (G-Protein-Rezeptorkinase, GRK1) katalysiert (Wilden *et al.* 1986). Nach dem Zerfall des Meta II in das Apoprotein Opsin und den

Liganden *all-trans*-Retinal erfolgt die Dephosphorylierung des Opsins durch die Proteinphosphatase 2A (Palczewski *et al.* 1989). Die zweite Ebene der Signalterminierung erfolgt über die intrinsische GTPase-Aktivität der $G_t\alpha$ -Untereinheit. Diese hydrolysiert das GTP zu GDP und erreicht damit die Dissoziation der $G_t\alpha$ -Untereinheit von der PDE. Dies wiederum führt zur Inhibition der PDE, wodurch die cGMP-Hydrolyse gehemmt wird. Der cGMP-Spiegel in der Photorezeptorzelle steigt wieder an, die Ionenkanäle öffnen sich, und die zirkulierende elektrische Spannung der Zelle erhöht sich. Eine endgültige Abschaltung des Signalfusses wird durch die Aufnahme des reisoomerisierten inversen Agonisten 11-*cis*-Retinal und die Bildung des lichtsensitiven Rhodopsins erreicht. Eine detaillierte Beschreibung dieser Reaktion ist in Abschnitt 1.4.4 zu finden.

1.3.2 Lichtinduzierte Translokation von Signalproteinen

Die Photorezeptorzellen können ihre Sensitivität auf umgebene Lichtintensitäten über verschiedene Mechanismen regulieren (Burns und Baylor 2001, Fain *et al.* 2001, Pugh *et al.* 1999). Die lichtinduzierte Translokation des cytoplasmatischen G_t -Proteins und Arrestins zwischen den subzellulären Kompartimenten der Photorezeptorzelle ist ein Regulationsmechanismus zur Steuerung der Signaltransduktion. In belichteten Stäbchenzellen bewegt sich das G_t -Protein vom Außensegment in das Innensegment und akkumuliert dort (Brann und Cohen 1987, Philp *et al.* 1987, Whelan und McGinnis 1988), wobei Arrestin in die entgegengesetzte Richtung wandert (Broekhuysse *et al.* 1985) (Abb. 1.5).

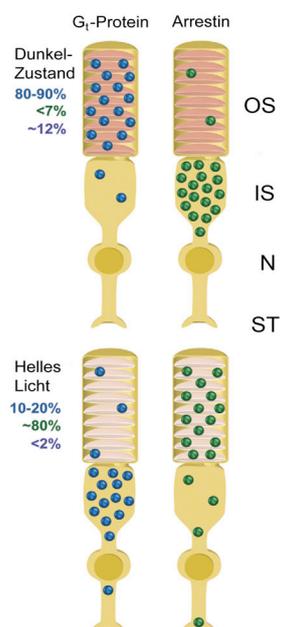


Abbildung 1.5: Lichtinduzierte Translokation von G_t -Protein und Arrestin im Dunkelzustand und unter Lichtbedingungen. Die Farben der Nummern auf der linken Seite entsprechen den Farben der wandernden Proteine. Die Nummern selbst geben den prozentualen Anteil der Proteine an, wie dieser im Stäbchenzellenaußensegment gefunden wurde (Sokolov *et al.* 2002, Strissel *et al.* 2005, Strissel *et al.* 2006). Die subzellulären Stäbchenzellkomponenten sind auf der rechten Seite entsprechend abgekürzt: OS, Außensegment; IS, Innensegment; N, Nukleus; ST, Synaptische Endregion. Abbildung aus Calvert *et al.* (2006), leicht modifiziert.

1.3.3 Regeneration des 11-*cis*-Retinals durch den Retinoidzyklus

Das Sehen wird durch die lichtinduzierte Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals im Opsinmolekül zu all-*trans*-Retinal initiiert. In einigen invertebraten Photorezeptoren (z.B. bei Insekten und *Cephalopoden*) erfolgt anschließend die Rekonversion von all-*trans*- zu 11-*cis*-Retinal durch Photoisomerisierung, wobei das Retinal kovalent am Opsinmolekül verknüpft bleibt (Hamdorf 1973, Stavenga 1996). Das aktivierte Rezeptormolekül in den Photorezeptoren der Vertebraten ist nicht in der Lage, Rhodopsin durch Lichtabsorption zurückzubilden (Bartl *et al.* 2001, Ritter *et al.* 2008, Ritter *et al.* 2004). In diesen Zellen wird die kovalente Verknüpfung zwischen all-*trans*-Retinal und Opsin nach der Aktivierung des Rezeptors hydrolysiert. Anschließend verlässt all-*trans*-Retinal das Molekül, um für ein neues 11-*cis*-Retinal in der Bindungstasche des Opsinmoleküls Platz zu machen.

Der Rezeptor wird erst dann vollständig abgeschaltet, wenn 11-*cis*-Retinal den inaktiven Rhodopsinzustand hergestellt hat. Aus diesem Grund ist eine enzymatische Reisomerisierung des Chromophors von all-*trans*- zu 11-*cis*-Retinal notwendig. Diese Aufgabe übernimmt der Retinoidzyklus. Dieser Zyklus wird als eine lange Serie an Reaktionen bezeichnet, die dafür sorgen, dass das all-*trans*- zu 11-*cis*-Retinal isomerisiert wird und ausreichend 11-*cis*-Retinal zur Regeneration von Rhodopsin zur Verfügung steht. Das vom Opsinmolekül hydrolysierte all-*trans*-Retinal wird zunächst durch eine Retinoldehydrogenase (RDH) zu all-*trans*-Retinol (Vitamin A) reduziert (Abb. 1.6). Ein weiteres Protein im retinalen Metabolismus, das nahe am Rand der Stäbchenzellendisk lokalisiert ist und dessen Aufgabe bis heute umstritten ist, ist der ABCR Transporter (Abb. 1.6). Dieser Transporter könnte als eine Phospholipid-Flippase agieren und dafür sorgen (Sun *et al.* 1999, Weng *et al.* 1999), dass die gebildeten N-Retinyli-den-Phosphatidylethanolamine in der Membran abgebaut werden. Dieser ABCR Transporter könnte somit der Bildung der A2-PE (N-Retinyli-den-N-Retinyli-denphosphatidylethanolamin) und A2-E (N-Retinyli-den-N-Retinyli-den-ethanolamin) vorbeugen, welche sich in der Membran ansammeln, weil diese nicht abgebaut werden können. A2-E und A2-PE sind mit ausschlaggebend für die Retinadegeneration (Sparrow *et al.* 2003). Der Transport des all-*trans*-Retinols durch das Cytoplasma und die Plasmamembran des Stäbchenzellenaußensegments erfolgt durch einen noch unbekanntem Prozess. Hat aber all-*trans*-Retinol die Plasmamembran erreicht, assistieren eine Reihe von Proteinen beim Übergang vom Außensegment über die IPM zum RPE. Eines der wichtigsten ist das IRBP (*Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein*), welches in hohen Mengen in den Photorezeptor/RPE-Schichten zu finden ist (Gonzalez-Fernandez 2002, Liou *et al.* 1991)

1 EINLEITUNG

(Abb. 1.6). Das IRBP hat vier Bindestellen für Retinoide, zwei davon binden ausschließlich all-*trans*-Retinol und die beiden anderen 11-*cis*-Retinal (Chen und Noy 1994).

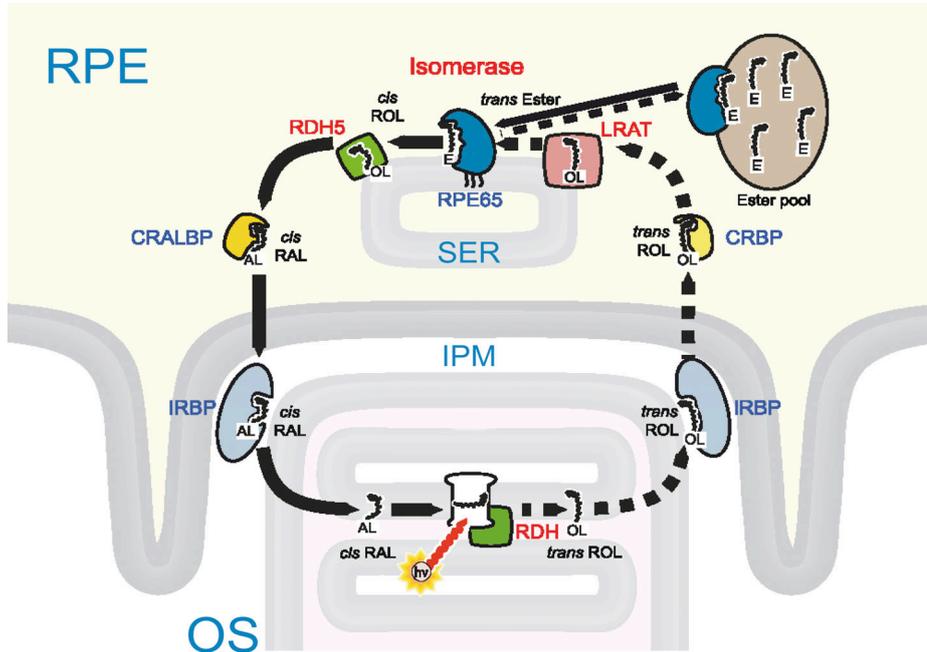


Abbildung 1.6: Retinoidzyklus – Lange Serie an Reaktionen zur Reisoomerisierung des 11-*cis*-Retinals. Vereinfachte Darstellung der Photorezeptor/Retinalpigmentepithelium-Schnittstelle mit der Lokalisation der Enzyme und Chaperone des Zyklus. Nach der lichtinduzierten ($h\nu$) Aktivierung des Rhodopsins (weiße hantelförmige Struktur) erfolgt der Zerfall des aktivierten Rezeptors zu Opsin und all-*trans*-Retinal. Letzteres wird durch die Retinoldehydrogenase (RDH) zu all-*trans*-Retinol reduziert und aus dem Stäbchenzellenaußensegment (OS) über Interphotorezeptormatrix (IPM) in das glatte Endothelretikulum (SER) des Retinalpigmentepitheliums (RPE) transportiert. Dort wird das all-*trans*-Retinoid durch das Enzym RPE65 zu 11-*cis*-Retinoid reisoomerisiert und als 11-*cis*-Retinylester gespeichert. Nach der Reisoomerisierung des 11-*cis*-Retinoids erfolgt über die Alkoholstufe die Oxidation zu 11-*cis*-Retinal. Das 11-*cis*-Retinal wird gebunden und wieder zurück in das OS transportiert. Danach folgt die Regeneration des Rhodopsins mit dem 11-*cis*-Retinal. In dieser Abbildung wurde die Synthese und Translokation des 11-*cis*-Retinoids vom Abtransport, der Weiterverarbeitung und der Speicherung des 11-*cis*-Retinoids durch gestrichelte und durchgezogene Pfeile getrennt. Die Abkürzungen RAL, ROL und E beziehen sich auf die Aldehyd-, Alkohol- und Estergruppen, die an der Retinoidkette angefügt sind. Weitere Abkürzungen der Enzyme: LRAT, Lecithin-Retinyl-Acyl-Transferase; RDH5, 11-*cis*-Retinoldehydrogenase; IRBP, Interphotorezeptorretinoidbindendes Protein; CRBP, zelluläres Retinolbindungsprotein; CRALBP, zelluläres Retinaldehydbindungsprotein. Abbildung aus Lamb und Pugh (2006).

All-*trans*-Retinol wird beim Eintritt in die RPE-Zelle durch das Chaperon CRBP (*Cellular Retinol Binding Protein*) gebunden (Abb. 1.6). Dieses CRBP bindet all-*trans*-Retinol mit hoher Spezifität im Vergleich zu anderen Isomeren, 11-*cis*-Retinol eingeschlossen (Übersicht: Saari 2000). Im RPE wird all-*trans*-Retinol durch das Enzym Lecithinretinolacyltransferase (LRAT) verestert (Übersicht: Ruiz *et al.* 1999, Saari 2000) (Abb. 1.6). Diese Veresterung von Vitamin A zu all-*trans*-Retinylester erfolgt durch den Transfer einer Fettsäure vom Phosphatidylcholin zum Retinol. Das gebildete

all-*trans*-Retinylester wird anschließend durch RPE65 gebunden (Abb. 1.6). Das RPE65 ist ein Enzym mit einer Isomerohydrolaseaktivität d.h. es katalysiert die Konversion von all-*trans*-Retinylester zu 11-*cis*-Retinylester und die anschließende Hydrolyse zum 11-*cis*-Retinol (Jin *et al.* 2005, Moiseyev *et al.* 2005, Redmond *et al.* 2005). Nach der Abgabe des 11-*cis*-Retinols durch das RPE65 sind zwei Wege möglich. Der primäre Weg ist die Weitergabe des 11-*cis*-Retinols an die 11-*cis*-RDH, um den Retinoidzyklus zu schließen (Abb. 1.6). Ein weiterer Weg ist die Veresterung des 11-*cis*-Retinols durch LRAT mit anschließender Speicherung des Esters (Abb. 1.6) (Übersicht: Lamb und Pugh 2004). Die Oxidation des 11-*cis*-Retinols zu 11-*cis*-Retinal erfolgt durch die 11-*cis*-RDH. In humanen Augen wurde gezeigt, dass die 11-*cis*-RDH essenziell für eine normale Dunkeladaptation ist (Cideciyan *et al.* 2000). 11-*cis*-Retinal wird direkt an das CRAL-Bindeprotein (*Cellular Retinal Binding Protein*) weitergegeben und gelangt mit Hilfe des IRBP vom RPE über die IPM zum Stäbchenzellenaußensegment (Abb. 1.6). In den Zapfenzellen erreicht 11-*cis*-Retinal das Opsinmolekül sehr leicht, da hier die Opsinmoleküle direkt in der Plasmamembran liegen und 11-*cis*-Retinal durch die Membran zum Molekül diffundieren kann. In Stäbchenzellen ist die Situation eine andere. Hier befinden sich die Opsinmoleküle in den Membranen der Disks, die separat im Außensegment angeordnet sind und keinen direkten Kontakt zur Plasmamembran haben. Da bis jetzt kein Protein bekannt ist, das im Cytoplasma des Stäbchenzellenaußensegments 11-*cis*-Retinal binden kann, können bezüglich des 11-*cis*-Retinal-Transfers nur Vermutungen angestellt werden. Es wäre möglich, dass ein Lipidaustausch zwischen dem Rand der Diskmembranen und der Plasmamembran stattfindet, der das über eine Schiff'schen Base an Phosphatidylethanolaminen (Anderson und Maude 1970, Poincelot *et al.* 1969) oder Phosphatidylserinen (Sommer *et al.* 2006) gebundene 11-*cis*-Retinal überträgt. Anschließend kann das 11-*cis*-Retinal selektiv durch Opsin aufgenommen und kovalent verknüpft werden, was dann wiederum zu einem lichtsensitiven Rhodopsin führt.

1.4 Interaktion des Rhodopsins mit seinem Retinalliganden

1.4.1 Strukturelle Eigenschaften des Rhodopsins, seines Meta II-Zustands und des Opsins

Im Jahr 2000 war Rhodopsin der erste GPCR, dessen Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse hochauflösend (2,8 Å) ermittelt werden konnte

1 EINLEITUNG

(Palczewski *et al.* 2000). Danach folgten weitere Strukturaufklärungen des Rhodopsins in noch höherer Auflösung (2,2 Å) (Okada *et al.* 2004), des Apoproteins Opsin (in diesem Fall ist es aufgrund der Kristallisationsbedingungen bei pH 5 – 5,8 eine aktivierte Form des Opsins, Opsin*) (Park *et al.* 2008) und des aktivierten Zustands des Rhodopsins (Meta II) (Choe *et al.* 2011). Die Architektur der sieben Transmembranhelices des Rhodopsins spiegelt sich auch in den anderen GPCRs wider, was die hohe Strukturhomologie in der Transmembranregion der bis jetzt aufgeklärten Kristallstrukturen bestätigt (Cherezov *et al.* 2007, Jaakola *et al.* 2008, Rasmussen *et al.* 2007, Warne *et al.* 2008).

Rhodopsin besteht aus einer Polypeptidkette von 348 Aminosäuren, die mit sieben Helices (TM1 – TM7) die Diskmembran durchspannen (Abb. 1.7). Eine achte Helix (Lys311 – Leu321) folgt der TM7 und ist parallel zur Membranoberfläche auf der cytoplasmatischen Seite der Diskmembran angeordnet (Abb. 1.7). Das C-terminale Ende der Polypeptidkette ist an der Membran durch die Palmitoylierung der Aminosäurereste Cys322^{CT} und Cys323^{CT} unmittelbar nach der Helix 8 verankert (Abb. 1.7). Wie das G_t-Protein bindet auch Arrestin an die cytoplasmatische Region des Rezeptors. Die Bindung von Arrestin erfordert die Phosphorylierung der wichtigsten C-terminalen Phosphorylierungsstellen Ser334^{CT}, Ser338^{CT} und Ser343^{CT} (Ohguro *et al.* 1996) (Abb. 1.7). Die drei flexiblen Peptidschleifen auf der cytoplasmatischen Seite des Rhodopsins (*Cytoplasmatic Loops*, CL1-3) verbinden die TM1 mit der TM2, die TM3 mit der TM4 und die TM5 mit der TM6 (Abb. 1.7).

Die extrazelluläre (interdiskale) Region des Rhodopsins beinhaltet das N-terminale Ende und die drei extrazellulären Peptidschleifen (*Extracellular Loops*, EL1-3) (Abb. 1.7). Der N-Terminus ist am Asn2^{NT} und Asn15^{NT} mit einer Hexasaccharidsequenz glycosyliert (Abb. 1.7) (Shichi *et al.* 1980). Es wurde durch ortsspezifische Mutagenese gezeigt, dass nur die Glycosylierung am Asn15^{NT} für die korrekte Faltung und den Transport des Opsinmoleküls wichtig ist (Kaushal *et al.* 1994). Im Vergleich zu den flexiblen cytoplasmatischen Peptidschleifen sind die extrazellulären Schleifen, die die TM2 mit der TM3, die TM4 mit der TM5 und die TM6 mit der TM7 verbinden, deutlich mehr strukturiert. Insbesondere EL2 ist in Rhodopsin zu einem hochgeordneten „Deckel“ gefaltet, der die Retinalbindungstasche vom extrazellulären Raum abtrennt (Janz und Farrens 2004, Okada *et al.* 2004). Neben der Disulfidbrückenbindung zwischen Cys110^{3.25}¹ (TM3) und Cys187^{EL2} (Mitte EL2) wird die EL2 durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert, das um die Aminosäure Glu181^{EL2} angeordnet ist (Abb. 1.7). Glu181^{EL2} besitzt im Rhodopsin (Grundzustand) je eine Wasserstoffbrückenbindung zu Tyr192^{EL2} und Tyr268^{6.51}. Außerdem besteht im

¹ Nummerierungen entsprechen der Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur (Ballesteros 1995).

Rhodopsin eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung vom Glu181^{EL2} zu Ser186^{EL2} und Glu113^{3,28}. Glu113^{3,28} ist das Gegenion der protonierten Retinyliden-Schiff'schen Base am Lys296^{7,43} (Okada *et al.* 2004). Dieses ist über eine Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat des Cys187^{EL2} durch ein Wassermolekül verbunden und liegt in Reichweite zur Hydroxylgruppe des Thr94^{2,65} (Okada *et al.* 2004). Dieses stabile Wasserstoffbrückennetzwerk um den Liganden herum könnte sehr wichtig für die Aufrechterhaltung des hohen pK_a der protonierten Retinyliden-Schiff'schen Base des lichtsensitiven Rhodopsins sein.

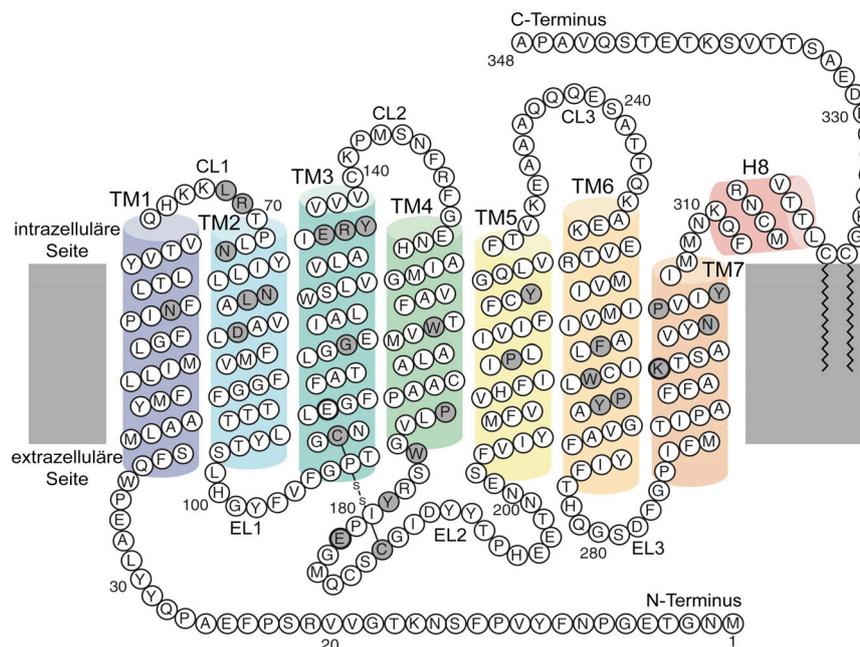


Abbildung 1.7: Aminosäuresequenz des Rhodopsins in zweidimensionaler Repräsentation. Der Rezeptor hat sieben Transmembranhelizes (TM1 – TM7) und eine kurze amphipathische Helix (H8), die auf der cytoplasmatischen Oberfläche der Diskmembran liegt. Die Aminosäuren werden im Einzelbuchstabencode gezeigt. Die grauunterlegten Kreise repräsentieren die hochkonservierten Aminosäuren der Klasse der rhodopsinähnlichen GPCRs. Die gezackten Linien an den C322- und C223-Resten deuten die Palmitoylierungen dieser Reste an. Eine Disulfidbrückenbindung ist zwischen dem C110- und C187 zu sehen. CL, cytoplasmatische Peptidschleife; EL, extrazelluläre Peptidschleife.

Zusätzlich zur Retinalbindungstasche existieren weitere funktionelle Mikrodomänen, durch die die inaktiven und aktiven GPCR-Konformationen stabilisiert werden können und die als molekulare Schalter die Konformationsänderungen innerhalb des Rezeptors steuern können (Ballesteros *et al.* 1998, Visiers *et al.* 2002). TM3 und TM5 werden im Rhodopsin durch ein weiteres Wasserstoffbrückennetzwerk zusammengehalten, an dem die Aminosäurereste der Glu122^{3,37}, Trp126^{3,41} und His211^{5,46} beteiligt sind (Abb. 1.8) (Li *et al.* 2004, Vogel *et al.* 2007). Diese Reste könnten die Veränderung der Lage des Retinals bei der Aufnahme und Abgabe sowie die Retinalisomerisierung wahrnehmen, da das Glu122^{3,37} zum Beispiel direkten Kontakt

1 EINLEITUNG

zum β -Iononring des Retinals hat. Neben der TM3-TM5-Mikrodomäne existiert am β -Iononring des Retinals eine weitere funktionelle Region um die Aminosäurereste Phe212^{5.47}, Phe261^{6.44} und Trp265^{6.48} (Abb. 1.8) (Okada *et al.* 2004), die die Isomerisierung des Retinals auf die TM6 übertragen könnten und dadurch die G_t-Proteinbindestellen generiert werden können.

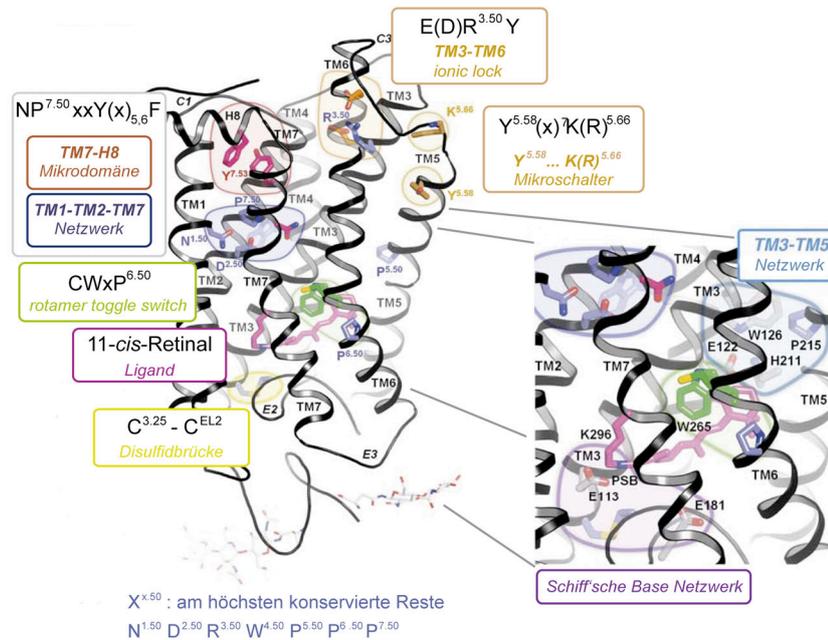


Abbildung 1.8: Funktionale Mikrodomänen und konservierte Aminosäurereste in GPCRs. Rhodopsin (PDB: 1GZM) mit gebundenem inversen Agonisten 11-*cis*-Retinal. Die Grundstruktur der GPCRs besteht aus 7TM-Helizes, die durch cytoplasmatische (C1-C3 oder CL1-CL3, oben) und extrazelluläre (E1-E3 oder EL1-EL3, unten) Peptidschleifen verbunden sind. Oligosaccharidketten binden am N-Terminus an Asn2^{NT} und Asn15^{NT}. Eine konservierte Disulfidbrücke verbindet das extrazelluläre Ende der TM3 (Cys110^{3.25}) mit der Mitte der EL2 (Cys187^{EL2}). Die am höchsten konservierten Aminosäurereste in jeder TM sind in blau gezeigt. Diese Reste sind mit $x.50$ gekennzeichnet, wobei x die TM-Nummer definiert und alle anderen Aminosäurereste dieser TM in Bezug zu diesem Rest nummeriert werden (Ballesteros 1995). Die farbig hinterlegten Bereiche und die farbigen Reste entsprechen den farbigen Logos, welche die GPCR-Sequenzen widerspiegeln, die für die α -Gruppen der rhodopsinähnlichen GPCRs konserviert sind. *Vergrößerte Struktur:* Rhodopsinspezifische Mikrodomänen (Rhodopsinnummerierung). Diese schließen das TM3-TM5-Netzwerk (blau) und das Schiff'sche Basen-Netzwerk (violett) mit der protonierten Schiff'schen Base-Verknüpfung zwischen dem Lys296^{7.43} an der TM7 und dem inversen Agonisten 11-*cis*-Retinal ein. Abbildung adaptiert aus Hofmann *et al.* (2009) und leicht verändert.

Neben den hier genannten rhodopsinspezifischen Mikrodomänen gibt es vier weitere Domänen, die in den GPCRs der Klasse der rhodopsinähnlichen Rezeptoren zu finden sind. Eine dieser vier Mikrodomänen ist das $E(D)R^{3.50}Y$ -Motiv. Dieses Motiv ist Teil des Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen TM3 und TM6 und wird auch **TM3-TM6-Ionic-Lock** (ionisches Schloss) genannt (Abb. 1.8), weil es den inaktiven Zustand des Rhodopsins, des Adrenorezeptors und anderer GPCRs stabilisiert (Ballesteros *et al.* 2001, Dror *et al.* 2009). Das $NP^{7.50}xxY(x)_{5,6}F$ -Motiv in TM7-H8 ist in zwei funktionelle Subdomänen geteilt (Abb. 1.8). Die erste Subdomäne spiegelt das

TM1-TM2-TM7-Wasserstoffbrückennetzwerk wider, wobei die zweite Subdomäne durch die hydrophobe Interaktion des Tyr306^{7.53} an TM7 mit Phe313^{7.60} an H8 definiert wird (Übersicht: (Hofmann *et al.* 2009)). Beide Subdomänen stabilisieren sowohl den inaktiven als auch den aktiven Zustand des Rhodopsins. Eine weitere konservierte Mikrodomäne in vielen GPCRs ist das CWxP^{6.50}-Motiv (Abb. 1.8), in dem Pro267^{6.50} die Helixstruktur in TM6 unterbricht und mit Hilfe von Trp265^{6.48} und Phe^{6.52} eine Rotation der TM6 bei Rezeptoraktivierung ermöglicht (*Rotamer-Toggle-Switch-Hypothese*) (Shi *et al.* 2002). In Rhodopsin steht der β -Iononring in direktem Kontakt zum Trp265^{6.48} und übernimmt mit Hilfe von Ala269^{6.52} die Aufgabe des in anderen GPCRs vorhandenen Phe^{6.52} (Nygaard *et al.* 2009, Shi *et al.* 2002). Eine weitere wichtige Mikrodomäne ist die Y^{5.58}(x)₇K(R)^{5.66}-Sequenz in der TM5 (Abb. 1.8). Die zwei daran beteiligten Aminosäurereste, Tyr223^{5.58} und Lys231^{5.66} gehen spezifische Interaktionen mit den Aminosäureresten aus dem TM3-TM6-Ionic-Lock-Motiv nach Rezeptoraktivierung ein (Elgeti *et al.* 2011).

In Rhodopsin (Grundzustand) werden beide Enden des Retinalliganden durch Aminosäurereste stabilisiert. Glu113^{3.28} in TM3 und Glu181^{EL2} in der EL2-Peptidschleife bilden den Gegenionkomplex der protonierten Retinyliden-Schiff'schen Base. Der β -Iononring des Retinals ist umgeben von His211^{5.46}, Trp126^{3.41} und Glu122^{3.37} des TM3-TM5-Wasserstoffbrückennetzwerks und Trp265^{6.48} des CWxP^{6.50}-Motives.

Der Vergleich der Opsinstruktur mit 11-*cis*-Retinal-gebundenem Rhodopsin zeigt (Palczewski *et al.* 2000, Park *et al.* 2008), dass eine aus TM1-TM4 bestehende Kernstruktur existiert, die zwischen Rhodopsin und Opsin nahezu unverändert ist. In der extrazellulären Domäne mit dem N-Terminus und dem „Deckel“ zur Retinalbindungstasche (EL2) sind die geringsten Änderungen zu sehen. Starke Änderungen sind dagegen innerhalb der Retinalbindungstasche sichtbar, wie z.B. in der Region der Bindungsstelle am Lys296^{7.43} sowie in den Regionen, wo sich im Rhodopsin die C19-Methylgruppe und der β -Iononring des Retinals befinden. Die Seitenkette des Lys296^{7.43} könnte sehr flexibel sein, da hier bei der Röntgenstrukturanalyse keine definierte Elektronendichte gemessen wurde (Park *et al.* 2008). Auch die Salzbrücke zwischen dem Lys296^{7.43} und dem Glu113^{3.28}, die in Rhodopsin vorhanden ist, ist in der Opsinstruktur nicht sichtbar. Stattdessen ist der Aminosäurerest der Glu181^{EL2} näher am Lys296^{7.43}, was auf eine Verlagerung der Interaktion vom Glu113^{3.28} auf das Glu181^{EL2} hindeutet. Die beiden voluminösen hydrophoben Reste Phe261^{6.44} und Trp265^{6.48} an TM6 sind mit der Auswärtsbewegung dieser Helix ebenfalls anders ausgerichtet. Die Trp265^{6.48}-Seitenkette hat sich in die Position verlagert, die vorher durch den β -Iononring des 11-*cis*-Retinals in Rhodopsin

besetzt war. Zusätzlich sind in der aktivierten Opsinstruktur zwei Öffnungen im hydrophoben Membranbereich des Rezeptors zu sehen, die einen Zugang bzw. Ausgang des Retinalliganden ermöglichen könnten (siehe Abschnitt 1.4.4.3) (Park *et al.* 2008, Scheerer *et al.* 2008).

Die bedeutenden strukturellen Änderungen für TM5 und TM6 spiegeln sich auch in der Verlängerung der Helixstruktur der TM5 um 1,5 – 2,5 Helixwindungen auf der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors wider. Durch die Verlängerung der TM5 und die Auswärtsbewegung der TM6 rückt die TM5 auf der cytoplasmatischen Seite 2 – 3 Å näher an TM6 heran. Außerdem gehen die Aminosäurereste der Mikrodomänen TM3-TM6-*Ionic-Lock* und NPxxY(x)_{5,6}F neue Interaktionen ein. Diese neuen Interaktionen finden mit Aminosäureresten des Y^{5.58}(x)₇K(R)^{5.66}-Motivs in TM5 statt, wodurch die Opsin-Konformation stabilisiert wird. Diese Opsinstruktur entspricht eher einer aktiven Konformation (Opsin*), da gezeigt wurde, dass die Cokristallisation aus Opsin und CT α -Peptid (C-terminales hochaffines G_t α -Analog) die gleichen strukturellen Eigenschaften in der cytoplasmatischen Domäne besitzt (aktive G_t-Protein-bindende Konformation) (Park *et al.* 2008, Scheerer *et al.* 2008).

Meta II zeigt eine zu Opsin* nahezu identische Konformation (Choe *et al.* 2011, Park *et al.* 2008, Scheerer *et al.* 2008). Diese übereinstimmenden strukturellen Eigenschaften spiegeln sich in den zwei vorhandenen Öffnungen, in der Bewegung der TM5 in Richtung TM6 durch Elongation der TM5, in der Rotation der TM6 (cytoplasmatische Entfernung der TM6 von der TM3, TM3-TM6-*Ionic-Lock* wird geöffnet) und in der Neuausrichtung des TM3-TM5-Wasserstoffbrückennetzwerkes wider (Choe *et al.* 2011). Die cytoplasmatische G_t-Proteininteraktionsdomäne des Meta II trägt die selben Eigenschaften eines aktiven Zustands wie das Opsin*. All-*trans*-Retinal ist in der reversibel gebildeten Meta II-Struktur von Choe *et al.* (2011) im Vergleich zum 11-*cis*-Retinal des Rhodopsins um seine Längsachse rotiert (Okada *et al.* 2004, Palczewski *et al.* 2000).

1.4.2 Lichtsensitiver Retinalligand

Die lichtensitive Verbindung ist in allen visuellen Rezeptoren das Retinal. In der Natur wird dieses durch die Spaltung des mit der Nahrung aufgenommenen Isoprens β -Carotin und anschließende Oxidation des Spaltproduktes all-*trans*-Retinol (Vitamin A) hergestellt (Übersicht: Nelson 2001). Neben all-*trans*-Retinal existieren mehreren isomere Formen (9-*cis*-, 11-*cis*- und 13-*cis*-Retinal), wovon das kovalent am Opsinmolekül gebundene 11-*cis*-Retinal das lichtensitive Rhodopsin bildet. Ergebnisse aus computergestützten Untersuchungen zeigten, dass die

elektrostatischen Interaktionen zwischen dem Retinal und Opsin zur natürlichen Selektion von 11-*cis*-Retinal gegenüber den anderen *cis*-Isomeren führen (Sekharan und Morokuma 2011). Im Rhodopsin ist das 11-*cis*-Retinal mit dem Protein über eine protonierte Schiff'sche Base am Lys296^{7.43} verbunden. Die positive Ladung der protonierten Schiff'schen Base erhöht die Elektronendelokalisation entlang der konjugierten Retinylidenkette und führt mit der Konformation des Opsins zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von kurzwelligen 380 nm auf sichtbare 500 nm. Die Interaktion des Gegenions Glu113^{3.28} mit der protonierten Schiff'schen Base reguliert nicht nur die Wellenlänge, sondern ist auch essentiell für die Aufrechterhaltung der inaktiven Konformation des Rezeptors.

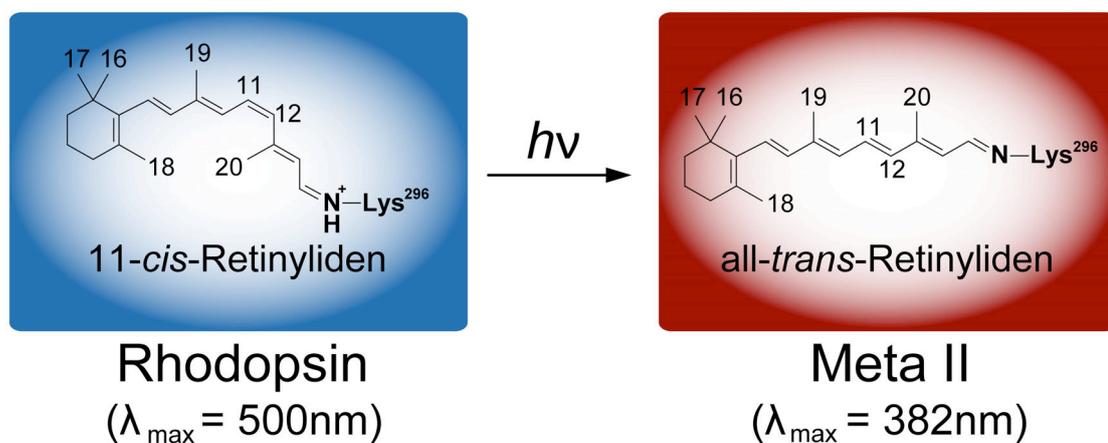


Abbildung 1.9: Isomerisierung der C11=C12-Doppelbindung des 11-*cis*-Retinals zur *trans*-Konformation nach Absorption eines Photons ($h\nu$). Das blaue Kästchen symbolisiert den inaktiven Zustand (Rhodopsin) und das rote Kästchen den aktiven Zustand (Meta II) des Rezeptors. Das Retinal ist kovalent an das Lys296^{7.43} gebunden und bildet die Schiff'sche Base, welche im Rhodopsin protoniert und im Meta II deprotoniert ist. Beide Spezies lassen sich UV/Vis-spektroskopisch durch die Wellenlänge ihrer maximalen Absorption unterscheiden. Die Zahlen am Retinal definieren die durchnummerierten Kohlenstoffatome.

Die Absorption von Licht durch das Retinal induziert eine *cis*→*trans*-Isomerisierung der C11=C12-Doppelbindung (Abb. 1.9). Im Opsinmolekül sorgt sowohl die Polyenkette als auch die assoziierten Methylgruppen des Retinals für eine Übertragung der Lichtenergie auf das Protein. Durch die Fixierung des Retinals, zum einen über die kovalente Verknüpfung am Lys296^{7.43} und zum anderen durch hydrophobe Wechselwirkungen des β -Iononrings in der Bindungstasche (z.B. durch Trp265^{6.48} (Abb. 1.10)), ist die Übertragung der Lichtenergie auf das Protein sehr effektiv. Die größte lichtinduzierte Änderung innerhalb des Retinals ist die Rotation der C20-Methylgruppe in Richtung EL2 (Abb. 1.10) (Nakamichi und Okada 2006a, Schreiber *et al.* 2006). Dieser Mechanismus könnte der Kontrolle des Protonierungszustands der Schiff'schen Base dienen, da das Entfernen der C20-

Methylgruppe des Retinals zu einer verlangsamten Photoreaktion und reduzierten Quantenausbeute führt (Kochendoerfer *et al.* 1996).

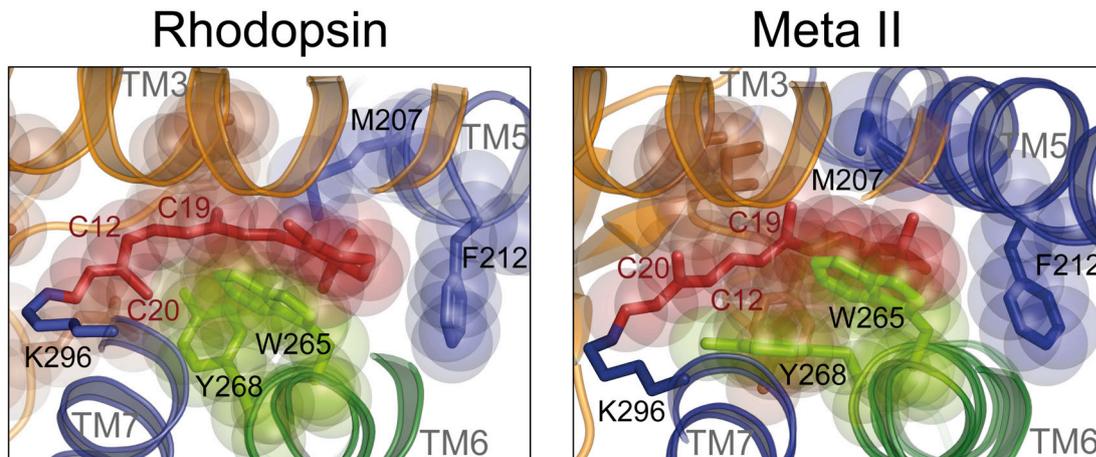


Abbildung 1.10: Fixierung des Retinals durch die Aminosäureseitenketten innerhalb der Bindungstasche. Die cytoplasmatische Sicht auf die Retinalbindungstasche im Rhodopsin und Meta II spiegelt die verschiedenen Interaktionen des 11-*cis*- (Rhodopsin) und all-*trans*-Retinals (Meta II) mit den Aminosäureseitenketten der Bindungstasche wider. Die Fixierung beider Retinale erfolgt durch die kovalente Verknüpfung an das Lys296^{7,43} und durch die hydrophoben Wechselwirkungen des retinalen β -Iononrings mit dem Trp265^{6,48}. Des Weiteren haben die Aminosäureseitenketten des Met207^{5,34} und Phe212^{5,39} eine das Retinal fixierende Funktion. Die größte lichtinduzierte Änderung innerhalb des Retinals beschreibt die Rotation der C20-Methylgruppe. Die C19-Methylgruppe des Retinals ist im Rhodopsinmolekül durch die Aminosäurereste Thr118^{3,33}, Ile189^{EL2}, Tyr191^{EL2} (unterhalb des Retinals und deshalb nicht dargestellt) und Tyr268^{6,51} stark fixiert und ist für die Aktivierung des Rhodopsins essentiell.

Die C19-Methylgruppe des Retinals ist im Rhodopsinmolekül durch die Aminosäurereste Thr118^{3,33}, Ile189^{EL2}, Tyr191^{EL2} und Tyr268^{6,51} stark fixiert und für die Aktivierung des Rhodopsins essentiell, da diese das Wasserstoffnetzwerk zwischen Glu113^{3,28} und EL2 beeinflusst (Corson *et al.* 1994, Nakayama und Khorana 1991). Durch die Interaktion des β -Iononrings mit dem Trp265^{6,48} an TM6 und der Fixierung des Retinals durch die restlichen Aminosäurereste der Bindungstasche könnte das Retinal als eine Klammer fungieren, die die Bewegung der TM6 im Rhodopsin verhindert und eine Rotation der TM6 nach Photoaktivierung induziert (Crocker *et al.* 2006). Die schnelle Photochemie und die hohe Quantenausbeute sind auf zwei Besonderheiten der Bindungstasche zurückzuführen. Zum einen entsteht durch die longitudinale Beschränkung des Retinals in der Bindungstasche eine Verdrehung der C11=C12-Doppelbindung (Okada *et al.* 2004, Struts *et al.* 2007, Sugihara *et al.* 2006), und zum anderen liegt die negative Ladung des Glu181^{EL2} nahe dem C12-Kohlenstoff am Retinal, was die Isomerisierung durch Verringerung des C11=C12-Bindungsgrades fördert (Smith 2010).

Die Photoisomerisierung des Retinals führt in den ersten Reaktionsintermediaten (Photo-, Batho- und Lumirhodopsin) zu einem hochverzerrten

all-*trans*-Retinal, da die Zeitspanne der Isomerisierung für die Neuausrichtung der Proteinstruktur zu kurz ist. Theoretische und experimentelle Studien argumentierten, dass die Interaktion zwischen dem C10-Wasserstoffatom und der C13-Methylgruppe des Retinals die effiziente, sehr schnelle und stereoselektive Isomerisierung des 11-*cis*-Isomers zum all-*trans*-Isomer fördern kann (Schoenlein *et al.* 1991, Warshel 1976). Das könnte erklären, warum diese beiden Retinalisomere eine essentielle Rolle in der Phototransduktion spielen.

1.4.3 Induzierung der aktiven Konformation des Rhodopsins durch Photoisomerisierung des Retinalliganden

In den ersten Nanosekunden nach der lichtinduzierten Isomerisierung des Retinals entstehen Photointermediate, die den Übergang vom Rhodopsin zu den Metastadien bilden. Diese Photointermediate weisen die gestreckte Form des all-*trans*-Retinals auf, ohne dabei große strukturelle Änderungen außerhalb der Retinalbindungstasche im Protein zu zeigen (Nakamichi und Okada 2006a, b, Ruprecht *et al.* 2004). Die frühen Photointermediate können UV/Vis-spektroskopisch in Photorhodopsin (570 nm), Bathorhodopsin (540 nm), BSI (*Blue-Shifted Intermediate*, 477 nm) und Lumirhodopsin (497 nm) unterschieden werden (Abb. 1.11) (Übersicht: (Lewis und Kliger 1992)). Die erste Metastufe wird innerhalb von Mikrosekunden erreicht und wird als Metarhodopsin I (Meta I) bezeichnet (Übersicht: Lewis und Kliger 1992). Im Meta I finden mit der Verlagerung des primären Gegenions der protonierten Schiff'schen Base von Glu113^{3,28} auf Glu181^{EL2} die ersten komplexeren Änderungen statt (Lüdeke *et al.* 2005, Yan *et al.* 2003). Die TM6 ist in Rhodopsin durch die feste Interaktion zwischen dem 11-*cis*-Retinal und Trp268^{6,48} in der geschlossenen Konformation fixiert. Durch die Retinalisomerisierung wird schon im Meta I eine kleine Rotationsbewegung der TM6 induziert (Ye *et al.* 2010). Des Weiteren wurde in *solid-state*-NMR-Experimenten gezeigt, dass das Retinal durch die *cis*→*trans*-Isomerisierung während der Rhodopsinaktivierung in Richtung TM5 translatiert und sich die EL2 leicht von der Retinalbindungsstelle entfernt (Ahuja *et al.* 2009a, Ahuja *et al.* 2009b, Brown *et al.* 2010). Die Retinaltranslation erlaubt dem β -Iononring, das TM3-TM5-Wasserstoffbrückennetzwerk zu stören und induziert somit eine cytoplasmatische Neuausrichtung der TM5, wodurch sich diese cytoplasmatisch von der TM3 entfernt (Li *et al.* 2004, Vogel *et al.* 2007, Ye *et al.* 2010).

1 EINLEITUNG

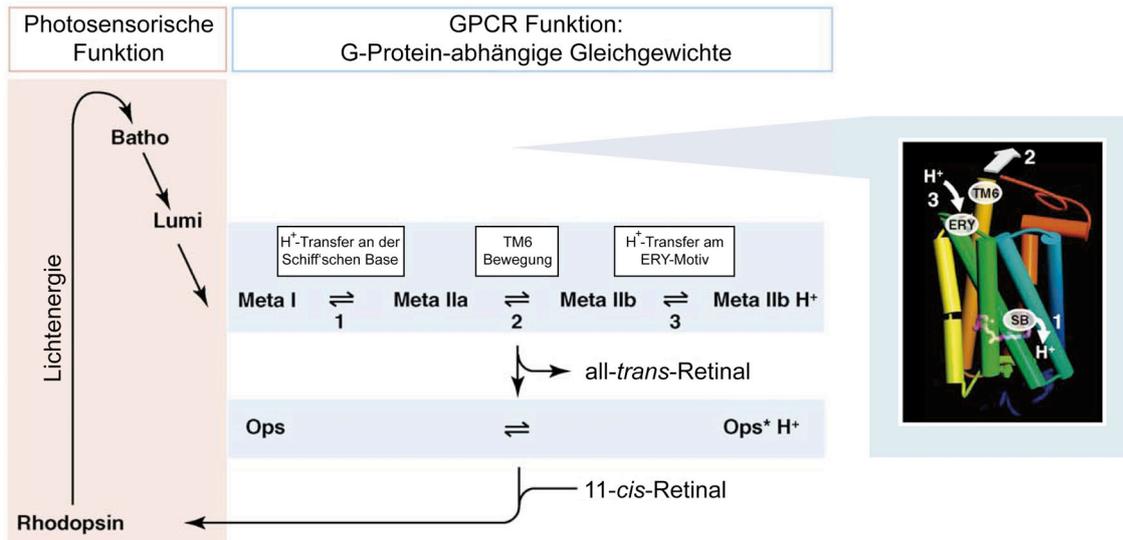


Abbildung 1.11: Rhodopsin und seine lichtaktivierten Photoprodukte. Die frühen Photoprodukte des Rhodopsins, bei denen die Reaktionen nur im photosensorischen Kern ohne strukturelle Änderungen in der Proteinstruktur stattfinden, sind rot unterlegt. Die späten Meta-Zustände sind blau unterlegt. (1) Übergang von Meta I auf Meta IIa durch Deprotonierung der Schiff'schen Base und Protonierung des Gegenions Glu113^{3,28}, (2) Übergang von Meta IIa auf Meta IIb durch die TM6-Auswärtsbewegung, (3) Übergang von Meta IIb auf Meta IIbH⁺ durch H⁺-Aufnahme am ERY-Motiv (TM3-TM6-Ionic-Lock) und Fixierung der offenen Konformation des Motivs. Diese Übergänge (1–3) werden in der Rhodopsinstruktur nochmals verdeutlicht (rechts). Abbildung ist aus Hofmann *et al.* (2009) und wurde leicht verändert.

Mit dem Meta I tritt der Aktivierungsprozess in ein System gekoppelter Gleichgewichte zwischen den Metaintermediaten ein (Abb. 1.11). Die deprotonierte all-*trans*-Retinyliden-Lys296^{7,43}-Verbindung definiert das Meta II (Okada *et al.* 2001). Das Meta II ist die Konformation des Rezeptors, die den GDP/GTP-Austausch im G_t-Protein effektiv katalysieren kann, denn es konnte gezeigt werden, dass die Meta II-Bildung auf Kosten des Meta I durch die Interaktion mit dem G_t-Protein erhöht werden konnte (Bennett *et al.* 1982, Emeis *et al.* 1982) und somit das Gleichgewicht Richtung Meta II verschoben ist. Heute sind drei verschiedene Meta II-Substadien bekannt (Meta IIa, IIb und IIbH⁺) (Abb. 1.11). Der Übergang vom Meta I zu Meta IIa erfolgt durch die Protonierung des Gegenions (Glu113^{3,28}) der Retinyliden-Schiff'schen Base, was dazu führt, dass diese deprotoniert wird (Arnis *et al.* 1994, Arnis und Hofmann 1993). Durch die Deprotonierung der Retinyliden-Schiff'schen Base finden erste strukturelle Änderungen im interhelikalen wasservermittelten Wasserstoffbrückennetzwerk um Asp83^{2,50} an TM2 statt und damit Änderungen im gesamten TM1-TM2-TM7-Netzwerk. Während andere Mikrodomänen des Rezeptors im Meta I-ähnlichen inaktiven Zustand vorliegen, zeigt das TM1-TM2-TM7-Netzwerk schon beim Übergang von Meta I auf Meta IIa aktivierende konformationelle Änderungen (Zaitseva *et al.* 2010). Der Übergang von Meta IIa zu Meta IIb wird durch die TM6-Auswärtsbewegung definiert (Knierim *et al.* 2007). Diese Auswärtsbewegung der TM6 resultiert aus einer verzögerten Reaktion auf die Deprotonierung der Schiff'schen Base (Übersicht: Okada *et al.* 2001)

und führt zu einem Aufbrechen des TM3-TM6-*Ionic-Lock*-Netzwerkes (Vogel *et al.* 2008). Die Bewegung der TM6 wird durch die Interaktion zwischen dem retinalen β -Iononring und dem Trp265^{6,48} des CWxP-Motivs unterstützt. Die C19-Methylgruppe des Retinals spielt bei der TM6-Bewegung ebenfalls eine entscheidende Rolle (Knierim *et al.* 2008). In Meta IIb wird die TM6 durch die Neuausrichtung der NPxxY(x)_{5,6}F-Mikrodomäne und durch die Fixierung des offenen TM3-TM6-*Ionic-Lock* in der Auswärtsposition stabilisiert. Die komplette strukturelle Umwandlung zum aktiven Rezeptor ist durch die Protonierung von Glu134^{3,49}, durch die neue Stabilisierung von Arg135^{3,50} durch Tyr223^{5,58} und die daraus resultierende Einwärtsbewegung der TM5 abgeschlossen und wird Meta IIbH⁺ genannt (Elgeti *et al.* 2011). Die anschließende Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base und die darauffolgende Abgabe des *all-trans*-Retinals hinterlässt das ligandenfreie Apoprotein Opsin (Abb. 1.11) (Übersicht: Hofmann *et al.* 2009).

Als eine weitere Metaform des Rhodopsins ist die sogenannte Retinalspeicherform, das Metarhodopsin III (Meta III) bekannt (Abb. 1.11). Im Meta III befindet sich die *all-trans*-Retinyliden-Lys296^{7,43}-Bindung in der *syn*-Konfiguration, während im Gegensatz dazu beim Meta II die Schiff'sche Base-Bindung zwischen dem Retinal und Apoprotein in der *anti*-Konfiguration vorliegt (Heck *et al.* 2003a, Ritter *et al.* 2004). Meta III wird als Speicherform bezeichnet, weil das *all-trans*-Retinal dem Retinoidzyklus zur Reisoomerisierung entzogen ist und es somit nicht mehr der Signaltransduktion zur Verfügung steht (Zimmermann *et al.* 2004).

1.4.4 Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden durch Opsin und Metarhodopsin II

Der lichtinduzierten Isomerisierung des 11-*cis*-Retinylidens folgt die Hydrolyse des *all-trans*-Retinylidens und die anschließende Dissoziation des *all-trans*-Retinals von der Bindungstasche des Apoproteins. Das vom Meta II dissoziierte *all-trans*-Retinal durchläuft den Retinoidzyklus und wird reisoomerisiert als 11-*cis*-Retinal zur Aufnahme ins Opsinmolekül bereitgestellt (siehe Abschnitt 1.3.3).

1.4.4.1 Zerfall des Metarhodopsin II – Hydrolyse der Schiff'schen Base und Dissoziation des *all-trans*-Retinals

Die protonierte Schiff'sche Base-Bindung wird durch die Salzbrücke mit seinem Gegenion Glu113^{3,28} und durch Reste an der „Deckel“-ähnlichen extrazellulären Peptidschleife 2 (EL2) stabilisiert. Die Hydrolyse der Schiff'schen Base im lichtsensitiven Rhodopsin ist sehr langsam ($t_{1/2}$ liegt unter physiologischen

Bedingungen in der Größenordnung von Tagen). Die strukturellen Faktoren in Rhodopsin spielen eine große Rolle bei der Kontrolle der Stabilität der Retinyliden-Lys296^{7.43}-Bindung: Zum ersten durch den außerordentlich hohen pK_a-Wert von mehr als 16 (Steinberg *et al.* 1993), zum zweiten durch die Unzugänglichkeit der Schiff'schen Base für Wasser und zum dritten durch das Agieren des EL2 als „Kinetic Trap“ (kinetische Mausefalle), welche den Verlust an transient hydrolysiertem Retinal verhindert (Janz *et al.* 2003).

Durch die konformationellen Änderungen hat das umgebende Wasser im Meta II Zugang zur Schiff'schen Base (Jastrzebska *et al.* 2011) und sorgt somit unter physiologischen Bedingungen für die Hydrolyse der Schiff'schen Base innerhalb von wenigen Minuten ($t_{1/2}$ ca. 2 min) (Heck *et al.* 2003a). Der pK_a der Schiff'schen Base der Modellspezies N-Retinyliden-*n*-Buthylamin liegt in neutralem Detergenz bei 6,1 (Cooper 1987).

Die Kinetik der Hydrolysereaktion wurde über Jahre hinweg durch die Messung des Zerfalls der Metarhodopsinphotoprodukte zu Opsin und all-*trans*-Retinal untersucht (Blazynski und Ostroy 1981, 1984). Dichroismus-Messungen zeigen, dass all-*trans*-Retinal nach dem Zerfall von Meta II rechtwinklig zur Membranoberfläche orientiert ist (Chabre und Breton 1979). Weitere Untersuchungen mittels Fluoreszenz- und UV/Vis-Spektroskopie zeigten ebenfalls, dass die Abnahme der Schiff'schen Base-Verknüpfung mit dem Zerfall des Meta II korreliert (Farrens und Khorana 1995). Es bleibt aber weiterhin offen, ob die Zugänglichkeit der Schiff'schen Base für Wasser, die Hydrolyse der Schiff'schen Base oder die Abgabe des all-*trans*-Retinals der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Zerfall von Meta II ist.

1.4.4.2 Regeneration des Rhodopsins – Aufnahme des 11-*cis*-Retinals und Bildung der Schiff'schen Base

Der genaue Mechanismus der Aufnahme des 11-*cis*-Retinals ist bis heute nicht vollständig verstanden. 11-*cis*-Retinal besetzt zunächst die hydrophobe Retinalbindungstasche des Opsins und wird dann kovalent an das Lys296^{7.43} gebunden. Für die Bildung der Schiff'schen Base müssen einige Voraussetzungen gegeben sein: Das Lys296^{7.43} muss deprotoniert sein, die Carbonylgruppe des Retinals muss polarisiert sein und das entstehende Wasser ausgeschlossen oder in der Retinalbindungstasche organisiert werden (Palczewski 2006). Unmittelbar nach der Verknüpfung des 11-*cis*-Retinals mit dem Lys296^{7.43} wird die Bindung durch die Translokation eines H⁺ vom Glu113^{3.28} protoniert. Durch die Protonierung entsteht zwischen der positiven Ladung des Retinyliden-Lys296^{7.43} und dem negativ geladenen Glu113^{3.28}-Gegenion eine Salzbrücke, die die Protonierung der Schiff'schen Base

stabilisiert. Zusätzlich bewegen sich weitere negativ geladene und polare Aminosäurereste näher an die protonierte Bindung heran (Palczewski *et al.* 2000).

Die Bildung der Schiff'schen Base verläuft über eine Carbinolaminzwischenstufe mit anschließender Dehydratisierung und zeigt bei Modellsubstanzen eine pH-Wert-Abhängigkeit in Form einer Glockenkurve (Jencks 1969). Diese pH-Wert-Abhängigkeit zeigte auch die Retinyliden-Schiff'sche Base-Bildung von Rhodopsin in Membranen (Henselman und Cusanovich 1976). Im Gegensatz dazu zeigte die Bildung der Retinyliden-Schiff'schen Base in detergentzolubilisiertem Rhodopsin keine pH-Wert-Abhängigkeit zwischen pH 5 und 10 (Matsumoto und Yoshizawa 2008).

1.4.4.3 Strukturelle Eigenschaften des Rezeptors, die die Funktion der Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden erklären könnten

Die strukturellen Änderungen durch die Photoaktivierung des Rhodopsins betreffen auch die Domäne der Bindungstasche (Choe *et al.* 2011, Park *et al.* 2008). In der aktiven Opsin- (Opsin*) sowie in der Meta II-Struktur werden zwei Öffnungen deutlich, die die Retinalbindungstasche mit der hydrophoben Membran verbinden (Abb. 1.12) (Choe *et al.* 2011, Park *et al.* 2008). Diese Öffnungen befinden sich zwischen TM1 und TM7 (Öffnung A) und zwischen TM5 und TM6 (Öffnung B) in der Membranregion des Rezeptors (Choe *et al.* 2011, Park *et al.* 2008, Scheerer *et al.* 2008, Standfuss *et al.* 2011) und könnten die Aufnahme und Abgabe des hydrophoben Retinalliganden in den bzw. aus dem Photorezeptor ermöglichen (Wang und Duan 2011). Beide Öffnungen sind trichterartig geformt und besitzen einen Ring aus aromatischen Aminosäuren (Öffnung A: Tyr43 und Phe293; Öffnung B: Phe208, Phe273 und Phe276) (Choe *et al.* 2011, Park *et al.* 2008).

In der Opsin*-Struktur konnte durch computergestützte Methoden (*Skeleton Search* und *Flexible Docking Analysis*) ein kontinuierlicher, 70 Å langer Kanal durch das Protein identifiziert werden (Hildebrand *et al.* 2009). Dieser Kanal verbindet die beiden nichtpolaren Öffnungen und bezieht in seinem zentralen Bereich die polare Retinalbindungstasche mit ein (Abb. 1.12), wodurch er als potentieller Ligandenkanal fungieren könnte. In diesem hypothetischen Ligandenkanal konnten vier verschiedene Engstellen identifiziert werden (Hildebrand *et al.* 2009). Es wurde vermutet, dass diese Stellen so eng sind, dass diese gedehnt werden müssen, damit der β -Iononring des Retinals diese passieren kann (Hildebrand *et al.* 2009). Eine dieser Engstellen befindet sich am aktiven Lys296^{7,43} und könnte eine regulatorische Rolle spielen (Abb. 1.13).

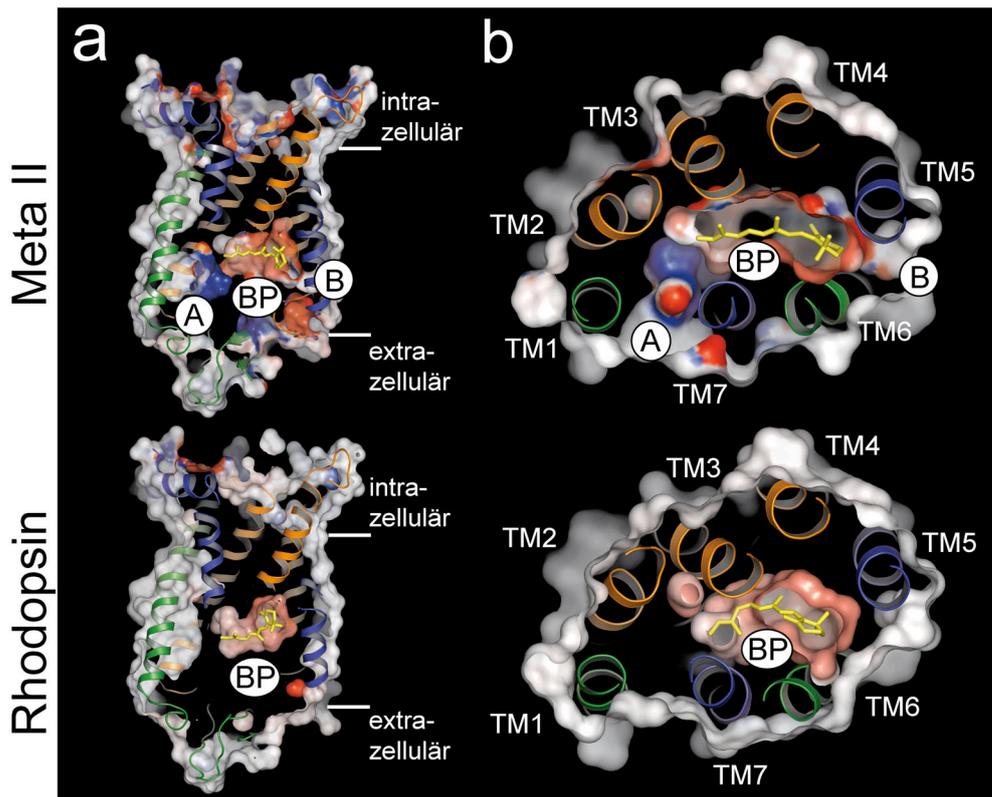


Abbildung 1.12: Vergleich der Kristallstrukturen des inaktiven Rhodopsins und aktiven Meta II. Dieser Vergleich verdeutlicht den hypothetischen Ligandenkanal im aktiven Zustand des Rezeptors. (a) Longitudinaler und (b) koplanares Schnitt (intrazelluläre Sicht) durch Meta II (oben; PDB: 3PXO) und Rhodopsin (unten; PDB: 1U19). In beiden Strukturen sind die Öffnung A (A) zwischen TM1 und TM7 (Meta II), die Retinalbindungstasche (BP) und die Öffnung B (B) zwischen TM5 und TM6 (Meta II) definiert. Die elektrostatischen Oberflächenpotentiale der Strukturen sind mit ± 30 kT/e negativ (rot) und positiv (blau) geladenen Oberflächenarealen konturangepasst und verdeutlichen die polaren und unpolaren Regionen des Ligandenkanals. Abbildungen wurden mit der PyMol-Software (www.pymol.org) erstellt.

In der Konformation, die Lys296^{7.43} im Opsin als ein Teil des Ser186^{EL2}-Glu181^{EL2}-Netzwerkes einnimmt, ist der Kanal blockiert. Ein kontinuierlicher Ligandenkanal ist nur möglich, wenn die Rotamerstellung der Lys296^{7.43}-Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung zum Tyr268^{6.51} zulässt (Hildebrand *et al.* 2009). In diesem Fall kann das Retinal durch das Opsin aufgenommen werden, um es anschließend kovalent zu verknüpfen. Die Interaktion der Lys296^{7.43}-Seitenkette mit der Tyr268^{6.51}-Seitenkette könnte als eine Schranke dienen und somit den Mechanismus des Rezeptors für die selektive Aufnahme von 11-*cis*-Retinal erklären.

Neben dem Ligandenkanal, der den Rezeptor parallel zur Membranoberfläche durchquert, wurde ein weiterer Kanal postuliert, der die cytoplasmatische Oberfläche des Rezeptors mit der Retinalbindungstasche verbindet und senkrecht zur Membranoberfläche verläuft (Angel *et al.* 2009, Choe *et al.* 2011, Park *et al.* 2008). Dieser Kanal im Meta II könnte den Zugang des umgebenden Wassers zur Retinyliden-Schiff'schen Base und damit die Hydrolyse des all-*trans*-Retinylidens ermöglichen (Jastrzebska *et al.* 2011).

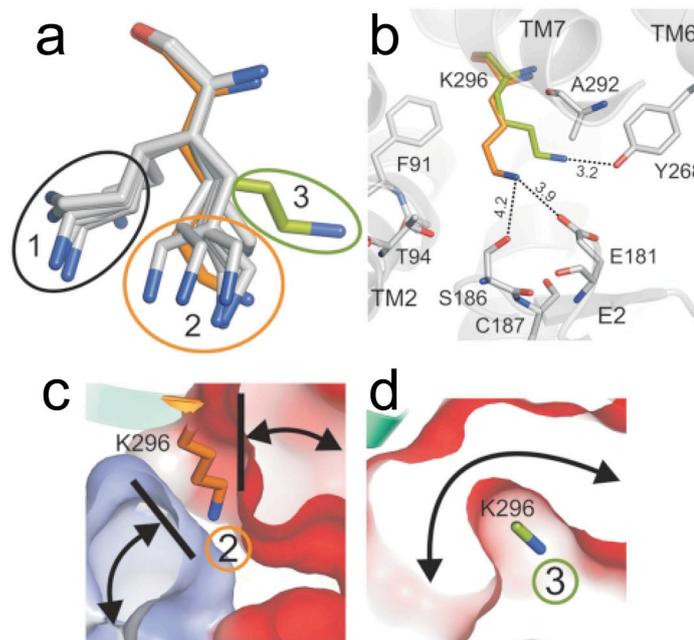


Abbildung 1.13: Kanalengstelle am Lys296. Diese Engstelle wird durch die Rotamerstellung des Lys296 beeinflusst. (a) Gruppen (1 – 3) der berechneten Lys296-Rotamere. Gruppe 2 (orangefarben) beschreibt die Rotamere des Lys296^{7,43}, welche auch in der Kristallstruktur des Opsin*-CT α -Peptids (PDB: 3DQB) gefunden wurden. Gruppe 3 (grün) zeigt die Konformation des Lys296, welche zur computergestützten Untersuchung der Retinalpassage genutzt wurde. (b) Überlagerung der beiden plausibelsten Konformere des Lys296 in der Umgebung der Aminosäureseitenketten innerhalb der Bindungstasche (cytoplasmatische Sicht) mit potentiellen Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien). (c) Darstellung des Ligandenkanals mit der geschlossenen Konformation des Lys296 (Gruppe 2), welches über eine Wasserstoffbrücke mit Ser186^{EL2} und Glu181^{EL2} verbunden ist. (d) Darstellung des Ligandenkanals mit der geöffneten Konformation des Lys296 (Gruppe 3), welches an Tyr268^{6,51} über eine Wasserstoffbrücke verbunden ist. Die elektrostatischen Oberflächenpotentiale sind mit ± 20 kT/e negativ (rot) und positiv (blau) geladenen Oberflächenarealen konturangepasst. Abbildung aus Hildebrand *et al.* (2009) leicht modifiziert.

1.4.4.4 Wechselwirkungen des Opsins mit dem G_t-Protein bei der Aufnahme und Abgabe des Agonisten all-*trans*-Retinal

Agonisten sind als Liganden definiert, die den Rezeptor maximal aktivieren, wohingegen partielle Agonisten eine submaximale Aktivierung des G-Proteins induzieren. Inverse Agonisten inhibieren die basale (konstitutive) Aktivität eines ligandenfreien Rezeptors. Antagonisten haben keinen Effekt auf die Basalaktivität, blockieren aber den Zugang für andere Liganden.

Während die strukturellen Änderungen, die bei der Aktivierung des Rhodopsins auftreten, vermutlich ähnlich zu anderen GPCRs sind, ist der Mechanismus, der diese Änderungen induziert, von diesen sehr verschieden. Im Rhodopsin ist der inverse Agonist (11-*cis*-Retinal) kovalent mit dem Protein verknüpft, der durch Lichtabsorption zum vollen Agonisten (all-*trans*-Retinal) konvertiert werden kann. All-*trans*-Retinal kann nur in der Bindungstasche am Lys296 gebunden als voller Agonist wirken. Es

wurde gezeigt, dass das freie *all-trans*-Retinal nur maximal 14 % der Opsinaktivität zum G_t-Protein im Vergleich zum lichtaktivierten Rhodopsin induziert (Han *et al.* 1996, Jäger *et al.* 1996). *All-trans*-Retinal könnte daher an einer sekundären Bindungsstelle des Opsinmoleküls als partieller Agonist wirken. Im Vergleich zum Rhodopsin wird die große Mehrheit der anderen GPCRs durch die Diffusion eines Agonisten in den Rezeptor aktiviert. Der β 2-adrenerge Rezeptor wird zum Beispiel durch die Bindung von Adrenalin aktiviert.

Eines der einfachsten Modelle zur Erklärung der Rezeptor-Ligand-Interaktion ist das „*Two-State-Model*“, welches voraussetzt, dass der Rezeptor nur in zwei Zuständen existiert (inaktiv (R) und aktiv (R*)) (Birnbaumer *et al.* 1980, Heidenreich *et al.* 1980, Iyengar *et al.* 1980, Karlin 1967, Podleski *et al.* 1970). In Abwesenheit eines Liganden wird die basale Aktivität durch das Gleichgewicht zwischen R und R* definiert. Die Wirksamkeit eines Liganden reflektiert seine Fähigkeit, das Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen zu verschieben. Die vollen Agonisten binden an R* und stabilisieren ihn, wohingegen die inversen Agonisten an R binden und diesen Zustand stabilisieren. Partielle Agonisten haben eine Affinität für beide Zustände. In den meisten anderen GPCRs existiert jeweils eine chemische Verbindung für einen vollen, inversen und partiellen Agonisten sowie für einen Antagonisten, beim Rhodopsin existiert dagegen nur eine Verbindung in zwei verschiedenen Konfigurationen (11-*cis*-Retinal und *all-trans*-Retinal). 11-*cis*-Retinal stabilisiert als inverser Agonist den inaktiven Zustand und das *all-trans*-Retinal als voller Agonist den aktiven Zustand des Rhodopsins.

Da nicht nur der Ligand selbst definierte Zustände des Rezeptors stabilisieren kann, sondern auch das G-Protein, die Rhodopsinkinase oder das Arrestin, kann dieses Modell der zwei Zustände die Interaktionen nicht vollständig beschreiben. Aus diesem Grund wurde ein erweitertes Modell entwickelt. Das „*Cubic-Ternary-Complex-Model*“ (Kubisch-ternäre Komplexmodell) beschreibt die kooperative Interaktion zwischen dem aktiven bzw. inaktiven Rezeptor, dem G-Protein und dem Agonisten (Abb. 1.14) (Weiss *et al.* 1996). Das kubisch-ternäre Komplexmodell fordert einige Annahmen: 1. Der Rezeptor hat zwei getrennte Bindungsstellen (eine extrazelluläre Bindestelle für den Agonisten und Antagonisten und eine cytoplasmatische Bindestelle für das G-Protein). 2. Die extrazellulären Liganden und das cytoplasmatische G-Protein existieren in zwei separaten Phasen und beeinflussen sich nicht gegenseitig. 3. Der Rezeptor existiert in zwei Zuständen bzgl. der Aktivierung des G-Proteins (aktiv und inaktiv). 4. Die Interaktionen zwischen Ligand, G-Protein und Rezeptoraktivierungszuständen unterliegen dem Massenwirkungsgesetz. 5. Alle möglichen Zweiwege- und Dreiwegeinteraktionen zwischen Ligand, G-Protein und

Rezeptoraktivierungszuständen sind potentiell signifikant und können durch Koeffizienten im Modell repräsentiert werden.

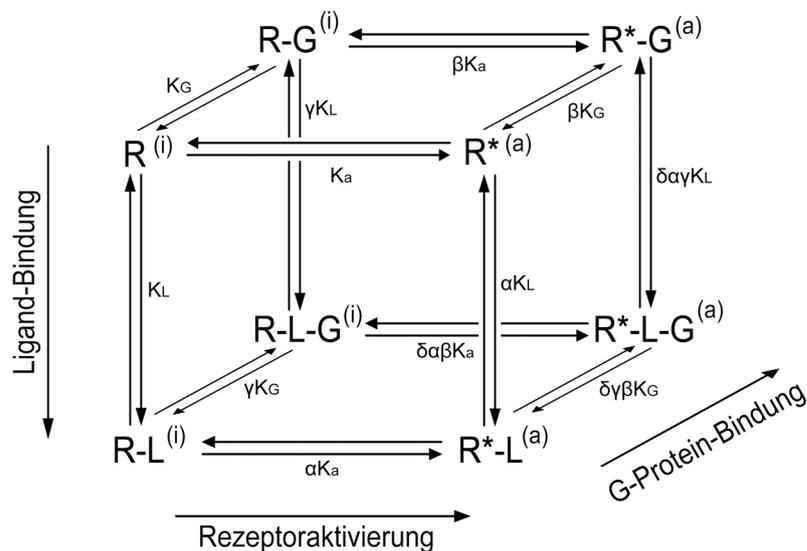


Abbildung 1.14: Kubisch-ternäres Komplexmodell zur Charakterisierung der Rezeptor-Liganden-G-Protein-Interaktion in GPCRs. In diesem Modell existieren drei Ebenen des Rezeptorzustands. Die erste Ebene zeigt von links (inaktiv) nach rechts (aktiv) die Rezeptoraktivierung mit jeweils vier Zuständen (Rezeptor allein (R), Rezeptor mit Ligand (R-L), Rezeptor mit G-Protein (R-G) und Rezeptor mit Ligand und G-Protein (R-L-G)). Die zweite Ebene zeigt die Ligandenbindung mit ebenfalls vier Zuständen (R-L, R*-L, R-L-G und R*-L-G). Die dritte Ebene beschreibt die G-Proteinbindung mit den vier verschiedenen Zuständen (R-G, R*-G, R-L-G und R*-L-G). K_a ist als die Gleichgewichtskonstante für die Aktivierung des Rezeptors, K_L für die Bindung des Liganden an den inaktiven Rezeptor und K_G für die Bindung des G-Proteins an den inaktiven Rezeptor definiert. Der Faktor α beschreibt den Effekt der Ligandenbindung auf die Aktivierung des Rezeptors, β definiert den Effekt der Rezeptoraktivierung auf die G-Proteinbindung, γ erklärt den Effekt der Ligandenbindung auf die G-Proteinbindung und δ ist eine Größe, die den Effekt von zwei Rezeptorebenen auf die dritte Ebene beschreibt (z.B. Effekte der Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung auf die G-Proteinbindung). Die Abbildung stammt aus Weiss *et al.* (1996) und wurde leicht verändert.

In diesem Modell ist es nicht obligatorisch, dass die Bindung des Liganden zur Aktivierung des Rezeptors führt. Der Ligand kann zum Beispiel an den Rezeptor binden ohne diesen zu aktivieren. Erlaubte Transformationen sind: 1. eine Änderung des Rezeptorzustandes (aktiv zu inaktiv und umgekehrt), 2. eine Bindung und Dissoziation des G-Proteins und 3. eine Bindung und Dissoziation des Liganden. Mit diesem Modell kann zum Beispiel der unterschiedliche Einfluss des G_t -Proteins auf die Opsinaktivierung oder auf die Retinalbindung untersucht werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Der Prozess des Meta II-Zerfalls zu Opsin und all-*trans*-Retinal sowie die Regeneration des Rhodopsins aus Opsin und 11-*cis*-Retinal konnte bis heute nicht im Detail aufgeklärt werden. Deshalb liegt der Fokus dieser Arbeit auf noch offenen

Fragen bezüglich des Abgabe- und Aufnahmemechanismus des Retinalliganden, der Direktionalität der Abgabe und Aufnahme, der Rolle der kovalenten Retinyliden-Lys296-Verknüpfung, des Hydrolysemechanismus bzw. der Bildung der Retinyliden-Schiff'schen Base und der Existenz des Retinalligandenkanals in den unterschiedlichen Rhodopsinzuständen (Meta I/II/III, aktives Opsin, inaktives Opsin und Rhodopsin).

Die Untersuchungen von Schädel *et al.* (2003) ergaben erste Hinweise dafür, dass die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden nicht durch die selbe Öffnung erfolgen und der Mechanismus der Retinalpassage unidirektional ist (Schädel *et al.* 2003). In dieser Arbeit werden weitere Beweise für diesen Aspekt dargelegt. Die Untersuchungen von Schädel *et al.* (2003) wurden in Stäbchenzellendiskmembranen durchgeführt, in denen das Retinal in Wechselwirkung mit den Phospholipiden der Membran tritt. Deshalb wurde in dieser Arbeit der überwiegende Teil der Ergebnisse mit einem Ansatz ohne Membran produziert, der diese Nebeneffekte ausschließt.

Diese Arbeit basiert generell auf der Identifizierung des Retinalligandenkanals in der Opsinstruktur mittels computergestützter Methoden (*Skeleton Search* und *Flexible Docking Analysis*) (Hildebrand *et al.* 2009). In Übereinstimmung mit molekulardynamischen Simulationen (Wang und Duan 2011) konnten im Verlauf des Ligandenkanals vier Engstellen für das Retinal identifiziert werden (Abb. 1.15) (Hildebrand *et al.* 2009). Diese Engstellen werden vor allem durch große Aminosäurereste an den Öffnungen A und B sowie durch das Lys296 und das Tyr268 in der Retinalbindungstasche definiert (Hildebrand *et al.* 2009). Mittels ortsspezifischer Mutagenese an diesen Engstellen in Kombination mit spektroskopischen Messmethoden soll der Einfluss der Rezeptorstruktur auf die Retinalabgabe und -aufnahme untersucht werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, eine Aussage darüber zu treffen, welche Rolle einzelne Aminosäuren in der Retinalbindungstasche (z.B.: Tyr268) beim Photoaktivierungsprozess bzw. beim Retinalaustausch spielen können.

Durch den Austausch von Aminosäureresten soll der Mechanismus der Bildung der Retinyliden-Schiff'schen Base und ihrer Spaltung besser verstanden werden. Durch die Kombination aus ortsspezifischer Mutagenese und der Verwendung des Nukleophils Hydroxylamin soll in dieser Arbeit auch der Einfluss des Ligandenkanals beim Retinalabgabe- bzw. beim Retinalaufnahmeprozess spezifiziert werden.

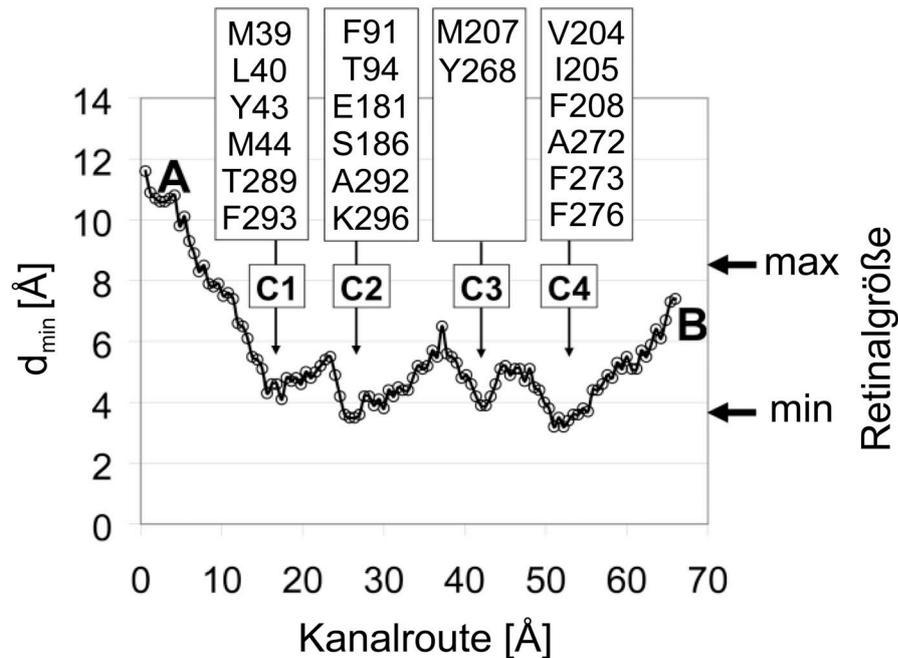


Abbildung 1.15: Engstellen innerhalb des hypothetischen Ligandenkanals mit den in dieser Arbeit verwendeten Mutationsstellen. Die minimale innere Weite des Kanals (d_{\min}) wurde alle 0.6 \AA gemessen, ausgehend von der Öffnung A hin zur Öffnung B. Die Aminosäureseitenketten definieren die Engstellen (C1 – C4) und spiegeln die Mutationsstellen zur Identifizierung des Ligandenkanals wider. Die maximale und minimale Ausdehnung des retinalen β -Iononrings ist rechts dargestellt. Abbildung aus Hildebrand *et al.* (2009) leicht modifiziert.

Um die Rolle der Spaltung und Bildung der Schiff'schen Base zu verstehen, muss verstanden werden, welche Rolle die kovalente Verknüpfung zwischen dem Apoprotein und seinem Retinalliganden spielt. Was würde geschehen, wenn im Opsinmolekül keine kovalente Verknüpfung zum Retinalliganden möglich ist? Es wurde bereits gezeigt, dass ein rhodopsinähnlicher Zustand durch das Retinalanalogon 11-*cis*-PrSB in der Lys296Gly-Rhodopsinmutante erreicht werden kann (Zhukovsky *et al.* 1991). In dieser Arbeit soll gezeigt werden, ob neben dem rhodopsinähnlichen Zustand auch die Metazustände existieren, welchen Einfluss die fehlende kovalente Verknüpfung auf die Aufnahme und Abgabe des Retinalanalogons hat und welchen Einfluss all-*trans*-Retinal auf die G_t -Proteinaktivität des Opsins hat.

Ein weiterer Ansatz zum Verständnis der Rezeptor-Ligand-Interaktion ist die Untersuchung der Aufnahme und Abgabe des Agonisten all-*trans*-Retinal durch ein Opsinmolekül, das im aktiven Zustand gehalten wird. Dadurch ist es möglich, Opsin als Rezeptor mit diffusionsfähigem agonistischen Liganden untersuchen zu können, was den besseren Vergleich zu anderen ligandengesteuerten GPCRs ermöglicht. Diese Untersuchung soll mit dem kubisch-ternären Komplexmodell beschrieben werden.

Des Weiteren soll neben dem Ligandenkanal der Wasserkanal als ein weiteres strukturelles Merkmal des aktivierten Rezeptors untersucht werden (Angel *et al.* 2009,

1 EINLEITUNG

Choe *et al.* 2011, Park *et al.* 2008). Dieser Kanal ermöglicht es dem exogenen Wasser, die Retinalbindungsstelle zu erreichen, um die Schiff'sche Base zu hydrolysieren (Jastrzebska *et al.* 2011). Durch die Verwendung von Hydroxylamin (HA) und seinen Derivaten soll gezeigt werden, für welche Moleküle dieser Kanal durchlässig ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor (Opsin) und seinem Liganden (*all-trans*- und *11-cis*--Retinal) beim Prozess der Retinalabgabe und -aufnahme besser zu verstehen. Die Erkenntnisse aus dieser Studie könnten in die Untersuchungen anderer GPCRs und ligandgesteuerter Transmembranrezeptoren einfließen.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Der *E. coli*-Stamm XL1Blue (Stratagene, USA) wurde verwendet, um die Plasmid-DNA zu gewinnen, die zur Expression der Opsin- und Rhodopsinmutanten in COS-1 Zellen benötigt wurde.

2.1.2 COS-1 Zellen

Die COS-1 Zellen (ATCC #: CRL-1650, American Type Cell Collection, USA; Gluzman 1981) wurden für die Expression der in dieser Dissertation verwendeten Opsin- und Rhodopsinmutanten eingesetzt. Diese COS-1 Zellen wurden transient mit dem pMT4-Plasmid transfiziert.

2.1.3 pMT4-Plamid

Für die Vervielfältigung der synthetisch hergestellten Opsin-DNA in *E. coli* sowie für die Expression des modifizierten Opsins in COS-1 Zellen wurde das pMT4-Plasmid verwendet. Dieses Plasmid basiert auf dem pMT3-Vektor (Abb. 2.1), in dem das Opsingen über eine EcoRI/NotI-Restriktionsschnittstelle eingebaut wurde (Ferretti *et al.* 1986, Franke *et al.* 1988). Der pMT3-Vektor wiederum setzt sich aus dem SV40-Replikationsursprung und Verstärker (SV40 Ori + *Enhancer*) für die COS-1 Zellen, dem Adenovirus-Major-Late-Promotor (AdMLP) mit *Tripartite Leader* (dient als Translationsverstärker), dem Dihydrofolat-Reduktase-Gen (DHFR, unentbehrlich für die Nukleotid-Synthese), dem Polyadenylierungssignal (PolyA, unentbehrlich für die Translation der mRNA zum Protein), dem virusassoziierten Gen (VAI), dem PBR322-Replikationsursprung (PBR322 Ori) für die Vervielfältigung der Plasmid-DNA in *E. coli* und dem β -Lactamase-Gen zur Unterscheidung von plasmidenthaltenen *E. coli*-Bakterien (Antibiotikaresistenz) zusammen.

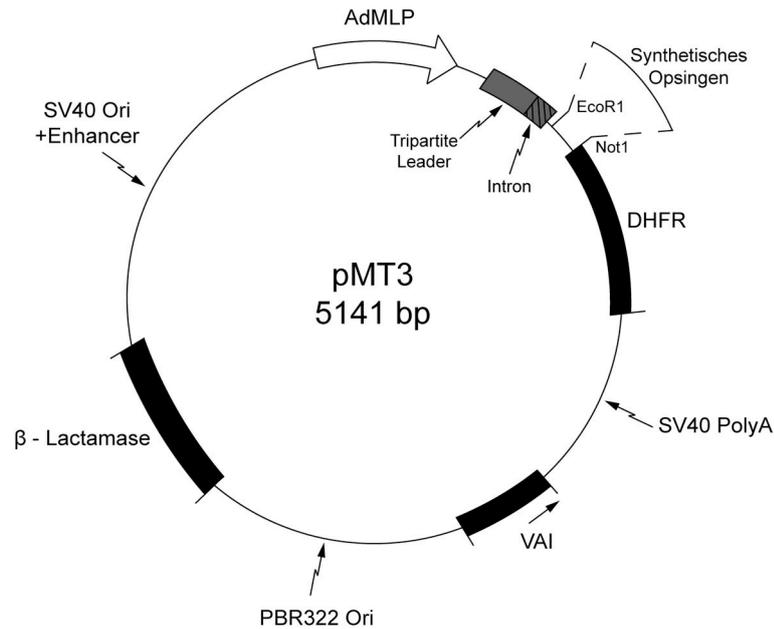


Abbildung 2.1: Eukaryotischer Expressionsvektor pMT4. Das pMT4-Plasmid besteht aus dem abgebildeten pMT3-Plasmid und einem, mittels EcoRI/NotI-Schnittstellen eingefügten synthetischen Opsingen (Ferretti *et al.* 1986, Franke *et al.* 1988). Ori: Replikationsursprung, DHFR: Dihydrofolat-Reduktase-Gen, AdMLP: Adenovirus-Major-Late-Promotor, PolyA: Polyadenylierungssignal, VAI: virusassoziiertes Gen. Plasmid aus Khorana (1993).

2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms *Lasergene* (DNASTAR, USA) entworfen und anschließend durch die Firma Sigma-Aldrich synthetisiert (Oligonukleotidsequenzen, siehe Tab. 5.1). Als erstes wurde die N2C-Mutation mit Hilfe der spezifisch synthetisierten Oligonukleotide über die Polymerase-Kettenreaktion in das Opsingen eingefügt. Dieses Opsingen wurde wiederum in den pMT3-Vektor ligiert. Nach der Replikation des Plasmids in *E. coli* wurde das Plasmid aufgereinigt und das EcoRI/SpeI-Fragment aus der N2C-Mutante ausgeschnitten. Dieses Fragment wurde anschließend in den Vektor mit der D282C-Mutation ligiert. Alle weiteren Mutationen wurden auf dem Hintergrund der N2C/D282C Mutation durchgeführt.

2.1.5 Retinoide

All-*trans*-Retinal in Pulverform (Sigma-Aldrich) wurde in Ethanol gelöst, so dass Konzentrationen zwischen 20 mM und 30 mM entstanden. Die Konzentrationen wurden UV/Vis-spektroskopisch bestimmt (λ_{\max} 383 nm, $\epsilon = 42\,900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Wald und Brown 1953)).

11-*cis*-Retinal wurde durch die Illumination von all-*trans*-Retinal mit gelbem Licht ($\lambda > 420$ nm) isomerisiert. Die Aufreinigung und Separation des entstandenen 11-*cis*-Retinals (Anteil von 11-*cis*-Retinal an der gesamten Retinalmenge ist 25 %) erfolgte durch eine preparative HPLC (HPLC-Säule – siehe Abschnitt 2.3). Die Messung der Konzentration wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt (λ_{\max} 382 nm, $\epsilon = 25\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Hubbard *et al.* 1971). Die Messung der Reinheit der 11-*cis*-Retinalprobe erfolgte durch eine analytische HPLC mit 5 % Diethylether (Merck, Deutschland) in Heptan (Sigma-Aldrich).

Die Herstellung des 11-*cis*- und all-*trans*-PrSB erfolgte in Ethanol durch Zugabe von *n*-Propylamin (Sigma-Aldrich) in zehnfacher Menge des Retinals und durch anschließende Inkubation über Nacht bei 4 °C (Zhukovsky *et al.* 1991).

2.2 Methoden zur Probengewinnung

2.2.1 Mutagenese des Opsingens, Expression der Opsinmutanten und Präparation der Rhodopsin- und Opsinmutanten

Vorraussetzung für die Klonierung der Opsinmutanten ist ein synthetisch hergestelltes Opsingen mit EcoRI/NotI-Restriktionsschnittstellen (Ferretti *et al.* 1986), welches in den pMT3-Vektor ligiert wurde.

2.2.1.1 Basenaustausch mittels Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe des *QuikChange-Site-Directed-Mutagenesis*-Kit (Stratagene, USA) und unter Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden kann eine Punktmutation auf das replizierte Plasmid mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) übertragen werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Folgender PCR-Ansatz zur Amplifikation des pMT4-Vektors wurde verwendet:

Menge	Reagenz
2,5 µl	10 x Reaktionspuffer
X µl (25 ng)	doppelsträngige DNA-Matrize
X µl (125 ng)	<i>Forward</i> -Oligonukleotidprimer
X µl (125 ng)	<i>Reverse</i> -Oligonukleotidprimer
0,6 µl	25 mM dNTP-Gemisch
mit destilliertem Wasser auf 24,5 µl auffüllen	
0,5 µl	PfuTurbo-DNA-Polymerase (2,5U/µl)

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde folgendes Programm verwendet:

Zyklus	Temperatur	Zyklusdauer
1	95 °C	2 Minuten
2-X	95 °C	30 Sekunden
	60 °C	1 Minute (Anlagerung der Oligonukleotide)
	64 °C	12 Minuten (Extension)
X+1	10 °C	bis zur Probenentnahme

Die maximale Zyklenanzahl X und die Anlagerungstemperatur (Hybridisierungstemperatur) variieren bei unterschiedlichen Oligonukleotiden. Die Extensionszeit der PCR hängt von der Länge des jeweilig verwendeten Gens ab (1 Minute je kb Genlänge). Detaillierte Informationen sind in der Benutzeranleitung des *QuikChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kits* (Stratagene, USA) zu finden. Nach jeder PCR wurde das amplifizierte Produkt über ein einprozentiges Agarosegel gereinigt und mittels Sequenzierung auf eventuelle Fehler bei der PCR untersucht.

2.2.1.2 DpnI-Restriktionsverdau

Die methylierte Matrizen-DNA wurde mittels Restriktionsenzym DpnI verdaut und damit zerstört. Für diesen Ansatz wurde 1 µl DpnI direkt zum PCR-Ansatz gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Transformation der kompetenten XL1-Blue-E. coli-Bakterien

Um die *E. coli*-Bakterien mit dem modifizierten pMT4-Plasmid zu transformieren, wurden 2 µl des mit DpnI-behandelten PCR-Ansatzes zu 50 µl chemisch kompetenter Bakterien (XL1-Blue-Stamm) gegeben und 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Aufnahme des Plasmids durch *E. coli* erfolgte durch einen zweiminütigen Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurde der Transformationsansatz für zwei Minuten auf 4 °C abgekühlt und mit 500 µl des auf 37 °C vortemperierten LB-Mediums (Miller Becton-Dickinson, USA) versetzt. Nach einstündiger Inkubation wurden die *E. coli* auf LB-Medium-Agar-Platten mit Zusatz von 100 µl/ml Ampicillin (Roche) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.4 Kultivierung der E. coli-Bakterien

Während der Inkubation über Nacht wuchsen nur *E. coli*-Kolonien, die das pMT4-Plasmid mit dem Antibiotikaresistenzgen enthielten. Diese *E. coli*-Kolonien wurden am darauffolgenden Tag ausgewählt und in 5 ml flüssiges LB-Medium (Miller Becton-Dickinson, USA) überführt. Diese *E. coli*-Minikulturen wurden über Nacht auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Danach wurden diese in 400 ml flüssiges LB-Medium überführt und nochmals über Nacht bei 37 °C kultiviert (Maxikulturen).

2.2.1.5 Plasmid-Aufreinigung

Die Plasmid-Aufreinigung aus den Minikulturen der *E. coli*-Bakterien erfolgte mittels *GeneJet-Plasmid-Miniprep*-Kit (Fermentas, USA). Detaillierte Informationen sind in der Benutzeranleitung für das *GeneJet-Plasmid-Miniprep*-Kit zu finden.

Die Plasmid-Aufreinigung aus den Maxikulturen der *E. coli*-Bakterien wurde mittels *NucleoBond-Xtra-Maxi*-Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) durchgeführt. Das Protokoll ist analog zu dem des *GeneJet-Plasmid-Miniprep*-Kits (Fermentas, USA), nur mit der Ausnahme, dass die DNA nach der Elution nochmals mit Isopropanol präzipitiert, getrocknet und in Tris-HCl-Puffer resuspendiert wurde. Für detaillierte Informationen steht die Benutzeranleitung des *NucleoBond-Xtra-Maxi*-Kits zur Verfügung

2.2.1.6 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Mit der spezifischen Restriktion der Plasmid-DNA und der anschließenden Auftrennung der verdauten Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese konnte das in das Plasmid klonierte Opsingen nachgewiesen werden. Der analytische Restriktionsverdau erfolgte mit 2 µl aufgereinigter Plasmid-DNA (400 ng). Zu einem Probenvolumen von 20 µl wurden 2 µl 10 x Puffer (New England Biolabs und Fermentas,

2 MATERIALIEN UND METHODEN

USA), 0,2 µl 100 x BSA-Lösung (Sigma-Aldrich) und 0,5 µl Restriktionsenzym (New England Biolabs, USA) gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 – 15 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

Der präparative Restriktionsverdau der Plasmid- und Fragment-DNA erfolgte mit 3 – 4 µg aufgereinigter Plasmid-DNA in einem Probenvolumen von 300 µl. Zu dieser Probe wurden 30 µl 10 x Puffer, 3 µl 100 x BSA und 5 µl Restriktionsenzym gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C wurde der Restriktionsansatz dephosphoryliert.

2.2.1.7 Dephosphorylierung der verdauten Plasmid-DNA

Als Vorbereitung der Ligation wurde die verdaute Plasmid-DNA am 5'-Ende der DNA dephosphoryliert. Dies erfolgte durch die Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase (5 Units (Roche)) zu den 30 µl der Probe. Anschließend wurde 10 µl 10 x Puffer (New England Biolabs, USA) dazugegeben und mit deionisiertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 37 °C wurde der komplette Ansatz über ein einprozentiges Agarosegel aufgetrennt und die Plasmid-DNA aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.2.1.8 Isolierung und Reinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Die Isolierung und Reinigung der DNA-Fragmente, die für weitere Schritte genutzt werden sollen, erfolgte mit Hilfe des *GeneJET-Gel-Extraction-Kits* (Fermentas, USA). Dazu wurden die Fragmente des restringierten Plasmids mittels Agarosegelelektrophorese getrennt und das entsprechende DNA-Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Für weitere Informationen steht die Benutzeranleitung des *GeneJET-Gel-Extraction-Kits* zur Verfügung.

2.2.1.9 Ligation des kompletten Opsingens oder Teile dessen in den pMT4-Vektor

Zur Ligation des aufgereinigten Opsin-DNA-Fragments in den pMT4-Vektor wurde das *Quick-Ligation-Kit* (New England Biolabs, USA) verwendet. Hierzu wurden 50 ng Plasmid-DNA mit dreifach molarem Überschuss an Opsin-DNA-Fragment in 10 µl deionisiertem Wasser verdünnt und 10 µl 2 x *Quick-Ligation-Reaction-Puffer* dazugegeben. Mit der Zugabe von 1 µl *Quick-T4-DNA-Ligase* wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur konnte der Ligationsansatz für die Transformation in *E. coli* weiterverwendet werden. Die detaillierten Informationen sind in der Benutzeranleitung des *Quick-Ligation-Kits* zu finden.

2.2.1.10 Kultivierung der COS-1 Zellen

Die COS-1 Zellen wurden in Rollerflaschen mit einer Oberfläche von 850 cm² unter 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte bei 37 °C kultiviert. Nach drei Tagen der Kultivierung in 250 ml DMEM-Medium (Gibco Invitrogen, USA) mit 1 % L-Glutamin (Gibco Invitrogen, USA), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco Invitrogen, USA) und 10 % FCS (fötales Kälberserum (Gibco Invitrogen, USA)) und bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen auf neue mediumbefüllte Rollerflaschen aufgeteilt. Die Aufteilung erfolgte so, dass sich ~21 000 Zellen pro cm² Rollerflaschenoberfläche in frischem Medium befanden.

2.2.1.11 Transfektion der COS-1 Zellen

Die Transfektion der COS-1 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden wurde mittels DEAE-Dextran-Methode durchgeführt (Schenborn und Goiffon 2000). Für diese Transfektion wurde 150 µg Plasmid-DNA pro Rollerflasche verwendet. Zuerst wurde der Transfektionsansatz in einem separaten, sterilen Gefäß hergestellt. Dazu wurden 48 ml DMEM-Medium (Gibco Invitrogen, USA) ohne FCS (fötales Kälberserum, Gibco Invitrogen, USA) mit 6 ml 1 M Tris-HCl-Lösung und 6 ml DEAE-Dextran (2,5 mg/ml DEAE in DMEM (Sigma-Aldrich)) gemischt. Anschließend wurden die 150 µg DNA dazugegeben. Diese insgesamt 60 ml Transfektionsansatz wurden auf 37 °C vorgewärmt. Nachdem das alte Medium entfernt wurde und die Zellen mikroskopisch überprüft wurden, konnte der vorgewärmte Transfektionsansatz auf die adhärennten COS-1 Zellen gegeben werden. Nach einer fünfstündigen Inkubation wurde der Transfektionsansatz verworfen und 10 µM Chloroquin (Sigma-Aldrich) in 75 ml Vollmedium (DMEM, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS) auf die Zellen gegeben. Nach nochmaliger Inkubation für 1 ½ Stunden im Brutschrank bei 37 °C wurde der Chloroquin-Ansatz abgegossen und die transfizierten COS-1 Zellen zweimal mit PBS (Gibco Invitrogen, USA) gewaschen. Nachdem 250 ml Vollmedium zu den Zellen gegeben wurde, wurden diese für drei Tage im Inkubator kultiviert. Die Prozedur der Transfektion wurde durch Oprian *et al.* (1987) beschrieben und durch Meyer *et al.* (2000) modifiziert.

2.2.1.12 Ernte der transfizierten COS-1 Zellen

Zum Ernten der COS-1 Zellen wurde das alte Medium entfernt, die transfizierten Zellen zweimal mit PBS (Gibco Invitrogen, USA) gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich) in PBS inkubiert. Nachdem die adhärennten Zellen in Suspension gebracht wurden, wurde eine halbe Tablette *Complete*TM-Proteaseinhibitor (Roche) in 5 ml PBS gelöst und zu den COS-1 Zellen in die Suspension gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50 ml Falcon-

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Röhrchen überführt und für zwei Minuten bei 1800 x g zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 15 ml PBS resuspendiert.

2.2.1.13 Rekonstitution von COS-1 Zellen (Nur für die Rhodopsinproben)

Da die COS-1 Zellen nur das Opsin exprimierten (ohne den Retinalliganden), mussten die Zellen für die Untersuchung am Rhodopsin und dessen Mutanten mit 11-*cis*-Retinal bzw. mit 11-*cis*-PrSB (*n*-Propylamin (Sigma-Aldrich) ist über eine Schiff'sche Base mit dem Retinal verknüpft) rekonstituiert werden. Zur Rekonstitution der Opsinmoleküle wurde ein dreifacher Überschuss an 11-*cis*-Retinal bzw. 11-*cis*-PrSB verwendet. Da das Retinal lichtempfindlich ist, musste es bei Rotlicht zugegeben werden. Die Inkubation des Rekonstitutionsansatzes erfolgte über Nacht bei 4 °C im Dunkeln. Die Weiterverarbeitung der rekonstituierten Rhodopsinmoleküle musste ab diesem Zeitpunkt bei Rotlicht durchgeführt werden.

2.2.1.14 Herstellung des 1D4-Immuno-Affinitätsgels

Das 1D4-Immuno-Affinitätsgel diente der Aufreinigung des exprimierten Opsins und Rhodopsins in Detergenz. Bei der Herstellung des 1D4-Immuno-Affinitätsgels wurde der monoklonale rho-1D4-Antikörper ((Molday und MacKenzie 1983), The University of British Columbia, Vancouver, Canada) kovalent an eine CNBr-aktivierte Sepharose™-4-*Fast-Flow* (Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) gebunden (Verfahren modifiziert nach Oprian *et al.* (1987)).

Vor der Kopplung des rho-1D4-Antikörpers an die CNBr-aktivierte Sepharose™-4-*Fast-Flow*-Trägermatrix musste diese fünfmal mit 1 mM HCl gewaschen werden (50 ml Volumen; Zentrifugation: 30 s, 1800 x g). Bevor die Antikörperlösung auf die Sepharose gegeben werden konnte, musste diese einmal mit dem Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3) gewaschen werden. Nach der Zentrifugation (30 s, 1800 x g) wurde der Überstand verworfen und 80 mg rho-1D4-Antikörper, gelöst in 40 ml Kopplungspuffer, auf 3 g CNBr-aktivierte Sepharose™-4-*Fast-Flow* gegeben. Nach einer Inkubation von 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur wurde das mit dem Antikörper gekoppelte Gel zweimal gewaschen. Nachdem der Überstand des letzten Zentrifugationsschritts verworfen wurde, wurden 40 ml des 100 mM Tris-HCl-Puffers (pH 8,3) auf das Gel gegeben und zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde das 1D4-Immuno-Affinitätsgel fünfmal abwechselnd mit Acetat-Puffer (100 mM Na-Acetat, 500 mM NaCl, pH 4) und Tris-HCl-Puffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, pH 6,8) gewaschen. Da das 1D4-Immuno-Affinitätsgel in BTP-Puffer (20 mM BTP (Sigma-Aldrich), 130 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 6,8) verwendet werden sollte, wurde es zweimal in diesem Puffer gewaschen. Anschließend wurde das 1D4-Immuno-

Affinitätsgel im Verhältnis 1:1 mit dem gleichen BTP-Puffer aufgefüllt und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die Ermittlung der Kopplungseffizienz erfolgte durch die Messung der Proteinkonzentration in der Kopplungslösung vor und nach der Verknüpfung des Antikörpers mit der Sepharoseträgermatrix. Die Bindungskapazität wurde durch die Zugabe einer spezifischen Menge an nativem Rhodopsin in Detergenz zu einer definierten Menge an 1D4-Immuno-Affinitätsgel bestimmt. Nach der anschließenden Affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde aus der Menge des aufgereinigten Rhodopsins die Bindungskapazität berechnet.

2.2.1.15 Aufreinigung des Pigments

Die Aufreinigung der Pigmente erfolgte durch die spezifische Bindung des C-Terminus der Opsin- oder Rhodopsinmoleküle an den an die Sepharoseträgermatrix gekoppelten 1D4-Antikörper (Oprian *et al.* 1987). Um die Opsin- und Rhodopsinmoleküle aufzureinigen zu können, wurden diese in einprozentigem DDM (*n*-Dodecyl- β -D-Maltosid (Biomol, Deutschland)) solubilisiert. Dazu wurde die entsprechende Menge an zehnprozentigem DDM direkt zur Zellsuspension gegeben und drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension drei Minuten bei 1800 x g zentrifugiert und der Überstand auf das vorbereitete 1D4-Immuno-Affinitätsgel in die Säule gegeben. Die Menge des verwendeten Gels ist abhängig von dessen Bindungskapazität (Bindungskapazität: 0,7 – 1 μ g Rhodopsin / μ l Gel). Die Bindung der Opsin- oder Rhodopsinmoleküle an den Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der gesamte Ansatz in eine 5 ml Zentrifugationssäule (Thermo Scientific, USA) überführt und 30 s bei 500 x g zentrifugiert. Das 1D4-Immuno-Affinitätsgel mit gebundenem Pigment wurde zweimal mit PBS (Gibco Invitrogen, USA) und einmal mit 10 mM BTP (pH 6) (Sigma-Aldrich) gewaschen, bevor 500 – 800 μ l des Elutionspuffers in die am Ausfluss geschlossenen Säulen gegeben wurde. Der Elutionspuffer (10 mM BTP, 0,03 % DDM, pH 6) enthielt 100 μ M des Rhodopsin-1D4-Peptids (331 DEASTTVSKTETSQVAPA 348 , Dr. Petra Henklein, Charité, Deutschland), welches aus den letzten 18 C-terminalen Aminosäuren des Rhodopsins bestand. Nach einer 5 – 7-stündigen Inkubation der geschlossenen Säule bei 4 °C wurden die Säule am Ausfluss wieder geöffnet und der Durchfluss mit dem Pigment aufgefangen. Die Elutionsprozedur wurde zweimal wiederholt, um die komplette Menge an Pigment vom Antikörper lösen zu können. Nach der spektroskopischen Bestimmung der Konzentration des Opsins (λ_{max} 280 nm, $\epsilon_{280\text{nm}} = 81\,200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Surya *et al.* 1995) oder Rhodopsins (λ_{max} 500 nm, $\epsilon_{500\text{nm}} = 40\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Surya *et al.* 1995) wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -40 °C gelagert. Im Fall einer zu niedrigen

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Opsin- oder Rhodopsinkonzentration wurden die drei Elutionen einer Probe vereint und mittels Centricon YM-30 (Merck Millipore, Deutschland) aufkonzentriert.

Das Wachsen und Ernten der COS-1 Zellen, die Rekonstitution der COS-1 Zellmembranen und die Aufreinigung des Pigments basieren auf einer Prozedur, die durch Meyer *et al.* (2000) beschrieben wurde.

2.2.1.16 Klonierungsstrategie

Schritt der Klonierungsprozedur	Verwendete Methode
---------------------------------	--------------------

-
- | | |
|-----|---|
| 1. | Polymerase-Kettenreaktion |
| 2. | DpnI-Restriktionsverdau |
| 3. | Transformation des modifizierten Vektors in kompetente <i>E. coli</i> -Bakterien |
| 4. | Kultivierung der <i>E. coli</i> -Bakterien auf LB-Agar-Platten und in Minikulturen |
| 5. | Plasmidaufreinigung aus den Minikulturen |
| 6. | Sequenzierung des Opsingens |
| 7. | Restriktion des Plasmids (Ausschneiden des Opsingens) |
| 8. | Isolierung des Opsin-DNA-Fragments mittels Agarosegel und Exzision der entsprechenden Bande aus dem Gel |
| 9. | Dephosphorylierung des Opsin-DNA-Fragments |
| 10. | Ligation des Opsin-DNA-Fragments in einen neuen pMT3-Vektor |
| 11. | erneute Transformation in <i>E. coli</i> -Bakterien |
| 12. | Kultivierung der <i>E. coli</i> -Bakterien auf LB-Agar-Platten in Mini- und Maxikulturen |
| 13. | Plasmidaufreinigung aus Minikulturen und Sequenzierung |
| 14. | Plasmidaufreinigung aus Maxikulturen |
| 15. | Transfektion von COS-1 Zellen |
| 16. | Kultivierung von COS-1 Zellen |
| 17. | Präparation von COS-1 Zellen |
| 18. | Rekonstitution von COS-1 Zellen (Nur für die Rhodopsinproben) |
| 19. | Aufreinigung des Pigments (Opsin oder Rhodopsin) |

2.2.2 Gewinnung der Proben aus den Stäbchenzellen boviner Retinae

2.2.2.1 Präparation gereinigter Diskmembranen

Die Retinae wurden aus den Augen geschlachteter Rinder extrahiert. Dazu mussten diese Augen durch einen Schnitt in die Cornea geöffnet und Linse und Glaskörper entfernt werden. Die lose aufliegende Retina konnte durch Umstülpen des Auges vom hinteren Teil des Bulbus, durch Zusammenschieben in Richtung des *Nervus opticus* und anschließendem Abschneiden entfernt werden. Danach wurden die Retinae in einer 45 %igen Saccharoselösung (1 ml / Retina, Puffer (40 mM K_2HPO_4 , 26 mM KH_2PO_4 , 1 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 mM Glucose), pH 7) bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Der nächste Schritt der Präparationsprozedur ist die Aufreinigung der Stäbchenaußensegmente (*Rod Outer Segment*, ROS) nach einer Methode von Papermaster (1982). Das zweiminütige Schütteln der aufgetauten Retinae führte dazu, dass das verbindende Zilium zwischen Außen- und Innensegment der Stäbchenzelle brach. Die anschließende Zentrifugation ($2500 \times g$, 5 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$) und das Filtrieren des Überstandes durch eine Baumwollgaze (Porengröße: $100\text{ }\mu\text{m}$) trennte das Außensegment von den restlichen Zellbestandteilen. Nach einer erneuten Zentrifugation ($9000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$) des Filtrats wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einer 45 %igen Saccharoselösung in Puffer (40 mM K_2HPO_4 , 26 mM KH_2PO_4 , 1 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 mM Glucose), pH 7) resuspendiert. Diese Suspension wurde dann auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten ($\rho = 1,11\text{ g/cm}^3$; $1,13\text{ g/cm}^3$; $1,15\text{ g/cm}^3$) aufgetragen und zentrifugiert ($15\ 000 \times g$, 20 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$). Die ROS, welche zwischen der oberen und mittleren Schicht des Dichtegradienten zu finden waren, wurden abgesaugt und mit Puffer (40 mM K_2HPO_4 , 26 mM KH_2PO_4 , 1 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 10 mM Glucose), pH 7) durch Zentrifugation ($4500 \times g$, 7 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$) gewaschen. Die Ausbeute an Rhodopsin in den ROS betrug 50 – 80 mg / 100 Retinae. Das Pellet konnte mit 1 – 2 ml Überstand bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden oder zur Gewinnung der gereinigten Diskmembranen (WMs, *Washed Membranes*) weiterverarbeitet werden.

Der letzte Schritt dieser Präparationsprozedur war die Extraktion der gereinigten Diskmembranen aus den ROS. Die Extraktion erfolgte im Dunkeln durch Resuspension der ROS in hypotonischem Puffer (5 mM PIPES (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1 mM DTT (Sigma-Aldrich), pH 7). Die peripheren Membranproteine dissoziierten unter diesen Bedingungen von der Diskmembran (Kühn 1982). Das

2 MATERIALIEN UND METHODEN

membranintegrale Rhodopsin blieb dagegen in den Diskmembranen und konnte mit diesen abzentrifugiert (35 000 x g, 20 min, 4 °C) werden. Anschließend wurde das Pellet durch wiederholte Resuspension in hypotonischem Puffer (5 mM PIPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7) und Zentrifugation gewaschen. Dies sicherte das weitere Ablösen membrangebundener Proteine. Abschließend wurde das Pellet in isotonischem Puffer (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5) resuspendiert und bei -40 °C gelagert. Die gereinigten Diskmembranen enthielten neben den Lipiden der Membran fast ausschließlich Rhodopsin. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte UV/Vis-spektroskopisch bei λ_{max} 500 nm.

2.2.2.2 Präparation des Apoproteins Opsin

Die gereinigten Diskmembranen (WMs, *Washed Membranes*) wurden in isotonischem Puffer (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 7,5) resuspendiert und mittels Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurden die WMs in Anwesenheit von 25 mM Hydroxylamin (Sigma-Aldrich) belichtet. Die Belichtung in Anwesenheit von Hydroxylamin führte zur Aktivierung des Rezeptors und zu dessen sofortigem Zerfall in Opsin und *all-trans*-Retinaloxim. Das störende *all-trans*-Retinaloxim wurde in Anwesenheit von BSA (Sigma-Aldrich) durch drei- bis viermalige Zentrifugation (48 000 x g, 30 min) und Resuspension des WM-Pellets entfernt. Ein Absorptionsspektrum gibt Aufschluss über den Retinaloximgehalt in den Opsinmembranen (Retinaloxim, λ_{max} 360 nm) und damit darüber, wie häufig der Waschschrift wiederholt werden musste.

2.2.2.3 Präparation des G-Proteins Transducin

Die Aufreinigung der Transducinuntereinheiten (G_t α und G_t $\beta\gamma$) erfolgte in zwei Schritten. Als erstes wurde das G_t-Holoenzym aus den Stäbchenaußensegmenten extrahiert (Heck und Hofmann 1993, Kühn *et al.* 1981), und anschließend erfolgte die Trennung der G_t-Untereinheiten (Heck und Hofmann 2001).

Für die Präparation des G_t-Proteins wurden Stäbchenaußensegmente, die aus 200 – 300 Retinae gewonnen wurden, in isotonischem BTP-Puffer A (20 mM BTP, 120 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 6,9) resuspendiert (4 mg Rhodopsin / ml), homogenisiert (Glas/Glas-Homogenisator) und anschließend zentrifugiert (37 000 x g, 20 Minuten, 4 °C). Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor das Pellet in hypotonischem BTP-Puffer B (5 mM BTP, 5 mM DTT, pH 6,9) resuspendiert werden konnte. Die Endkonzentration betrug nach dem Resuspendieren 1 mg Rhodopsin / ml. Danach wurde MgCl₂ zur Suspension gegeben (Endkonzentration: 5 mM) und 10 Minuten bei 4 °C mit orangefarbenem Licht

($\lambda > 480$ nm, Schott GG495) bestrahlt. Die Belichtung der Probe führte zur Bindung des G_t -Proteins an die aktive Rezeptorkonformation Meta II und konnte dadurch mit dem membranintegralen Meta II durch Zentrifugation (90 000 x g, 30 Minuten, 4 °C) von den löslichen und zuvor membranassoziierten Proteinen getrennt werden. Das Pellet wurde erneut in hypotonischem BTP-Puffer B resuspendiert, damit anschließend 150 μ M GTP (Sigma-Aldrich) und 50 μ M $MgCl_2$ dazu gegeben werden konnten. Das GTP sorgte für eine Dissoziation des gesamten G_t -Proteins von der Diskmembran. Nach anschließender Zentrifugation (90 000 x g, 30 Minuten, 4 °C) befanden sich die G_t -Proteinuntereinheiten ($G_{t\alpha}$ und $G_{t\beta\gamma}$) im Überstand. Zur Steigerung der Ausbeute wurde das Pellet nochmals in hypotonischem BTP-Puffer B mit GTP und $MgCl_2$ resuspendiert und zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und mit einer Ultrazentrifugationszelle (Centricon YM 10, Merck Millipore, Deutschland) im Volumen verringert. Während die G_t -Proteinprobe aufkonzentriert wurde, wurde diese zweimal mit BTP-Puffer B und BTP-Puffer C (10 mM BTP, 100 mM NaCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7,5) gewaschen, um die freien Nukleotide aus der Lösung zu entfernen. Durch eine abschließende Ultrazentrifugation (190 000 x g, 30 Minuten, 4 °C) wurden restliche Membranbestandteile vom Transducin getrennt.

Die G_t -Untereinheiten mussten mittels Affinitätschromatographie getrennt werden. Dies geschah mit einer FPLC-Anlage (*Fast Performance Liquid Chromatography*, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland), in der die *Blue*-Sepharose (*HiTrap-Blue*-Sepharose, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland; 1 ml Bettvolumen, 1,2 ml / h Flussrate) das Transducin assoziieren konnte. Die Elution der beiden G_t -Untereinheiten erfolgte durch BTP-Puffer D (20 mM BTP, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, pH 7,5) mit steigender Konzentration an NaCl. Eine Konzentration von 0 – 0,3 M NaCl führte zur Elution der $G_{t\beta\gamma}$ -Untereinheit. Eine Konzentration von 1 M NaCl im BTP-Puffer D ermöglichte die abschließende Elution der $G_{t\alpha}$ -Untereinheit.

Die anschließende Dialyse (Dialyseschlauch: Durchlässigkeit bis 12,4 kDa, Sigma-Aldrich) der separierten Transducin-Untereinheiten gegen BTP-Puffer E (20 mM BTP, 1 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, pH 7,5) sorgte für eine Verminderung der hohen Konzentration an NaCl.

Die G_t -Proteinfraktionen wurden aufkonzentriert, aliquotiert und abschließend bei -40 °C in BTP-Puffer F (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7,1) gelagert. Die Methode der Aufreinigung der Transducin- $\alpha/\beta\gamma$ -Untereinheiten aus bovinen Retinae erfolgte nach einem Protokoll von Heck und Hofmann (1993). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode.

2.2.3 Erzeugung von Metarhodopsin III

Metarhodopsin III resultiert aus der *anti*→*syn*-Isomerisierung der Retinyliden-Schiff'schen Base-Bindung zwischen dem all-*trans*-Retinal und dem Lys296 des Opsinmoleküls. Meta III kann spontan aus Meta I (Vogel *et al.* 2003, Vogel *et al.* 2004) oder durch blaues Licht aus Meta II (Ritter *et al.* 2004) gebildet werden.

Zur Erzeugung von Meta III wurden gereinigte Diskmembranen mit 50 µM Rhodopsin verwendet (Heck *et al.* 2003a). Diese Suspension wurde kurz mit Ultraschall behandelt, um eine homogene Membranlösung zu erhalten. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 N HCl auf pH 5,7 eingestellt, um das Gleichgewicht nach der Belichtung auf die Bildung der aktiven Rezeptorkonformation Meta II zu verschieben. Dadurch wurde der Anteil an Isorhodopsin (Opsin mit gebundenem 9-*cis*-Retinal) minimiert. Unmittelbar nach der Belichtung (10 s, $\lambda > 480$ nm Schott GG495) wurde die Probe mit 1 N NaOH auf pH 8 eingestellt. Dadurch entstand eine neue Gleichgewichtsreaktion zwischen Meta I und Meta II mit Schwerpunkt auf der Seite des Meta I. Während der einstündigen Inkubation der Probe bei 20 °C entstand durch thermische Umwandlung bis zu 40 % Meta III. Das restliche Rhodopsin war zu Opsin und all-*trans*-Retinal zerfallen. Die anschließende Lagerung bei 4 °C ermöglichte eine Nutzung des Meta III über einen ganzen Tag hinweg. Dies war möglich, da der Zerfall von Meta III eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 460$ Stunden bei 0 °C hat (Zimmermann *et al.* 2004). Die Quantifizierung des Meta III erfolgte durch die CT α -Peptid-induzierte Abnahme der Absorption bei 470 nm unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{470\text{nm}} = 40\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kolesnikov *et al.* 2003).

2.3 Allgemeine Detektionsmethoden

2.3.1 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrometers bestimmt. Durch dieses Spektrometer war es möglich, die Konzentration von 1 µl unverdünnter DNA-Probe (2 – 3700 ng / µl doppelsträngige DNA; Minipräparationen: 200 – 500 ng / µl; Gigapräparationen: 1000 – 1400 ng / µl) ohne Küvette oder Kapillare ermitteln zu können. Die DNA-Lösung wurde auf die untere optische Oberfläche pipettiert. Durch das Schließen des oberen Gerätearms wurde die obere optische Oberfläche auf den DNA-Tropfen gedrückt. Durch das anschließende Einstellen der Passierlänge des Lichtstrahls wurde der Tropfen auseinandergezogen, ohne dass er reißen konnte. Das Aussenden des Messlichts und die Messung der

Absorption der DNA bei 260 nm und 280 nm wurden mittels optischleitfähiger Kabel gewährleistet. Für weitere Instruktionen kann in der Bedienungsanleitung der Firma Thermo Scientific nachgeschlagen werden.

2.3.2 DNA-Sequenzierung

2 µg Plasmid-DNA wurden zur Kontrolle durch die Firma BigDye-Terminator-Chemie (Dr. Martin Meixner, Raum 347 Genetik, Chausseestraße 117, 10115 Berlin) sequenziert. Die Sequenzierung des Opsingens im pMT4-Vektor erfolgte über T7- oder SP6-Promotor-Oligonukleotide binden.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für alle Gelelektrophoresen wurden einprozentige Agarose-Minigele verwendet (1 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer). Die Minigele enthielten pro 100 ml Agarosegel 2 µl Ethidiumbromid. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer in die Apparatur gefüllt. Die angelegte Spannung betrug 100 V.

Zur analytischen Kontrolle der DNA wurden jeweils 3 µl aus dem PCR-Ansatz mit 2 µl Ladepuffer und 3 µl RNase/DNase freiem Wasser verdünnt. Für die präparative Gelelektrophorese wurden bis zu 100 µl aus dem Dephosphorylierungsansatz in die Geltaschen gegeben.

2.4 Methoden zur funktionalen Charakterisierung von Opsin und Rhodopsin sowie deren Mutanten

2.4.1 Absorptionsspektroskopie

Ein Teil der Untersuchungen von Rhodopsin und seinen Meta-Spezies konnte durch die Absorptionsspektroskopie gewährleistet werden, da diese Pigmente charakteristische Spektren besitzen. Rhodopsin besitzt ein Absorptionsspektrum, das mit einem Maximum bei 280 nm die Absorption des Proteins selbst widerspiegelt, und mit einem Maximum bei 500 nm die protonierte Schiff'sche Base-Bindung im unbelichteten Rhodopsin zwischen 11-*cis*-Retinal und dem Lys296 des Moleküls darstellt. Nach Belichtung des Rhodopsins verschiebt sich die Absorption von 500 nm zu 380 nm. Dieses Spektrum ist charakteristisch für Meta II. Opsin besitzt nur ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, Meta I und Meta III absorbieren neben 280 nm auch bei 470 nm und Isorhodopsin (9-*cis*-Retinyliden-Opsin), was zu einem kleinen

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Teil bei jeder Belichtung des Rhodopsin entsteht, besitzt ein zusätzliches Maximum bei 490 nm.

Durch die bekannten Extinktionskoeffizienten bei 500 nm ($\epsilon = 40\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Wald und Brown 1953) und bei 280 nm ($\epsilon = 81\,200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Surya *et al.* 1995) konnten sowohl die Konzentration des Pigments als auch die Quantität der Besetzung des Pigments mit seinem Liganden 11-*cis*-Retinal bestimmt werden (optimales Verhältnis von 280 nm zu 500 nm ist 1,7).

Alle Spektren wurden mit dem Varian Cary 50 UV/Vis-Spektrometer (Auflösung: 2 nm) detektiert. Die Zeit für die Aufnahme eines Spektrums (270 nm bis 600 nm) betrug 30 s. Alle Messungen wurden mit einem Probenvolumen von 90 μl bei 20 °C durchgeführt. Alle Belichtungen des Rhodopsins und dessen Mutanten dauerten 15 s und wurden mit einer Kaltlichtquelle mit Langpassfilter ($\lambda > 480\text{ nm}$, Schott GG495) durchgeführt.

2.4.1.1 Regenerationsmessung mittels Absorptionsspektroskopie

Die Verschiebung der maximalen Absorption des 11-*cis*-Retinals (380 nm) auf die maximale Absorption der protonierten Schiff'schen Base im Rhodopsin (500 nm) beschreibt die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch das Opsinmolekül und die anschließende Bildung der protonierten Schiff'schen Base. Die Untersuchung der Regeneration des Rhodopsins basiert auf der Zunahme der Absorption bei 500 nm nach Zugabe des 11-*cis*-Retinals (1 μM) zum Opsinansatz (0,5 μM) in der Küvette (Hellma Analytics, Deutschland). Die Konzentrationen der Reaktionspartner wurden für die Messung der Regeneration aller Opsinmutanten eingesetzt, außer es wird anders beschrieben. Die Zunahme der Absorption bei 500 nm konnte nur mit einer zeitlichen Auflösung von 30 s gemessen werden, da die Aufnahme eines Absorptionsspektrums diese Zeit in Anspruch nahm. Zur Untersuchung der Regenerationsgeschwindigkeit wurde die Absorption bei 500 nm über die Zeit aufgetragen und mittels bimolekularer Reaktionskinetik ausgewertet. Für die Untersuchungen wurde 10 mM BTP-Puffer G (0,03 % DDM, pH 6) verwendet. Die Temperatur lag bei 20 °C, mit Ausnahme der Untersuchung der K296G-Mutante, welche aufgrund einer schnelleren Regeneration bei 10 °C gemessen wurde.

2.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessung basiert auf der Absorption von Licht einer definierten Wellenlänge (295 nm) durch Fluorophore in Biomolekülen. Diese Fluorophore sind zum Beispiel Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten (Phenylalanin, Tyrosin und

Tryptophan), die das absorbierte Licht emittieren können (Tryptophan emittiert zum Beispiel Licht mit einer Wellenlänge von 330 nm.). Das Opsinmolekül besitzt fünf Tryptophanseitenketten (Trp35, Trp126, Trp161, Trp175 und Trp265), welche das Fluoreszenzsignal dieses Moleküls dominieren. Im inaktiven Rhodopsinzustand ist die Intensität der emittierten Fluoreszenz deutlich geringer als im Opsinzustand (Farrens und Khorana 1995). Dies beruht auf der fluoreszenzlöschenden Wirkung des β -Iononrings vom 11-*cis*-Retinal. Die Energieübertragung von den Fluorophoren auf das Löschermolekül (*Quencher*: 11-*cis*-Retinal) erfolgt strahlungslos. Den Hauptanteil der Fluoreszenz von Rhodopsin und Opsin trägt das Trp265, welches mit seiner aromatischen Seitenkette parallel zum β -Iononring des 11-*cis*-Retinals im Rhodopsin ausgerichtet ist (Okada *et al.* 2004). Die Fluoreszenzmessung ermöglicht somit die Untersuchung der Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch das Opsinmolekül und des Zerfalls des aktivierten Rezeptors (Meta II) zu Opsin und all-*trans*-Retinal. Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden im SPEX Fluorolog 2 Spektrofluorometer durchgeführt, das mit einer 450 W Xenon-Bogenlampe bestückt ist.

2.4.2.1 Meta II-Zerfallsmessung mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung des zeitabhängigen Anstiegs des Fluoreszenzsignals nach Belichtung des Rhodopsins korreliert mit dem zeitlichen Verlauf des Zerfalls von Meta II (Farrens und Khorana 1995, Heck *et al.* 2003a). Der monoexponentielle Anstieg der Fluoreszenz beschreibt die Freisetzung des isomerisierten all-*trans*-Retinals. Erst nachdem die Schiff'schen Base hydrolysiert ist und all-*trans*-Retinal das Opsinmolekül verlassen hat, ist die maximale Emission des Trp265 im Opsin bei einer Wellenlänge von 330 nm messbar. Konformationsänderungen des Proteins oder eine Umlagerung des Retinals innerhalb des Proteins können aber schon vor der Hydrolysereaktion die Emission der Fluoreszenz des Trp265 beeinflussen.

Die Untersuchung des Meta II-Zerfalls der Rhodopsinmutanten wurde in 10 mM BTP-Puffer G (0,03 % DDM, pH 6), bei 20 °C durchgeführt, mit Ausnahme der K296G-Mutante, die bei 10 °C gemessen wurde. Die verwendeten Konzentrationen (0,5 μ M Rhodopsin oder Opsin) und Volumina (90 μ l) entsprachen denen der UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen. Die Messung der Konzentrationen erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie. Die Zugabe weiterer Reagenzien vor oder während der Messung erfolgte direkt in die Messküvette (Hellma Analytics, Deutschland). Zur Lichtaktivierung des Rhodopsins und seiner Mutanten wurden die Proben 15 s mit orangefarbenem Licht einer faseroptischen Kaltlichtquelle ($\lambda > 480$ nm, Schott GG495) belichtet. Die Tryptophanfluoreszenzemission bei 330 nm wurde in 2 s- oder 30 s-

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Intervallen für 2 – 3 Stunden aufgenommen. Um die Isomerisierung des Retinals durch das Messlicht zu verhindern, wurde dessen Zugang zwischen den Aufnahmeintervallen geschlossen. Die Schlitzweite für das Anregungslicht betrug 0,1 nm und die für das Emissionslicht 4 nm.

2.4.2.2 G_t -Proteinaktivierungsmessungen mittels Fluoreszenzspektroskopie

Die Messung der G_t -Proteinaktivierung wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Diese Messung basiert auf der Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz der $G_{t\alpha}$ -Untereinheit nach dem durch Meta II katalysierten Austausch von GDP durch GTP. Da nach dem Nukleotidaustausch das GTP wieder hydrolysieren würde, wurde ein nicht hydrolysierbares GTP-Analogon verwendet ($GTP\gamma S$, Roche). Die Prozedur der Messung wurde bereits in der Literatur beschrieben (Fahmy und Sakmar 1993, Meyer *et al.* 2000), musste aber den Messbedingungen dieser Arbeit angepasst werden.

Die Messungen der G_t -Proteinaktivierung wurden unter folgenden Pufferbedingungen durchgeführt: 20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.01 % DDM, und 1 mM DTT, pH6 oder pH7. Die 750 μ l Probenvolumen enthielten 2,5 nM Rhodopsin oder 2,5 – 25 nM Opsin, 0,6 μ M $G_{t\alpha}$, 0,6 μ M $G_{t\beta\gamma}$ und 25 mM $GTP\gamma S$. Die Experimente wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Transducingfluoreszenz wurde bei λ_{em} 340 nm (λ_{ex} 300 nm) mit einer Integrationszeit von 1 s und einer Schlitzgröße für das Anregungslicht von 1 nm und für das Emissionslicht von 4 nm aufgenommen. Zur Messung der G_t -Proteinaktivierung durch Meta II wurde das $GTP\gamma S$ vor der Messung zum Reaktionsansatz gegeben und die Reaktion mit Licht einer faseroptischen Kaltlichtquelle ($\lambda > 480$ nm, Schott GG495) gestartet. Zur Messung der basalen G_t -Proteinaktivierung durch Opsin wurde die Reaktion der G_t -Proteinaktivierung mit $GTP\gamma S$ gestartet.

2.5 Datenanalyse

Der Meta II-Zerfall wird in folgender Gleichung vereinfacht dargestellt:



In dieser Gleichung repräsentiert P das Meta II, A das Opsin, B das all-*trans*-Retinal, und k definiert die Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall des Meta II zu Opsin und all-*trans*-Retinal.

Der Zeitverlauf der lichtinduzierten Fluoreszenzänderung während des Meta II-Zerfalls ($A(t)$) konnte mit einer einfachen monoexponentiellen Funktion beschrieben werden (Gl. 2.2):

$$A(t) = A_{tot} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (\text{Gl. 2.2})$$

In dieser Gleichung repräsentiert A die Tryptophanfluoreszenz des Opsins, A_{tot} beinhaltet die Tryptophanfluoreszenz der gesamten Menge an Opsin, und k definiert die Geschwindigkeitskonstante des Anstiegs der Tryptophanfluoreszenz während des Reaktionsverlaufs (Hydrolyse und Abgabe des *all-trans*-Retinals). Aufgrund dessen, dass die Isomerisierung des Liganden 11-*cis*-Retinal zu *all-trans*-Retinal sehr schnell verläuft, kann dieser Prozess vernachlässigt werden.

Die Aufnahme von 11-*cis*-Retinal durch das Opsin und die daraus resultierende Bildung des Rhodopsins kann durch die Gleichung 2.3 vereinfacht beschrieben werden:



In dieser Gleichung steht A für Opsin, B für 11-*cis*-Retinal, P für Rhodopsin, und k repräsentiert die Geschwindigkeitskonstante der Retinyliden-Schiff'schen Base-Bildung, welche durch die Absorption bei λ_{max} (Rhodopsin $\lambda_{max} = 500 \text{ nm}$) detektiert werden konnte. Diese Reaktion folgt einem bimolekularen Verlauf und wird durch die folgende Gleichung (Gl. 2.4) repräsentiert:

$$P(t) = \frac{A_0 B_0 (1 - e^{-k(A_0 - B_0)t})}{A_0 - B_0 (e^{-k(A_0 - B_0)t})} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

In dieser Gleichung repräsentiert $P(t)$ den Anstieg der Absorption bei λ_{max} (Bildung des Rhodopsins), A_0 und B_0 spiegeln die Menge an Opsin und 11-*cis*-Retinal zu Beginn der Messung wider, und k beschreibt die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante der Rhodopsinregeneration.

Zur Untersuchung der Affinität des Opsins für *all-trans*-Retinal bzw. CT α -Peptid wurde folgendes Reaktionsschema angenommen:



Dieses Reaktionsschema beschreibt die Aufnahme von *all-trans*-Retinal (C) und die Bindung des CT α -Peptids (B) durch das Opsin (A). P steht für den Komplex aus Opsin, CT α -Peptid und *all-trans*-Retinal. K_1 beschreibt die Assoziation von Opsin und CT α -Peptid, und K_2 definiert die Aufnahme von *all-trans*-Retinal durch Opsin. Der

2 MATERIALIEN UND METHODEN

Faktor α beschreibt den Effekt der Bindung des all-*trans*-Retinals auf die Bindung des CT α -Peptids und umgekehrt.

Das Maß der Affinität des Opsins für sein Substrat (all-*trans*-Retinal, CT α -Peptid) bei einem im Überschuss gegebenen Reaktionspartner kann mit einem hyperbolischen Zusammenhang beschrieben werden. Für die Untersuchung der Assoziation von CT α -Peptid und Opsin muss all-*trans*-Retinal in Sättigung vorliegen, und für die Bindung von all-*trans*-Retinal an das Opsinmolekül muss CT α -Peptid im Überschuss vorhanden sein. Unter diesen Bedingungen kann folgende Gleichung zur Beschreibung der Reaktion verwendet werden:

$$P([S]) = \frac{P_{\max} \cdot [S]}{K_d + [S]} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

In dieser Gleichung beschreibt P die Menge an gebildetem Opsin-CT α -Peptid-all-*trans*-Retinal-Komplex in Abhängigkeit von der Konzentration an S (CT α -Peptid oder all-*trans*-Retinal). P_{\max} definiert die maximale Bindung von CT α -Peptid oder all-*trans*-Retinal an das Opsin unter sättigenden Bedingungen des jeweils anderen Reaktionspartners, und K_d beschreibt die Gleichgewichtskonstante, welche K_1 oder K_2 im Schema 2.1 entspricht.

Die hyperbolische Funktion zur Bestimmung der Affinität eines Reaktionspartners zu Opsin ist nur dann richtig, wenn die erwartete Gleichgewichtskonstante K_d nicht im Bereich der Konzentration des eingesetzten Opsins liegt. Ist das der Fall, dann muss die Gleichung 2.6 zur Analyse der Bindungseigenschaften eingesetzt werden. Diese Gleichung (Gl. 2.6) basiert auf dem Reaktionsschema aus Gleichung 2.3, berücksichtigt aber die Verarmung beider Reaktionspartner bei der Bildung des Produkts (Heck und Hofmann 1993).

$$P([B]) = \frac{(K_d + [A] + [B]) - \sqrt{(K_d + [A] + [B])^2 - (4 \cdot [A] \cdot [B])}}{2} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

In dieser Gleichung entspricht P dem Opsin-all-*trans*-Retinal-Komplex, B steht für das all-*trans*-Retinal, und A beschreibt die Konzentration an Opsin, die maximal gebunden wird. Die Gleichgewichtskonstante K_d definiert die Affinität des all-*trans*-Retinals zu Opsin.

2.6 Geräte

Gerät	Modell (Hersteller, Land)
• Agarosegel-Laufapparatur	HE33 (Amersham, GE Healthcare, GB)
• HPLC (analytisch)	Shimadzu UFLC (LC-20AD, CTO-10ASvp, CBM-20A/20-lite, SPD-M20A) (Shimadzu, Japan)
• HPLC (präparativ)	Beckmann, System Gold (USA)
• FPLC (präparativ)	Fast Performance Liquid Chromatography (Amersham Pharmacia Biotech, GB)
• Fluoreszenzspektrometer	SPEX, 1680 Fluorolog II (Horiba, USA)
• Kaltlichtquelle	LQ1600 (Fiberoptics-Heim, Schweiz)
• Nanodrop	ND1000 (Thermo Scientific, USA)
• PCR-Thermocycler	FlexCycler (Analytik Jena, Deutschland)
• Tisch-Zentrifuge	Eppendorf, Modell 5417C / 5415D / 5415C (Deutschland)
• Ultraschallbad	Bandelin Sonorex TK20 (Bandelin Electronics, Deutschland)
• UV/Vis Spektrometer	Cary 50 Bio (Varian, Australien)
• Zentrifuge	Biofuge 28RS (Heraeus Instruments, Deutschland)
• Zentrifuge	Biofuge 15R (Heraeus Instruments, Deutschland)
• Zentrifuge	Centra CL2 (International Equipment Company, USA)
• Zentrifuge	Rotorfix 32A (Hettich Zentrifugen, Deutschland)

3 ERGEBNISSE

In diesem Kapitel wird gezeigt, wie Hydroxylamin und seine alkylierten Derivate der Charakterisierung biochemischer und struktureller Eigenschaften des Rhodopsins dienen, wie die Kanalmutationen auf die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden durch das Opsinmolekül wirken und wie all-*trans*-Retinal reversibel durch aktives Opsin aufgenommen wird.

Die Untersuchung der Interaktion des Retinalliganden mit Opsin erfolgte mit spektroskopischen Methoden. Die UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopischen Methoden ermöglichen es, die Kinetik der Aufnahme und Abgabe des Retinals durch das Opsinmolekül untersuchen zu können. Bei der UV/Vis-Spektroskopie wurde die Eigenschaft des Rhodopsins genutzt, definierte Wellenlängen des UV- und sichtbaren Lichts zu absorbieren. Diese Detektionsmethode ermöglicht die Unterscheidung des lichtsensitiven Rhodopsins (λ_{max} 500 nm und 280 nm) von Meta II (λ_{max} 280 nm und 382 nm) und Opsin (λ_{max} 280 nm) (siehe Abschnitt 2.3.3.1). Die Fluoreszenzspektroskopie basiert auf der Auslöschung der Fluoreszenz des Trp265 durch den β -Ionenring des Schiff'sche Base-gebundenen 11-*cis*-Retinals, die nach Aktivierung des Rhodopsin und dessen Zerfall zu Opsin und all-*trans*-Retinal wieder aufgehoben wird (siehe Abschnitt 2.3.3.2) (Farrens und Khorana 1995).

Wie die meisten Untersuchungen an Rhodopsin in der Vergangenheit, wurden in dieser Arbeit die Untersuchungen mit Hydroxylamin in gewaschenen Diskmembranen (WMs) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1), wohingegen die Untersuchungen der Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden in Detergenzlösung erfolgten (siehe Abschnitt 3.2 und 3.3). Die Untersuchung in Detergenzlösung hat den Vorteil, dass ausschließlich die Interaktion von Rezeptor und Ligand untersucht werden kann und keine Nebeneffekte durch die Interaktion des Retinalliganden mit der Diskmembran auftreten (z.B.: Bildung von Schiff'schen Basen mit Phospholipiden).

3.1 Hydroxylamin und seine alkylierten Derivate als Mittel zur Charakterisierung biochemischer und struktureller Eigenschaften in Rhodopsin

Die Untersuchung der Rhodopsinaktivierung und des Meta II-Zerfalls wird durch die hohe Reaktivität des Retinals beeinträchtigt. Die Bildung der nichtspezifischen Schiff'schen Basen des Retinals sowohl mit den Phospholipiden als

3 ERGEBNISSE

auch mit den cytoplasmatisch ausgerichteten Lysinresten werden bei physiologischem pH-Wert im Absorptionsbereich von 440 nm gemessen. In diesem Bereich absorbieren auch einige Metarhodopsinspezies (z.B. Meta I, 478 nm und Meta III, 470 nm) (Kolesnikov *et al.* 2003, Matthews *et al.* 1963), was zu einer Missinterpretation der Absorptionsspektren führen kann.

Der Zerfall der aktiven Rezeptorspezies Meta II erfolgt über die Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base. Dazu gelangt exogenes Wasser in das Meta II, welches die Spaltung der Retinyliden-Schiff'schen Base-Bindung ermöglicht (Janz und Farrens 2004, Jastrzebska *et al.* 2011). Die Zugänglichkeit des Meta II für kleine Moleküle wie Wasser, Hydroxylamin und Borhydrid ist bekannt (Bownds und Wald 1965, Janz und Farrens 2004, Jastrzebska *et al.* 2011), aber die Beschreibung des Kanals für ihre Aufnahme ist bis heute unvollständig.

Das starke Nucleophil Hydroxylamin (HA) wird seit langem genutzt, um die Retinyliden-Schiff'sche Base in Meta II schnell zu spalten und um Retinal zu Retinaloxim umzuwandeln. Die alkylierten Hydroxylaminderivate *o*-Methyl-Hydroxylamin (MHA) und *o*-Ethyl-Hydroxylamin (EHA) wurden dagegen bisher nur zur HPLC-Analyse der Retinale verwendet (Buczylko *et al.* 1996, Rattner *et al.* 2000, van Kuijk *et al.* 1985).

In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, wie die alkylierten Hydroxylaminderivate zur Aufklärung einiger offener Aspekte des Wasserkanals beitragen könnten und wie das HA/*t*-BHA-System als Werkzeug zur Unterscheidung von Meta II, Meta III und Opsin *in situ* und vielleicht auch *in vivo* dienen könnte.

3.1.1 Einfluss von Hydroxylamin und seiner alkylierten Derivate auf die peripheren Retinyliden-Schiff'schen Basen

Die exogene Zugabe von *all-trans*-Retinal (2 μ M) zu Opsin (1 μ M) in aufgereinigten und isolierten Diskmembranen (λ_{\max} 280 nm) führte zu einem Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 380 nm, welches freiem *all-trans*-Retinal zugeordnet werden konnte. Die Zunahme der Absorption bei ca. 460 nm konnte durch die Reaktion von Retinal mit Phospholipiden und/oder Proteinkomponenten der Membran erklärt werden. Diese Reaktion spiegelte die Bildung peripherer, protonierter Schiff'sche Basen (SBH⁺) wider und zeigte nach 5 min keine Änderungen mehr. Durch den zweifachen Überschuss an *all-trans*-Retinal sowie durch die Abnahme der Absorption bei 380 nm war die Absorption der SBH⁺ (λ_{\max} 440 nm) mit λ_{\max} 460 nm rotverschoben (Abb. 3.1a). Die anschließende Zugabe von 25 mM HA, MHA, EHA oder *t*-BHA eliminierte bei 20 °C innerhalb von 30 s nahezu die

gesamte SBH⁺-Absorption und zeigte die charakteristische Retinaloximabsorption bei 360 nm (Abb. 3.1b, c, d und e). Die Zugabe von 25 mM CMHA führte, im Gegensatz zu den anderen Hydroxylaminverbindungen, zu einer deutlich langsameren Umwandlung der SBH⁺ zu *o*-Carboxy-Methyl-Retinaloxim ($t_{1/2} = 1$ min) (Abb. 3.1f). Das könnte mit der Carboxylgruppe im CMHA zusammenhängen, die der Aminogruppe die Elektronen entzieht, wodurch die Verbindung weniger nukleophil ist.

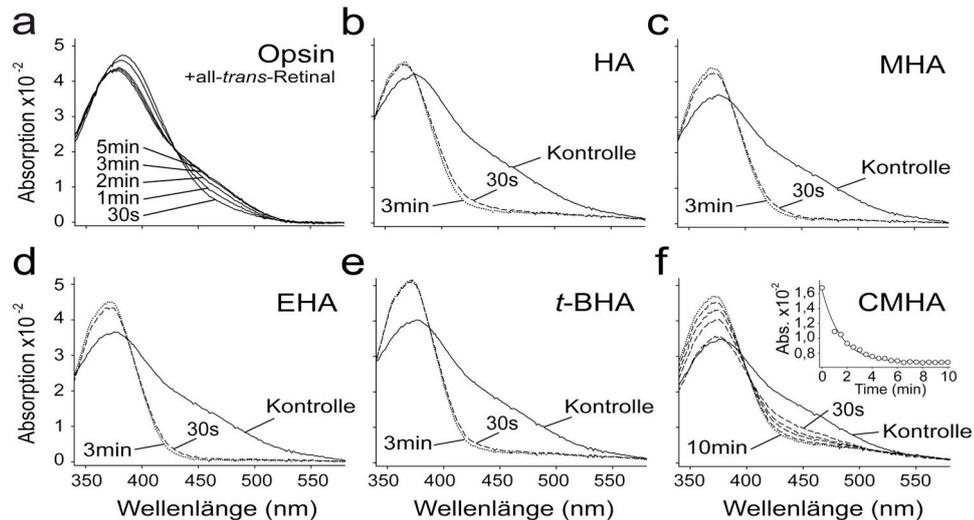


Abbildung 3.1: Reaktionen von HA und seinen Derivaten mit peripheren Schiff'schen Basen. (a) Zu 1 μ M Opsin in Membranen wurden 2 μ M all-*trans*-Retinal gegeben. Die Bildung der peripheren Schiff'schen Basen konnte durch die Zunahme des 460 nm Peaks und die Abnahme des 380 nm Peaks über die Zeit verfolgt werden. (b) Durch die Zugabe von 25 mM HA zum Opsin/all-*trans*-Retinal-Gemisch (durchgezogene Linie) wurde die Absorption bei 460 nm innerhalb von Sekunden eliminiert und resultierte in einem 360 nm Peak (gestrichelte Linie). Die Kontrolle nach 3 min (gepunktete Linie) zeigte keine weiteren Änderungen im Spektrum. (c), (d) und (e) Analog zu (b) führte die Zugabe der alkylierten Hydroxylaminderivate MHA, EHA oder *t*-BHA ebenfalls zu einer schnellen Elimination der Absorption bei 460 nm. (f) Die Zugabe von CMHA zum Opsin/all-*trans*-Retinal-Gemisch führte ebenso zu einer Abnahme der Absorption bei 460 nm, die aber viel langsamer als bei den anderen HA-Verbindungen erfolgte. *Eingefügte Darstellung*: zeitliche Abnahme der Absorption bei 460 nm nach Zugabe von CMHA. Messbedingungen: BTP-Puffer (pH 7,5), 130 mM NaCl und 1 mM MgCl₂ bei 20 °C.

3.1.2 Absorptionseigenschaften von Rhodopsin und Meta II in Anwesenheit der alkylierten Hydroxylaminderivate

Die charakteristischen Absorptionsspektren von Rhodopsin und dessen lichtaktivierter Form Meta II in gereinigten und isolierten Diskmembranen zeigten ein Absorptionsmaximum für Rhodopsin bei einer Wellenlänge von 500 nm und für Meta II von 382 nm (Abb. 3.2). Durch die Reaktion des Retinals mit Hydroxylamin (HA) oder mit dessen Derivaten entstand Retinaloxim, welches ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 360 nm darstellte (Abb. 3.2) und sich somit in Übereinstimmung mit der Literatur befand (Garwin und Saari 2000, Groenendijk *et al.* 1979).

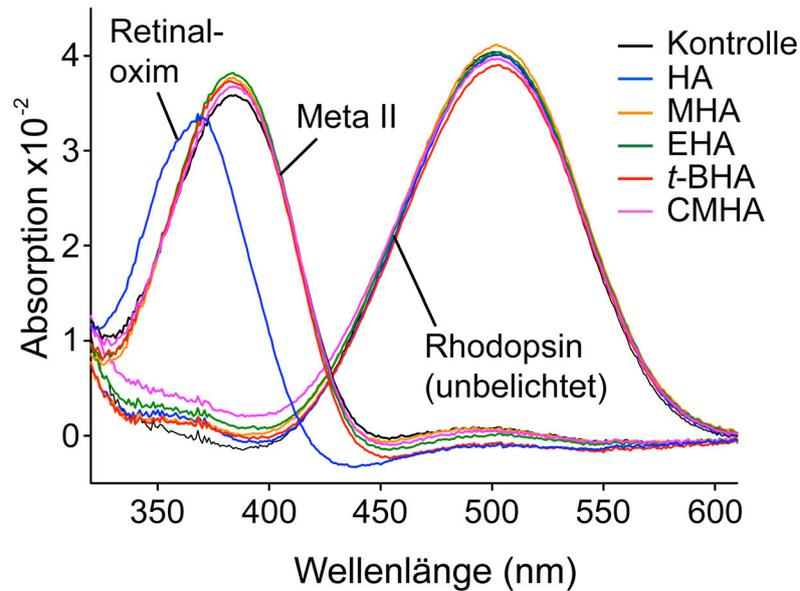


Abbildung 3.2: Einfluss von HA und seiner Derivate auf die Absorptionseigenschaften von Rhodopsin und Meta II. Absorptionsspektren von gewaschenen Diskmembranen mit 1 μ M Rhodopsin wurden ohne (schwarz) und mit 25 mM HA (blau), MHA (orangefarben), EHA (grün), *t*-BHA (rot) oder CMHA (magenta) aufgenommen. Die Belichtung von Rhodopsin in Abwesenheit von HA führte zu einem charakteristischen Meta II-Absorptionsspektrum (λ_{\max} 380 nm). Die Anwesenheit von MHA, EHA, *t*-BHA und CMHA zeigte keinen Effekt auf die Meta II-Bildung. Die Belichtung von Rhodopsin in Anwesenheit von HA zeigte dagegen sofort ein Spektrum mit λ_{\max} 360 nm, welches der Bildung von Retinaloxim zugeordnet werden konnte. Die Absorptionsspektren wurden, wie in den Methoden beschrieben, aufgenommen (BTP-Puffer (pH 7,5), 130 mM NaCl und 1 mM $MgCl_2$ bei 20°C). Rhodopsin wurde in Anwesenheit von 300 μ M CT α -Peptid belichtet, um die Meta I-Bildung zu minimieren.

Das Absorptionsspektrum des inaktiven unbelichteten Rhodopsins (1 μ M) blieb in Anwesenheit von 25 mM HA, MHA, EHA, *t*-BHA oder CMHA bei 20 °C unverändert (Abb. 3.2). Nach der fünfminütigen Inkubation der Rhodopsinprobe mit HA oder einem seiner Derivate wurde diese belichtet. Die lichtinduzierte Aktivierung des Rezeptors führte innerhalb der apparativen Zeitkonstante (30 s) zur Bildung von Meta II. In Anwesenheit von MHA, EHA, *t*-BHA oder CMHA zeigten die Spektren die für Meta II charakteristische Absorption bei 382 nm, was nahelegte, dass die modifizierten Hydroxylaminverbindungen die Bildung von Meta II nicht beeinflussten (Abb. 3.2). Im Gegensatz dazu führte die Anwesenheit von HA nach der Belichtung von Rhodopsin sofort zur Bildung von Retinaloxim (λ_{\max} 360 nm).

3.1.3 Meta II-Zerfall in Anwesenheit der alkylierten Hydroxylamin-derivate

Der Meta II-Zerfall wurde anhand der Zunahme der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Opsinmoleküls gemessen (Farrens und Khorana 1995). Die Fluoreszenzmessung der gewaschenen Diskmembranen mit 1 μ M Rhodopsin ergab in

Abwesenheit von HA eine Zerfallsrate von $1,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 7,2 \text{ min}$) (Abb. 3.3; Kontrolle), was mit der Literatur übereinstimmt (Heck *et al.* 2003a).

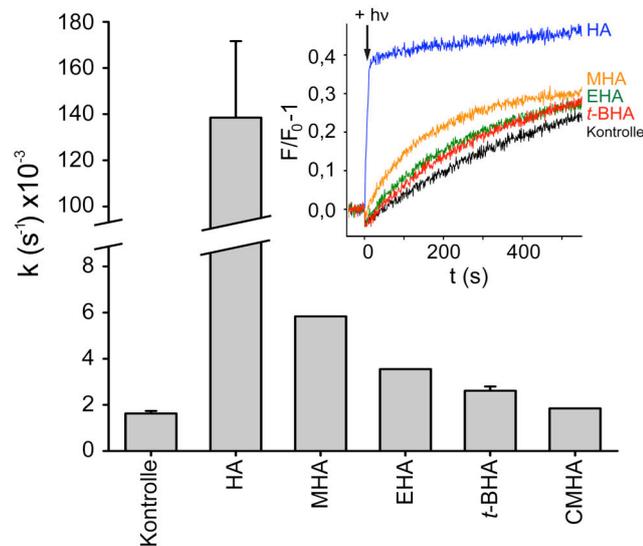


Abbildung 3.3: Einfluss von HA und seiner Derivate auf den Zerfall von Meta II. Gewaschene Diskmembranen mit $1 \mu\text{M}$ Rhodopsin wurden ohne (schwarz) oder mit 25 mM HA (blau), MHA (orangefarben), EHA (grün) oder *t*-BHA (rot) belichtet (Pfeil, $h\nu = 10 \text{ s}$). Die Abgabe des all-*trans*-Retinals durch das lichtaktivierte Rhodopsin (Meta II) wurde mittels Tryptophanfluoreszenz detektiert (eingefügte Darstellung). Die Reaktionsgeschwindigkeiten des Meta II-Zerfalls (Anfangssteigung pro Endamplitude) wurden für die Kontrolle mit $1,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$, $\text{SD} = 0,11 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), für die HA-Messung mit $140 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$, $\text{SD} = 33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), für die MHA-Messung mit $5,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 2$), für die EHA-Messung mit $3,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 2$), für die *t*-BHA-Messung mit $2,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 3$, $\text{SD} = 0,19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) und für die CMHA-Messung mit $1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($n = 2$) ermittelt. Die Fluoreszenzsignale wurden bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ in BTP-Puffer (pH 7,5), 130 mM NaCl und 1 mM MgCl_2 aufgenommen.

Die Anwesenheit von 25 mM MHA, EHA oder *t*-BHA erhöhte die Zerfallsgeschwindigkeit des Meta II um die Faktoren 3,6 (MHA), 2,2 (EHA) und 1,6 (*t*-BHA) nur leicht (Abb. 3.3, MHA, EHA und *t*-BHA). CMHA (25mM) zeigte keine Effekte auf die Rate des Meta II-Zerfalls (Abb. 3.3, CMHA). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Zerfallsrate des Meta II in Anwesenheit von 25 mM HA um nahezu das 90-fache (Abb. 3.3, HA). Die Lichtaktivierung des Rhodopsins in Anwesenheit von HA führte zu einer anfangs starken Erhöhung der Fluoreszenz (0,4-fache relative Änderung), gefolgt von einer sehr viel kleineren Erhöhung dieser (0,08-fache relative Änderung) (Abb. 3.3, eingefügte Grafik, blaue Kurve). Die Ursache für die langsame Komponente des Meta II-Zerfalls in Anwesenheit von HA kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklärt werden. Die etwas geringere Fluoreszenzamplitude in den Proben ohne oder mit den Derivaten des HA (Kontrolle, MHA, EHA, *t*-BHA und CMHA) im Vergleich zur Fluoreszenzmessung des Meta II-Zerfalls in Anwesenheit von HA könnte mit der Bildung von Meta III zu erklären sein (vgl. Abschnitt 3.1.4).

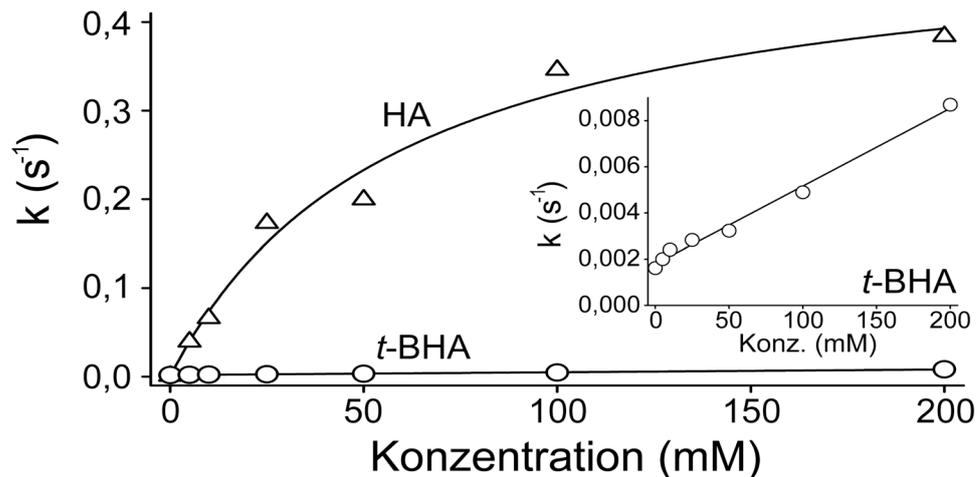


Abbildung 3.4: Einfluss der Konzentrationen von HA und *t*-BHA auf den Zerfall von Meta II. Der Meta II-Zerfall wurde mittels Tryptophanfluoreszenz in Anwesenheit einer steigenden Konzentration von HA oder *t*-BHA gemessen. Die hyperbolische Funktion der HA-Titrationsdaten führte zu einer Sättigungsrate von $0,5 \text{ s}^{-1}$ und einer apparenten Affinität (K_d) von 60 mM. Für die *t*-BHA-Titrationsdaten konnte ein linearer Zusammenhang bestimmt werden. *Eingefügte Grafik:* *t*-BHA-Daten an einer größer skalierten Y-Achse. Die Fluoreszenzsignale wurden bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ in BTP-Puffer (pH 7,5), 130 mM NaCl und 1 mM MgCl_2 aufgenommen.

Die Untersuchung des Meta II-Zerfalls mit steigender Konzentration von HA oder *t*-BHA spiegelte den unterschiedlichen Einfluss dieser Hydroxylamine auf den Meta II-Zerfall wider. In Anwesenheit steigender Konzentrationen von HA erhöhte sich die Meta II-Zerfallsgeschwindigkeit (Abb. 3.4). Der Zusammenhang zwischen der HA-Konzentration und der Zerfallsrate konnte mit einer hyperbolischen Funktion beschrieben werden. Eine Anpassung der Datenpunkte an diese Funktion ergab eine Sättigungsrate des Meta II-Zerfalls von $0,5 \text{ s}^{-1}$ und eine apparente Affinität (K_d) des HA für Meta II von 60 mM (Abb. 3.4). Im Vergleich zu HA hatte *t*-BHA minimale Effekte auf den Meta II-Zerfall. Die Auftragung des Meta II-Zerfalls in Abhängigkeit von der *t*-BHA-Konzentration auf einer größer skalierten Y-Achse ergab einen linearen Zusammenhang (Abb. 3.4, eingefügte Grafik).

3.1.4 Meta III-Stabilität in Anwesenheit von *t*-BHA

Das Photoprodukt Meta III resultiert aus der *anti*→*syn*-Isomerisierung der Retinyliden-Schiff'schen Base und entsteht spontan aus Meta I (Vogel *et al.* 2003, Vogel *et al.* 2004) oder durch blaues Licht aus Meta II (Ritter *et al.* 2004). In gewaschenen Diskmembranen zerfällt Meta III sehr langsam zu Opsin und freiem *all-trans*-Retinal (Heck *et al.* 2003a, Zimmermann *et al.* 2004). In Detergenz solubilisiertes Meta III ($3 \mu\text{M}$ aller Rezeptorspezies, wovon herstellungsbedingt nur 40 % Meta III ist), welches für diese Messungen verwendet wurde, zeigte bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ annähernd die gleiche Zerfallskinetik

wie Meta III in gereinigten Diskmembranen (Abb. 3.5, Kontrolle (▼)). Die Zugabe von 0,5 mM CT α -Peptid (hochaffines Analog des C-terminalen Endes der G α -Untereinheit) führte zu einem Zerfall des in Detergenz solubilisierten Meta III (Abb. 3.5, CT α -Peptid (●)), was bereits für Meta III in Diskmembranen beschrieben wurde (Zimmermann *et al.* 2004). Die Kinetik des Zerfalls von Meta III in Anwesenheit von 25 mM HA zeigte einen ähnlichen monoexponentiellen Reaktionsverlauf ($k = 0,015 \text{ s}^{-1}$) wie in Anwesenheit des CT α -Peptids ($k = 0,019 \text{ s}^{-1}$) (Abb. 3.5, HA (△)). Das Hydroxylaminderivat *t*-BHA (25 mM) konnte den Meta III-Zerfall nicht beschleunigen (Abb. 3.5, *t*-BHA (○)).

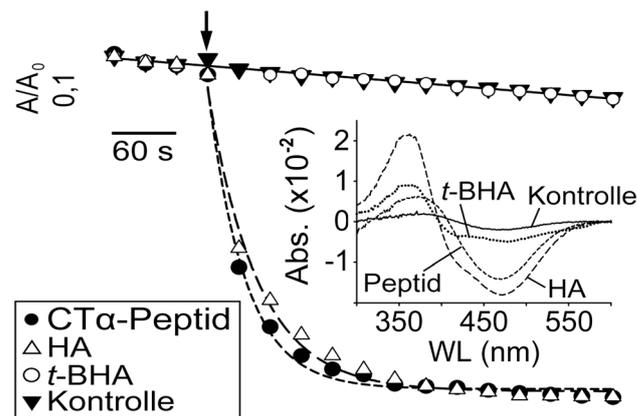


Abbildung 3.5: Einfluss von HA und *t*-BHA auf den Zerfall von Meta III. Die Absorption von Meta III (3 μM Rezeptor), mit Detergenz solubilisiert, wurde bei 470 nm über die Zeit gemessen (▼). Durch die Zugabe von 500 μM CT α -Peptid (●) wurde ein schneller Meta III-Zerfall beobachtet. Die Anwesenheit von 25 mM HA (△) führte zu einem annähernd gleich schnellen Meta III-Zerfall. Beide Datensätze konnten durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden (gestrichelte Linien; $k = 0,019 \text{ s}^{-1}$ in Anwesenheit von CT α -Peptid und $k = 0,015 \text{ s}^{-1}$ in Anwesenheit von HA). Der Zerfall von Meta III in Anwesenheit von *t*-BHA (○) trat mit der gleichen Rate auf wie bei der Kontrolle (▼). Der Pfeil indiziert den Zeitpunkt der Zugabe von CT α -Peptid, HA und *t*-BHA. Die Absorptionsspektren wurden korrigiert, um Verdünnungseffekte zu minimieren. Die eingefügte Graphik zeigt die ermittelten Differenzspektren vor und fünf Minuten nach Zugabe der verschiedenen Reagenzien. Die Differenzspektren sind nicht normiert. Die Absorptionsspektren wurden bei 20 °C in BTP-Puffer (pH 8), 130 mM NaCl, 1 mM MgCl $_2$ und 0,1 % DDM aufgenommen.

Die eingefügte Darstellung in Abbildung 3.5 zeigt die Differenzspektren, die fünf Minuten nach der Zugabe des CT α -Peptids, HA und *t*-BHA aufgenommen wurden. In Anwesenheit des CT α -Peptids war nach fünf Minuten das bei 470 nm absorbierende Meta III vollständig in eine 380 nm absorbierende Meta II-ähnliche Spezies umgewandelt worden (Abb. 3.5, eingefügte Grafik, Peptid) (Ritter *et al.* 2007, Zimmermann *et al.* 2004). Die Anwesenheit von HA führte ebenfalls zur Umwandlung des 470 nm absorbierenden Meta III zum 360 nm absorbierenden Retinaloxim (Abb. 3.5, eingefügte Grafik, HA). Die negative Schulter im Bereich von ca. 440 nm spiegelte den Abbau der peripheren protonierten Retinyliden-Schiff'schen Basen wider (diese

enstanden bei der Herstellung von Meta III). Es konnte kein Einfluss von *t*-BHA auf den langsamen Meta III-Zerfall beobachtet werden, es zeigte sich aber eine Abnahme der Absorption bei ca. 440 nm und eine Zunahme bei 360 nm (Abb. 3.5, eingefügte Grafik, *t*-BHA). Das spiegelt die Umwandlung peripherer protonierter Retinyliden-Schiff'scher Basen in das entsprechende Oxim wider (vgl. Abb. 3.1).

3.2 Der Effekt der Kanalmutationen auf die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden durch das Opsinmolekül

Die computergestützte Identifizierung eines Kanals in der Kristallstruktur des aktivierten Opsins (Hildebrand *et al.* 2009, Park *et al.* 2008, Wang und Duan 2011) ermöglichte eine gezielte Auswahl an Mutationsstellen, um den Kanal biochemisch als Ligandenkanal verifizieren bzw. charakterisieren zu können. Die kinetischen Untersuchungen der Aufnahme und Abgabe des Liganden durch das Opsinmolekül in Kombination mit der ortsgerichteten Mutagenese von ausgewählten Aminosäuren, die entlang des hypothetischen Ligandenkanals lokalisiert sind, sollen weitere Hinweise auf den Mechanismus der Ligandenaufnahme und -abgabe liefern.

Der Vergleich der Kristallstruktur des Meta II mit der des lichtsensitiven Rhodopsins zeigt, dass sich die Retinalbindungstasche im Meta II-Zustand in zwei Richtungen ausdehnt (Abb. 3.6a). Durch die Rotation der Aminosäurereste des Leu40, Tyr43 und Phe293 entsteht zwischen der TM1 und TM7 eine Verbindung zwischen der Retinalbindungstasche und der hydrophoben Diskmembran, die in dieser Arbeit als Öffnung A definiert wurde (Abb. 3.6b). Der Vergleich der Retinalbindungstasche des Meta II- mit der des Rhodopsinzustands zeigt, dass eine Neuausrichtung der Aminosäurereste zueinander stattgefunden hat. Die größten Änderungen in diesem Bereich weist das Tyr268 auf, das als Regulator für die Lys296-Schranke bei der Aufnahme des Retinals dienen könnte (Abb. 3.6b, Abschnitt 1.4.4.3) (Hildebrand *et al.* 2009).

Die zweite Verbindung von Retinalbindungstasche und hydrophober Diskmembran wird zwischen der TM5 und TM6 im Meta II-Zustand sichtbar und wird als Öffnung B bezeichnet (Abb. 3.6b). Die Öffnung B wird zum einen durch eine Rotation der gesamten TM6 und zum anderen durch die Rotation einzelner Aminosäurereste erzeugt. Durch die TM6-Rotation werden die Aminosäurereste Ala272, Phe273 und Phe276 in Richtung Diskmembran bewegt (Abb. 3.6b). Auf der anderen Seite der Öffnung B an der TM5 rotieren die Aminosäurereste Met207 und Phe208 auswärts.

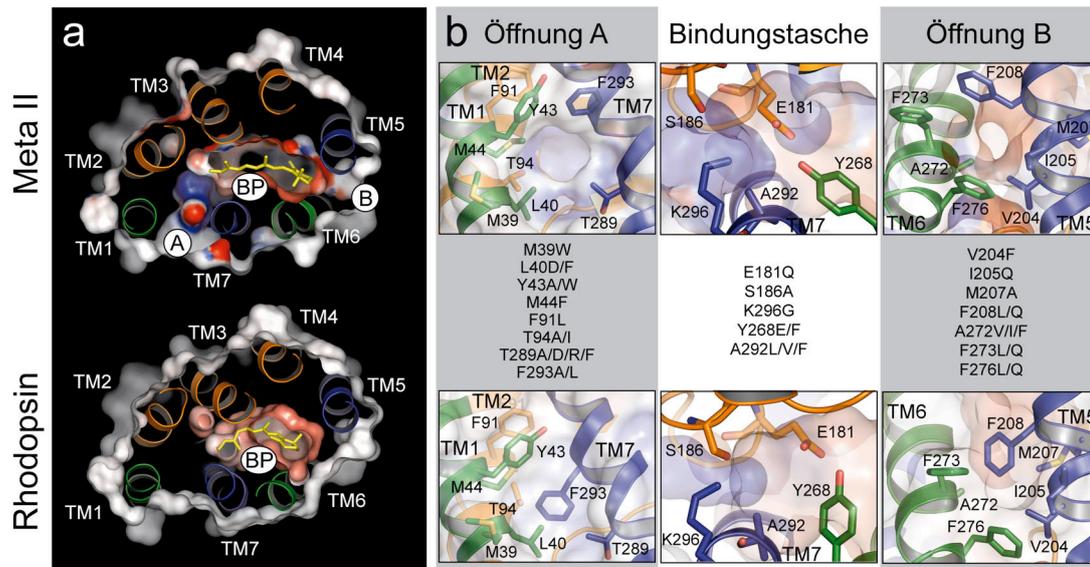


Abbildung 3.6: Vergleich der Strukturen vom aktiven Meta II und inaktiven Rhodopsin und Darstellung der Lage der in dieser Arbeit mutierten Aminosäurereste. (a) Koplanares Schnitt durch Meta II (oben; PDB: 3PXO) und Rhodopsin (unten; PDB: 1U19) aus cytoplasmatischer Sicht. Die Öffnung A (A) zwischen TM1 und TM7, die Bindungstasche (BP) und die Öffnung B (B) zwischen TM5 und TM6 wurden als diese markiert. Die elektrostatischen Oberflächenpotentiale der Strukturen sind mit ± 30 kT/e negativ (rot) und positiv (blau) geladenen Oberflächenarealen konturangepasst. (b) Die Ausschnitte zeigen die Lokalisation der Aminosäurereste, die in dieser Arbeit durch Mutation ausgetauscht wurden. Die Öffnungen A und B sind in der Seitenansicht dargestellt (oben: Cytoplasma) und die Retinalbindungstasche aus cytoplasmatischer Sicht. In der Mitte befinden sich die Mutanten der Aminosäuren, die den jeweiligen Bereichen im Ligandenkanal zugeordnet sind. Abbildungen wurden mit der PyMol-Software (www.pymol.org) erstellt.

In dieser Arbeit wurden die Seitenketten von 20 Aminosäuren an den vier Engstellen in den drei Regionen des Retinalligandenkanals (Öffnung A, B und Bindungstasche) individuell durch Seitenketten ausgetauscht, die sich in der Größe und Polarität von der ursprünglichen Seitenkette unterschieden (Abb. 3.6). Durch diesen Austausch sollten die Öffnungen verkleinert oder erweitert werden, um die Kinetik der Aufnahme und Abgabe des Retinals zu beeinflussen. Dadurch sollte der hypothetische Ligandenkanal bestätigt werden und die Zuordnung der Öffnungen A und B zur Aufnahme bzw. Abgabe des Retinals erfolgen.

3.2.1 Charakterisierung der Rhodopsinmutanten

Die in dieser Arbeit untersuchten 35 Rhodopsinmutanten wurden auf dem Hintergrund einer Mutation konstruiert, die diese auch im ligandenfreien Opsinzustand vor der schnellen Denaturierung in Detergenz schützt. Die Mutation zu Cystein an den Stellen Asn2 und Asp282 führte während der Expression der Mutante zu einer Disulfidbrückenbildung zwischen dem N-Terminus (NT) und der extrazellulären

3 ERGEBNISSE

Peptidschleife 3 (EL3) (Abb. 3.7a). Diese Disulfidbrücke stabilisiert das Opsin und verlangsamt die thermische Denaturierung (Xie *et al.* 2003). Dadurch wird die Untersuchung der Regeneration des Rhodopsins in Detergenzlösung ermöglicht. Die N2C/D282C-Rhodopsinmutante in COS-1 Zellmembranen wurde in früheren FTIR-Studien untersucht (Standfuss *et al.* 2008) und zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp. In dieser Arbeit wurde der Vergleich der N2C/D282C-Rhodopsinmutante mit dem Wildtyp in Detergenz (*N*-Dodecyl- β -D-Maltosid, DDM) mittels Fluoreszenz- und UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt.

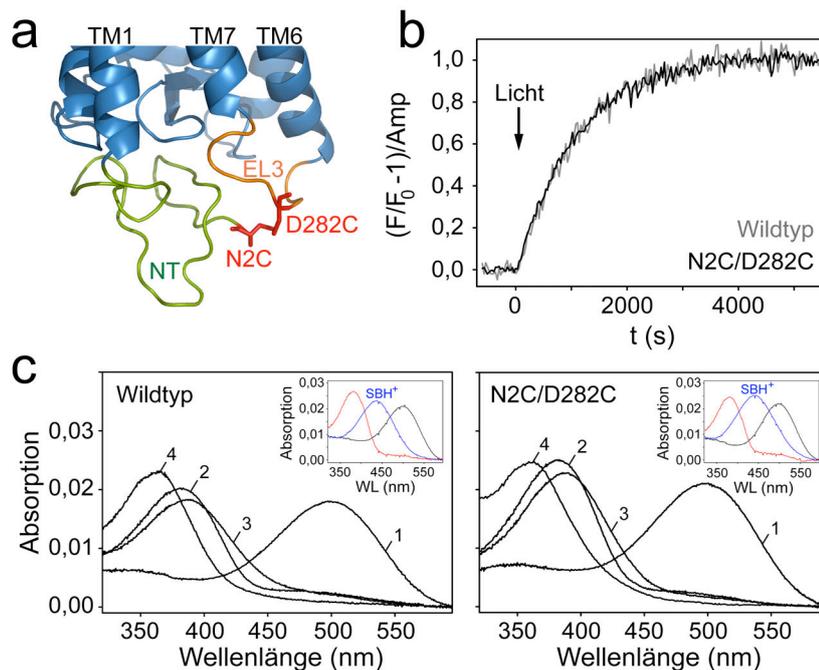


Abbildung 3.7: Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften des Wildtyp- und N2C/D282C-Rhodopsins. (a) Ausschnitt des extrazellulären Bereichs der Kristallstruktur der thermostabilen N2C/D282C-Rhodopsinmutante (PDB: 2Y4J, Standfuss *et al.* (2007)). Die Disulfidbrücke zwischen Cys2 und Cys282 (rot) stabilisiert das Rhodopsin, indem es den N-Terminus (NT, grün) an der extrazellulären Peptidschleife 3 (EL3, orange) fixiert. (b) Fluoreszenzspektroskopische Messung des lichtinduzierten (Pfeil) Meta II-Zerfalls des Wildtyp- und N2C/D282C-Rhodopsins. (c) Darstellung der UV/Vis-spektroskopischen Eigenschaften des Wildtyp- und N2C/D282C-Rhodopsins. Die spektralen Merkmale vor und nach der Belichtung sind wie folgt dargestellt: lichtsensitiver Zustand (Spektrum 1), unmittelbar nach der 15-sekündigen Belichtung (Spektrum 2), nach dem kompletten Zerfall des Meta II-Zustands (Spektrum 3) und unmittelbar nach der folgenden Zugabe von 25 mM Hydroxylamin in Kombination mit einer zweiten Belichtung (Spektrum 4). *Eingefügte Grafiken:* Die Zugabe von 1 N HCl unmittelbar nach der Belichtung des Rhodopsins (schwarzes Spektrum) zerstört das Protein und erzeugt eine protonierte Schiff'sche Base (SBH⁺) (blaues Spektrum). Die Bildung der SBH⁺ wird durch die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 380 nm (Meta II, rotes Spektrum) auf 440 nm (blaues Spektrum) angezeigt. Messbedingungen: 0,5 μ M Rhodopsin (-mutante) in BTP-Puffer (pH 6) und 0,03 % DDM bei 20°C.

Die Untersuchung der Kinetik des lichtinduzierten Meta II-Zerfalls bei der thermostabilen Rhodopsinmutante (N2C/D282C) im Vergleich zum Wildtyp mittels intrinsischer Tryptophanfluoreszenzmessung ergab keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.7b). Die Zerfallsraten beider Rhodopsinspezies (0,5 μ M) folgten einer monoexponentiellen Funktion mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 13,9$ min in DDM.

Der UV/Vis-spektroskopische Vergleich der N2C/D282C-Mutante mit dem Wildtyp zeigte für beide ein Absorptionsmaximum von λ_{\max} 500 nm im lichtsensitiven Rhodopsinzustand (Abb. 3.7c, Spektrum 1). Das Meta II-Spektrum unmittelbar nach 15-sekündiger Belichtung spiegelte für beide Proben das charakteristische Absorptionsmaximum von λ_{\max} 382 nm wider (Abb. 3.7c, Spektrum 2). Das Spektrum des zerfallenen Meta II ergab für beide Proben ein leicht verschobenes Absorptionsmaximum von λ_{\max} 385 nm, welches durch das all-*trans*-Retinal in der 0,03 %igen DDM-Lösung definiert wurde (Abb. 3.7c, Spektrum 3). Die Zugabe von 25 mM Hydroxylamin (HA) in Kombination mit einer zweiten Belichtung ergab ein Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 360 nm (Abb. 3.7c, Spektrum 4), das ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der thermostabilen Rhodopsinmutante aufwies. Die Bildung von Retinaloxim (λ_{\max} 360 nm) durch die Zugabe von HA und die zweite Belichtung diente als Kontrolle für einen vollständigen Zerfall des Rhodopsins und ermöglichte zudem die Konzentrationsbestimmung der Proben bei λ_{\max} 500 nm.

Als einziger Unterschied zwischen der N2C/D282C-Mutante und dem Wildtyp ist die 100-mal höhere Konzentration an HCl-Lösung (1 N) zu nennen, die benötigt wurde, um die N2C/D282C-Mutante zu denaturieren und so die Retinyliden-Schiff'sche Base aus dem Kern des Opsinmoleküls freizusetzen und zu protonieren. Die Zugabe von HCl zur Probe erfolgte unmittelbar nach der Belichtung des lichtsensitiven Rhodopsins (Abb. 3.7c, eingefügte Grafiken, schwarze Spektren) und führte zur Rotverschiebung des Meta II-Absorptionsmaximums (λ_{\max} 382 nm) zu λ_{\max} 440 nm, was der Absorption der protonierten Retinyliden-Schiff'schen Base entspricht (Abb. 3.7c, eingefügte Grafiken, blaue Spektren). Die roten Spektren in den eingefügten Grafiken der Abbildung 3.7c spiegeln die Meta II-Spektren (λ_{\max} 382 nm) unmittelbar nach der Belichtung des Rhodopsin und kurz vor der Zugabe der HCl-Lösung wider. Da die N2C/D282C-Rhodopsinmutante im Methodenspektrum dieser Arbeit keinen Unterschied zum Wildtyp aufwies, wurden die Effekte durch den Austausch der Aminosäureseitenketten innerhalb des Kanals auf dem Hintergrund dieser Mutation gemessen.

Nach jeder Expression und Aufreinigung einer Rhodopsinmutante erfolgte die UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung der Mutante und Bestimmung der Konzentration. Die Abbildungen 3.8a und 3.8b zeigen die UV/Vis-Spektren aller in dieser Arbeit untersuchten Mutanten, die entsprechend ihrer Lokalisation entlang des Kanals angeordnet sind, beginnend von Öffnung A über die Bindungstasche zu

3 ERGEBNISSE

Öffnung B (erste Reihe von links nach rechts, dann zweite Reihe von links nach rechts u.s.w.).

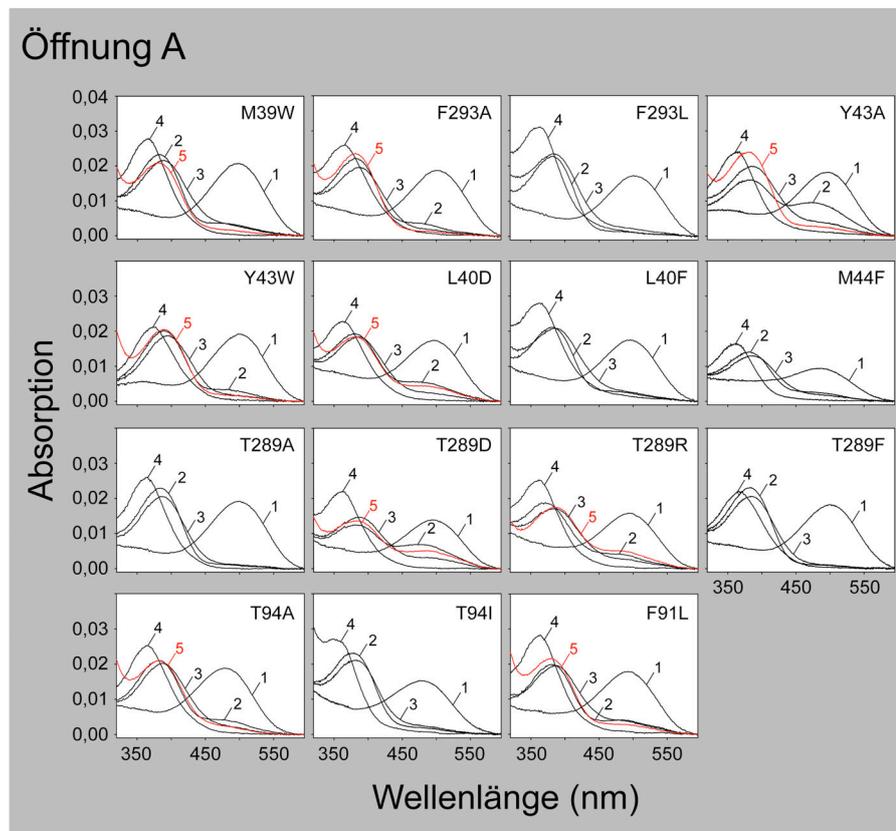
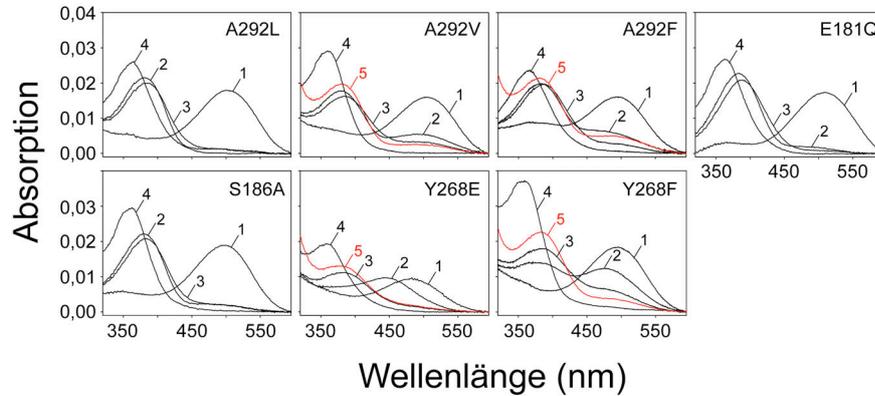


Abbildung 3.8a: UV/Vis-Absorptionsspektren der Mutanten im Bereich der Öffnung A des hypothetischen Retinalligandenkanals. Die spektralen Merkmale jeder Mutante vor und nach der Belichtung sind wie folgt dargestellt: lichtsensitiver Zustand (Spektrum 1), unmittelbar nach der 15-sekündigen Belichtung (Spektrum 2), nach dem kompletten Zerfall des Meta II-Zustandes (Spektrum 3) und unmittelbar nach der Zugabe von 25 mM Hydroxylamin in Kombination mit einer zweiten Belichtung (Spektrum 4). Für ausgewählte Mutanten wird das Spektrum unmittelbar nach einer 15-sekündigen Belichtung in Anwesenheit von 50 μM $\text{CT}\alpha$ -Peptid gezeigt (Spektrum 5, rot). Messbedingungen: 0,5 μM aufgereinigte Rhodopsinmutante in BTP-Puffer (pH 6,0) und 0,03 % DDM.

Bindungstasche



Öffnung B

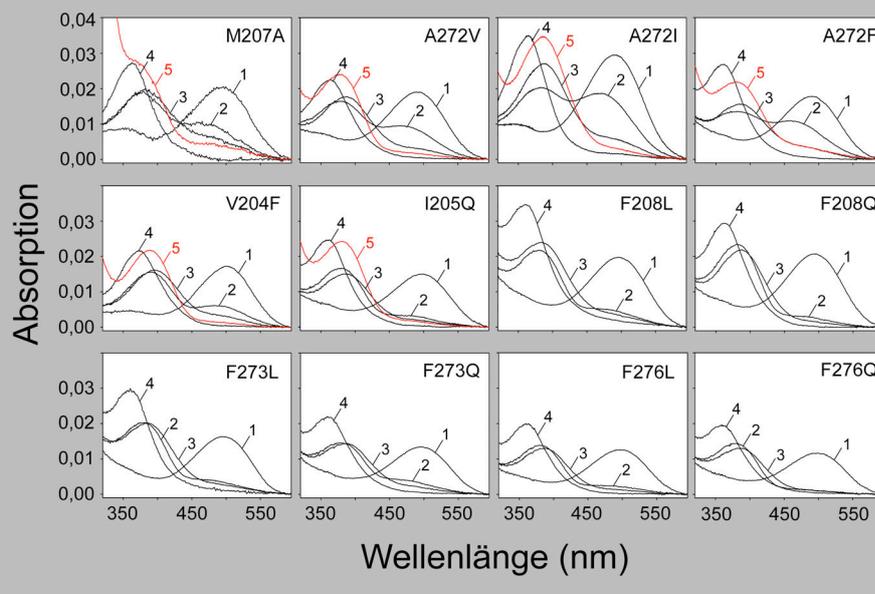


Abbildung 3.8b: UV/Vis-Absorptionsspektren der Mutanten im Bereich der Bindungstasche und der Öffnung B des hypothetischen Retinalligandenkanals. Die spektralen Merkmale jeder Mutante vor und nach der Belichtung sind wie folgt dargestellt: lichtsensitiver Zustand (Spektrum 1), unmittelbar nach der 15-sekündigen Belichtung (Spektrum 2), nach dem kompletten Zerfall des Meta II-Zustandes (Spektrum 3) und unmittelbar nach der Zugabe von 25 mM Hydroxylamin in Kombination mit einer zweiten Belichtung (Spektrum 4). Für ausgewählte Mutanten wird das Spektrum unmittelbar nach einer 15-sekündigen Belichtung in Anwesenheit von 50 μM CTα-Peptid gezeigt (Spektrum 5, rot). Messbedingungen: 0,5 μM aufgereinigte Rhodopsinmutante in BTP-Puffer (pH 6,0) und 0,03 % DDM.

3 ERGEBNISSE

Die Abbildungen 3.8a und 3.8b zeigen die Absorptionsspektren des lichtsensitiven Rhodopsinzustands (Spektrum 1), des Zustands unmittelbar nach der 15-sekündigen Belichtung (Meta I/II/III, Isorhodopsin) (Spektrum 2), des zerfallenen Pigments (Spektrum 3) und des ligandenfreien Opsins in Anwesenheit von Retinaloxim (Spektrum 4) für jede einzelne Mutante. Aus den Absorptionsspektren der Abbildungen 3.8a und 3.8b resultierten die in Abbildung 3.9 dargestellten Daten. Die Absorption der protonierten 11-*cis*-Retinyliden-Schiff'schen Base im N2C/D282C-Kontrollrhodopsin wies ein Maximum bei 500 nm auf (Abb. 3.9a). Die Absorptionsmaxima der Rhodopsinmutanten lagen in einem Wellenlängenbereich von λ_{\max} 475 nm bis 510 nm (Abb. 3.9a). Die Abweichungen der λ_{\max} -Werte der Mutanten von der Kontrolle werden im Allgemeinen mit zunehmender Nähe zur Lys296-Retinyliden-Schiff'schen Base größer (Abb. 3.9a). Die Abweichungen der λ_{\max} -Werte durch eine Mutation der Aminosäurereste könnten allgemein durch einen direkten Effekt auf die Schiff'sche Base-Verknüpfung oder durch die Änderung der Form der Bindungstasche erklärt werden. Die verschobenen λ_{\max} -Werte der Rhodopsinmutanten könnten durch einen zusätzlichen Einfluss der Reste auf das Wassernetzwerk oder durch Ladungsverschiebungen innerhalb der Tasche erklärt werden (A292V/F, E181Q, S186A und Y268E; Abb. 3.9a). Im inneren Bereich der Öffnung B könnten Veränderungen des λ_{\max} -Wertes durch zusätzliche Effekte der Reste auf den β -Iononring des Retinals und somit auf die Lage des gesamten Liganden innerhalb der Bindungstasche erklärbar sein (M207A, A272V/I/F, V204F und F208L/Q; Abb. 3.9a). Rhodopsinmutanten, die keine signifikanten Veränderungen aufwiesen, waren M39W, F293L, L40D, T289A/D/R, Y268F, F273L/Q und F276L/Q (Abb. 3.9a).

Die Berechnung des Absorptionsquotienten der Rhodopsinmutanten bei 280 nm und beim λ_{\max} -Wert ermöglichte die Überprüfung der Qualität der Rhodopsinregeneration in den COS-1 Zellmembranen vor der Aufreinigung des Pigments². Der Quotient aus der Höhe der Absorption des Proteinpeaks (λ_{\max} 280 nm) und des λ_{\max} beim Kontrollrhodopsin (500 nm) ergab einen Wert von 1,7, d.h. er lag nahe dem theoretisch möglichen Wert von 1,6 (Hargrave 1982).

Die Einteilung der Mutanten in vier Gruppen ergab folgendes Bild: Die Mutanten der erste Gruppe zeigten keine Abweichungen vom Quotienten des Kontrollrhodopsins (F293A/L, T289D/F, T94A, A292V, S186A, Y268F, A272V/I, V204F, I205Q, F273L/Q und F276L/Q), die der zweiten Gruppe zeigten mit Quotienten von über 2,2 eine sehr große Abweichung (M44F, Y268E und M207A), wobei die dritte

² Die mutationsbedingte Änderung des Extinktionskoeffizienten kann ebenfalls einen kleinen Einfluss auf den 280 nm / λ_{\max} -Quotienten haben.

Mutantengruppe die gleichen Effekte bei der selben Mutationsstelle (Phe293, Tyr43, Phe208, Phe273 und Phe276) und die vierte Gruppe die verschiedenen Effekte bei der selben Mutationsstelle (Leu40, Thr289, Thr94, Ala292, Tyr268 und Ala272) beschreibt.

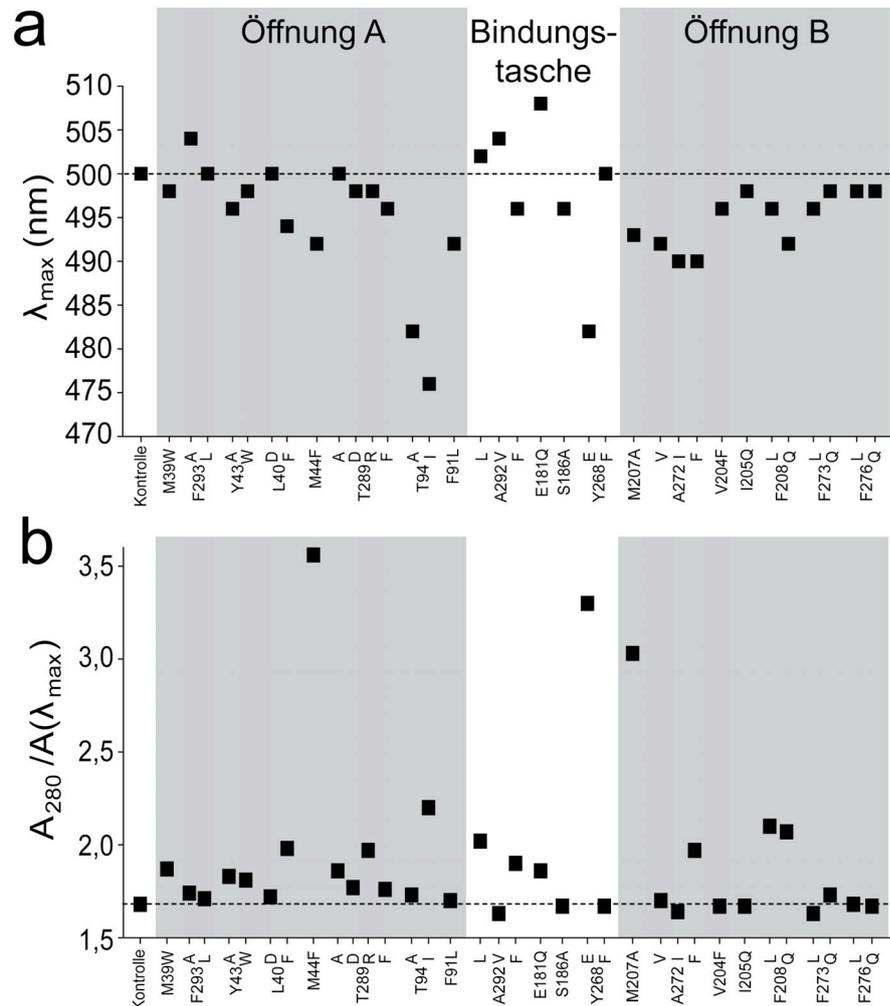


Abbildung 3.9: Spektroskopische Eigenschaften der Rhodopsinmutanten des hypothetischen Retinalligandenkanals. Die Absorptionsmaxima (λ_{\max}) des lichtsensitiven Rhodopsins (a) und das spektrale Verhältnis von $A_{280}/A(\lambda_{\max})$ der aufgereinigten Mutanten (b) resultieren aus den Messungen, die in Abbildung 3.8a und 3.8b dargestellt werden.

Die zusätzlichen roten Spektren (Spektren 5) in Abbildung 3.8a und 3.8b resultierten aus einem Parallelansatz, in dem die lichtsensitiven Rhodopsinmutanten in Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ $\text{CT}\alpha$ -Peptid einer 15-sekündigen Belichtung mit orangefarbenem Licht ($\lambda > 480 \text{ nm}$) ausgesetzt wurden (Abb. 3.8a und b). Dieser Parallelansatz wurde bei Rhodopsinmutanten durchgeführt, die nach der Belichtung neben der erwarteten 382 nm-Absorption für Meta II eine weitere Absorption bei ca. 480 nm aufwiesen, die Meta I, Meta III oder Isorhodopsin (9-*cis*-Retinyliden-Opisin) zugeordnet werden kann (z.B. Y43A, T289D). Durch die Zugabe des $\text{CT}\alpha$ -Peptids wurde das Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II in Richtung Meta II verschoben

3 ERGEBNISSE

(Heck *et al.* 2003a), wodurch die 480 nm-Absorption des Meta I verschwand. Durch die Belichtung der Rhodopsinmutanten in Anwesenheit des CT α -Peptids konnte zum einen der Anteil an Meta I und zum anderen der Anteil an Isorhodopsin bestimmt werden. Die prozentualen Anteile an Meta I wurden durch die Berechnung der Konzentration der protonierten Schiff'schen Base (SBH⁺) in Bezug zur Gesamtkonzentration an Rhodopsin bestimmt. Die Berechnung der Rhodopsinkonzentration erfolgte durch die Bestimmung der Absorptionsdifferenz zwischen Spektrum 1 und Spektrum 4 bei λ_{\max} (475 nm bis 510 nm) mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 40\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Wald und Brown 1953) (Abb. 3.8a und b). Die SBH⁺-Konzentration wurde anhand der Absorptionsdifferenz bei 480 nm zwischen dem Spektrum 2 (ohne CT α -Peptid) und Spektrum 5 (mit 50 μM CT α -Peptid) und auf Grundlage des Extinktionskoeffizienten für Meta I bestimmt ($\epsilon = 45\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Matthews *et al.* 1963) (Abb. 3.8a und b). Die Berechnung der Anteile an Isorhodopsin erfolgte durch die Bestimmung der Absorptionsdifferenz bei 490 nm zwischen Spektrum 4 und Spektrum 5 mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 43\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Cooper 1979) (Abb. 3.8a und b).

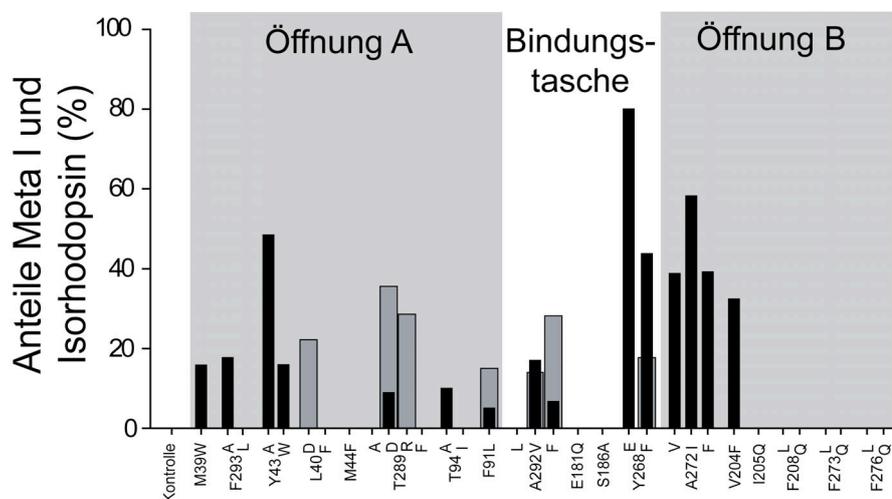


Abbildung 3.10: Anteile an Meta I und an Isorhodopsin nach der lichtinduzierten Aktivierung der Mutanten des hypothetischen Retinalligandenkanals. Die schwarzen Balken stellen den prozentualen Anteil an Meta I (λ_{\max} ~480 nm) und die grauen Balken den prozentualen Anteil an Isorhodopsin (Opsin-9-*cis*-Retinal; λ_{\max} 490 nm) nach einer 15-sekündigen Belichtung der Mutanten dar. Daten resultieren aus den Messungen, die in Abbildung 3.8a und 3.8b dargestellt sind.

Das Gleichgewicht zwischen Meta I und Meta II liegt für das Kontrollrhodopsin unter den in dieser Arbeit genutzten Bedingungen auf der Seite des Meta II (Abb. 3.7c). Die Rhodopsinmutanten, die eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Meta I (SBH⁺) aufwiesen, sind im ganzen Ligandenkanal verteilt (M39W, F293A, Y43A/W, T289D, T94A, F91L, A292V/F, Y268E/F, A272V/I/F und V204F; Abb. 3.10, schwarze Balken). Auffällig ist, dass die äußeren Aminosäurereste der

Öffnung B (I205Q, F208L/Q, F273L/Q und F276L/Q; Abb. 3.10, schwarze Balken) keinen Einfluss auf das Gleichgewicht hatten. Das könnte mit der weit von der Retinyliden-Schiff'schen Base entfernten Lage im Protein zu tun haben. Im Ligandenkanal existieren aber auch Mutationsstellen, die durch den Austausch zu einer Aminosäure einen Effekt auf das Meta I/Meta II-Gleichgewicht aufwiesen, wobei der Austausch zu einer anderen Aminosäure keine Auswirkungen auf das Gleichgewicht hatte (Phe293, Thr289, Thr94 und Ala292). Neben diesen Mutationsstellen sind aber auch andere vorhanden, wo jeder Austausch zu einer Verschiebung des Meta I/Meta II-Gleichgewichts führte (Tyr43, Tyr268 und Ala272).

Die Bildung von Isorhodopsin (9-*cis*-Retinyliden-Opisin) trat mehr bei den Mutanten auf, die in der Umgebung des Lys296 lokalisiert waren (L40D, T289D/R, F91L A292V/F und Y268F; Abb. 3.10, graue Balken). Alle Mutanten, die eine Bildung von Meta I aufwiesen, zeigten mit einer Ausnahme (L40D) auch die Bildung von Isorodopsin. Die Bildung von Isorhodopsin resultiert aus der Verschiebung des Meta I/Meta II-Gleichgewichts in Richtung Meta I und könnte den zuvor genannten Zusammenhang erklären. Die Unterschiede in der Ausrichtung des Meta I/Meta II-Gleichgewichts könnten auf eine Ladungsverschiebung innerhalb der Bindungstasche zurückzuführen sein, die durch die eingesetzte Mutation induziert wurde.

Neben der spektroskopischen Charakterisierung der Rhodopsinkanalmutanten wurde auch ihr Einfluss auf die Interaktion des Rezeptors mit dem G_t-Protein untersucht. Für 15 ausgewählte Rhodopsin- und Opisinmutanten wurde mittels Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz durch die Aufnahme von GTP γ S (Higashijima *et al.* 1987) die G_t-Proteinaktivierungsgeschwindigkeit gemessen (Anfangssteigung auf die Amplitude normiert) (Abb. 3.11). Die lichtinduzierte G_t-Proteinaktivierung der Rhodopsinmutanten wurde auf die Kontrolle (100 % Aktivierung) bezogen und zeigte nur kleine Abweichungen von der des Kontrollrhodopsins, ausgenommen die K296G-Mutante, die eine deutlich verringerte Aktivierung des G_t-Proteins induzierte (50 %) (Abb. 3.11a). Die Ergebnisse für die Mutanten T94I, E181Q und S186A stimmen mit früheren Befunden überein (Janz und Farrens 2004), wohingegen die Aktivität der Rhodopsinmutante Y268F (80 %) im Vergleich zu einer früheren Veröffentlichung höher ist (20 %; Ref.: Janz und Farrens 2004). Da aber diese früheren Untersuchungen an Rhodopsinmutanten in COS-1 Zellmembranen durchgeführt wurden, können diese Daten unter Umständen abweichen.

Die niedrige G_t-Proteinaktivierung durch die K296G-Mutante kann auf den schnellen lichtinduzierten Zerfall zu K296G-Opisin und all-*trans*-Retinal-Analogen

3 ERGEBNISSE

zurückgeführt werden (siehe Abschnitt 3.2.3). Die verminderte Aktivierung des G_t -Proteins durch die Y268F- und die M207A-Mutante kann durch das verschobene Meta I/Meta II-Gleichgewicht in Richtung Meta I erklärt werden (Abb. 3.10).

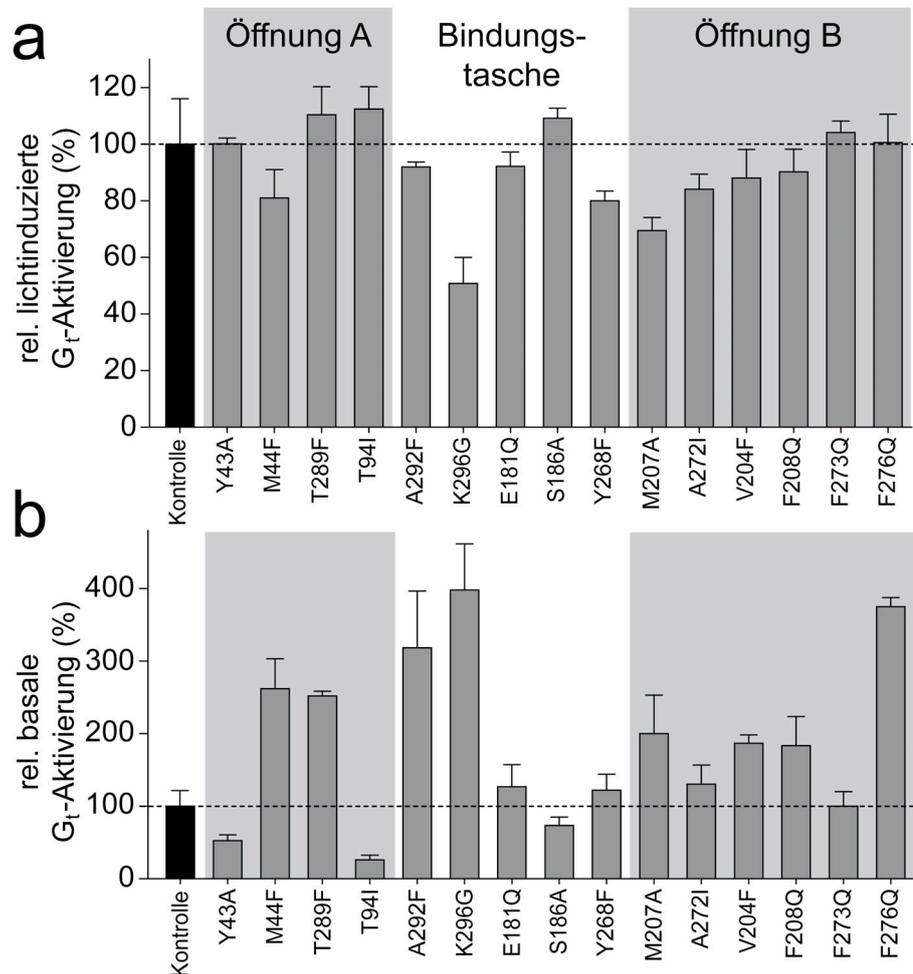


Abbildung 3.11: Lichtinduzierte und basale G_t -Proteinaktivierung durch ausgewählte Mutanten des hypothetischen Ligandenkanals. Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten der G_t -Proteinaktivierung durch eine mit 11-*cis*-Retinal regenerierte Mutante (K296G mit 11-*cis*-PrSB regeneriert) nach der Belichtung dieser (a) und durch eine Opsinmutante in Abwesenheit eines Retinals (b). Die Aktivitäten sind in prozentualer Relation zur N2C/D282C-Kontrolle dargestellt, die als 100 % definiert wurde (gestrichelte Linie). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von neun (N2C/D282C-Kontrolle) oder drei (andere Mutanten) unabhängigen Messungen. Messbedingungen: 5 nM aufgereinigte Rhodopsin- oder Opsinmutante in BTP-Puffer (pH 6,0), 130 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT und 0,01 % DDM bei 20°C.

Die Untersuchung der basalen Aktivität der Opsinmutanten führte zu drei Gruppen mit unterschiedlicher Wirkung auf die Aktivierung des G_t -Proteins (Abb. 3.11b). Die erste Gruppe der Opsinmutanten hatte keine Effekte auf die G_t -Proteinaktivierung (E181Q, S186A, Y268F, A272I und F273Q; Abb. 3.11b) und wies ungefähr 1 % Aktivität des lichtinduzierten Kontrollrhodopsins auf (analog zum Kontrollrhodopsin). Die zweite Gruppe wies eine verminderte basale Aktivität im Vergleich zur Kontrolle auf (Y43A und T94I; Abb. 3.11b), und die dritte Gruppe zeigte eine

erhöhte basale Aktivität zum G_t-Protein (M44F, T289F, A292F, K296G, M207A, V204F, F208Q und F276Q; Abb. 3.11b). Die verminderte Basalaktivität der Opsinmutanten Y43A und T94I könnte auf Verschiebung des partiell aktiven Zustand des Opsins in Richtung inaktiver Zustand als Folge der Messung in Detergenzlösung zurückzuführen sein, da das in früheren Befunden für die T94I-Mutante in COS-1 Zellmembranen nicht beobachtet werden konnte (Gross *et al.* 2003a). Die erhöhte basale G_t-Proteinaktivierung der restlichen Mutanten könnte auf eine durch die Mutationen hervorgerufene Verschiebung des Gleichgewichts zwischen dem inaktiven und aktiven Opsin in Richtung der aktiven Opsinspezies zurückgeführt werden.

Die größeren basalen Effekte der ligandenfreien Opsinmutanten auf die Aktivierung des G_t-Proteins (Abb. 3.11b) und die verglichen damit relativ geringen Effekte durch die lichtinduzierten Rhodopsinmutanten (Meta II) (Abb. 3.11a) könnten durch die all-*trans*-Retinal-vermittelte Stabilisierung der Meta II-Konformation erklärt werden (Meyer *et al.* 2000). Das bedeutet, dass Meta II durch das kovalent verknüpfte all-*trans*-Retinal in einer definierten Konformation stabilisiert wird, wohingegen ligandenfreies Opsin relativ flexibel ist. Dadurch haben kleinere mutationsbedingte Änderungen in der Struktur des ligandenfreien Opsins größere Auswirkungen auf die basale G_t-Proteinaktivierung.

3.2.2 Effekt der Mutationen auf die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals in das Opsin und auf die Abgabe des all-*trans*-Retinals aus dem lichtaktivierten Rhodopsin

Die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch das Opsinmolekül wurde in dieser Arbeit durch die Zunahme der Absorption bei λ_{\max} 500 nm (oder den entsprechenden λ_{\max} der Mutanten) mittels UV/Vis-Spektroskopie gemessen (Abb. 3.12a). In Abbildung 3.12a wird entsprechend der Region innerhalb des Ligandenkanals jeweils die Regeneration einer Beispielmutante gezeigt. Der Start der Regeneration der Rhodopsinmutanten erfolgte durch die Zugabe von 1 μ M 11-*cis*-Retinal zu 0,5 μ M aufgereinigter, in Detergenz solubilisierter Opsinmutante (Abb. 3.12a; Spektren 1 und 2). Die Regenerationskinetik der Mutanten konnte unter diesen Bedingungen mit der Funktion einer bimolekularen Reaktion beschrieben werden (siehe Abschnitt 2.3.4). Die Regenerationsgeschwindigkeit der N2C/D282C-Kontrollmutante betrug $0,074 \pm 0,014 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und stimmt mit früheren Ergebnissen unter ähnlichen Bedingungen überein (Gross *et al.* 2003b). Die Regenerationsgeschwindigkeiten der T289F-, Y268F- und A272I-Mutante lagen mit $0,0031 \pm 0,0013 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $0,0049 \pm 0,0026 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $0,0124 \pm 0,0066 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ signifikant unter der des

3 ERGEBNISSE

Kontrollopsins (Abb. 3.12a). Die Zugabe von 25 mM Hydroxylamin (HA) und eine anschließende 15-sekündige Belichtung diente der Bestimmung der Grundabsorption bei λ_{\max} und somit der Definition des exakten Startpunktes der Regeneration (Abb. 3.12a).

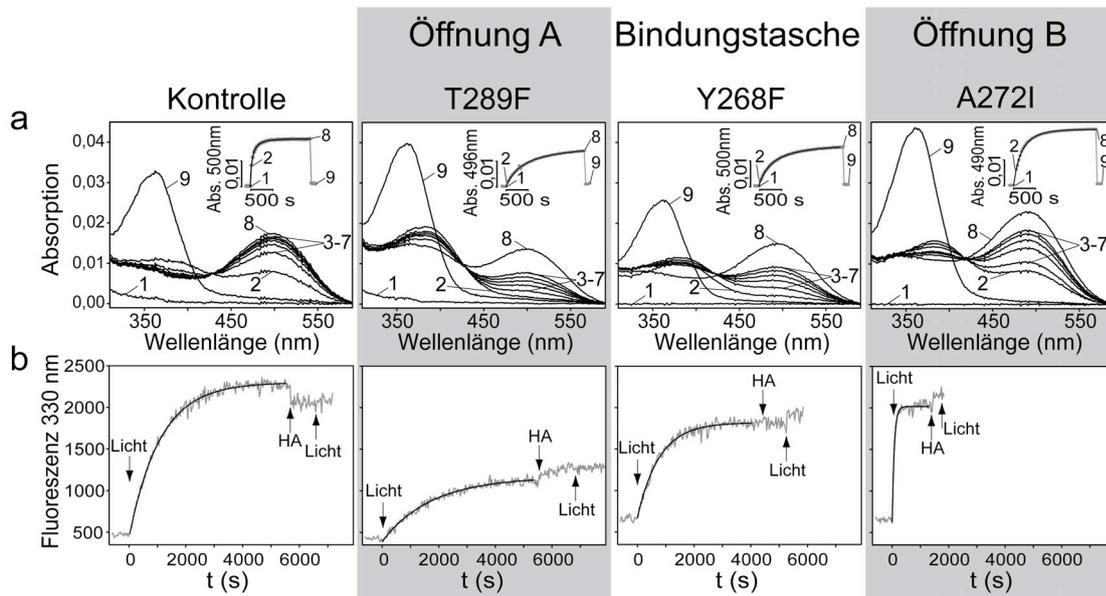


Abbildung 3.12: Kinetik der Retinalaufnahme und -abgabe durch ausgewählte Rhodopsinmutanten. (a) Die Regeneration der N2C/D282C-Op sinkontrolle (Kontrolle) und der Opsinmutanten T289F, Y268F und A272I mit 11-*cis*-Retinal wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie gemessen. Die Spektren von 0,5 μ M Opsin (Spektrum 1), 30 s nach der Zugabe von 1 μ M 11-*cis*-Retinal (Spektrum 2) und alle 60 s folgenden (Spektren 3-8) wurden aufgenommen. Das Spektrum 9 wurde nach der Zugabe von 25 mM Hydroxylamin mit anschließender Belichtung der Probe detektiert. *Eingefügte Grafik:* Änderung in der Absorption bei λ_{\max} als eine Funktion der Zeit (Nummerierungen entsprechen den der Spektren), beschrieben durch eine bimolekulare Reaktionsgleichung (durchgezogene Linie; siehe Abschnitt 2.3.4). (b) Fluoreszenzspektroskopische Analyse des lichtinduzierten Meta II-Zerfalls der N2C/D282C-Rhodopsinkontrolle und der Rhodopsinmutanten T289F, Y268F und A272I. Die Reaktion wird durch eine 15-sekündige Belichtung gestartet. Die Zugabe von 25 mM Hydroxylamin mit anschließender Belichtung dient als Kontrolle für einen vollständigen Meta II-Zerfall. Die Reaktionsgeschwindigkeiten werden durch die Anpassung einer monoexponentiellen Gleichung an die Datenpunkte ermittelt. Messbedingungen: BTP-Puffer (pH 6,0) und 0,03 % DDM bei 20°C.

Die Abgabe des all-*trans*-Retinals durch das lichtaktivierte Rhodopsin konnte in dieser Arbeit durch Messung der steigenden intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Opsinmoleküls verfolgt werden (Abb. 3.12b) (Farrens und Khorana 1995). Die Abgabe des all-*trans*-Retinals folgte einem monoexponentiellen Verlauf mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 13,9$ min in DDM (Abb. 3.12b; siehe auch Abb. 3.7b). Die lichtinduzierte Abgabe des all-*trans*-Retinals durch die T289F-Mutante ergab mit $t_{1/2} = 21$ min eine deutlich verlangsamte Reaktion, wobei die Abgabe des Retinals bei der Y268-Mutante mit $t_{1/2} = 8,9$ min leicht schneller und bei der A272I-Mutante mit $t_{1/2} = 0,86$ min sehr viel schneller verlief (Abb. 3.12b). Die Zugabe von 25 mM HA und eine zweite 15-

sekündige Belichtung dienten der Kontrolle eines vollständigen Meta II-Zerfalls (Abb. 3.12b).

Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten für die Regeneration und den lichtinduzierten Meta II-Zerfall aller Rhodopsinmutanten sind zusammenfassend in Abbildung 3.13 dargestellt. Die Mutanten sind entsprechend ihrer Lokalisation entlang des Ligandenkanals, beginnend von der Öffnung A über die Bindungstasche zu Öffnung B, angeordnet.

Der Vergleich der Regenerationsgeschwindigkeiten aller Mutanten ergab, dass der Hauptanteil der Kanalmutanten sowohl an beiden Öffnungen als auch in der Bindungstasche eine verlangsamte Regeneration zeigte (Abb. 3.13a). Einige wenige Mutanten zeigten keinen Unterschied zum Kontrollopsin (F293A/L, L40D, V204F und F273L; Abb. 3.13a), und nur eine Mutante zeigte eine leichte, aber signifikant schnellere Regeneration als das N2C/D282C-Kontrollopsin (F91L, Abb. 3.13a). Die F91L-Mutante ist an der Verengung nahe dem Lys296 lokalisiert und könnte durch das Entfernen des Aromatenrings eine schnellere Aufnahme des 11-*cis*-Retinals ermöglichen (Abb. 3.13a). In der Öffnung A zeigten die Mutationen der Aminosäuren Tyr43, Thr289 und Thr94 die ausgeprägtesten Effekte auf die Ausbildung des lichtsensitiven Zustands des Rezeptors (Abb. 3.13a). Die verlangsamte Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch die T94I-Mutante, die für die Ausbildung einer angeborenen Nachtblindheit verantwortlich ist, wurde in früheren Arbeiten nicht beobachtet (Gross *et al.* 2003b). Die Opsinmutante T94I regenerierte in diesen früheren Arbeiten mit der gleichen Geschwindigkeit wie das Kontrollrhodopsin, wobei diese Daten nicht vergleichbar mit den Daten aus dieser vorliegenden Arbeit sind, da in den früheren Untersuchungen eine niedrigere Konzentration an Detergenz verwendet wurde und die Regeneration stark von der Detergenzkonzentration abhängig ist (Gross *et al.* 2003b). Generell könnte diese Mutationsstelle (Thr94) durch ihre dichte Lage zum Gegenion der Schiff'schen Base (Glu113) eine entscheidene Rolle bei der Bildung der Schiff'schen Base spielen. Alle Mutationen innerhalb der Retinalbindungstasche zeigten eine langsamere Regenerationsgeschwindigkeit im Vergleich zum Kontrollopsin (Ala292, Glu181, Ser186 und Tyr268; Abb. 3.13a). Die Mutationen der Aminosäure Ala292, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigten eine dramatische Verlangsamung der Retinalaufnahme, während die Mutante A292E, die ebenfalls die Nachtblindheit verursacht, die Regeneration unter den selben Bedingungen beschleunigte (Gross *et al.* 2003b). In dieser Arbeit wurde Ala292 ausschließlich zu größeren hydrophoben Aminosäuren mutiert, wohingegen durch die Mutation zu Glutaminsäure (E) eine Ladung eingefügt wurde, die das Wassernetzwerk innerhalb

3 ERGEBNISSE

der Bindungstasche beeinflussen könnte. Die Aminosäureseitenketten Glu181 und Ser186 könnten über die Wasserstoffbrückenbindung zum Lys296 an der Steuerung der Lys296-Schranke bei der Aufnahme des 11-*cis*-Retinals beteiligt sein. Durch die Mutation des Glu181 zu Glutamin oder des Ser186 zu Alanin wird die Ladung an dieser Stelle in der Bindungstasche entfernt und somit könnte keine Bindung zum Lys296 erfolgen.

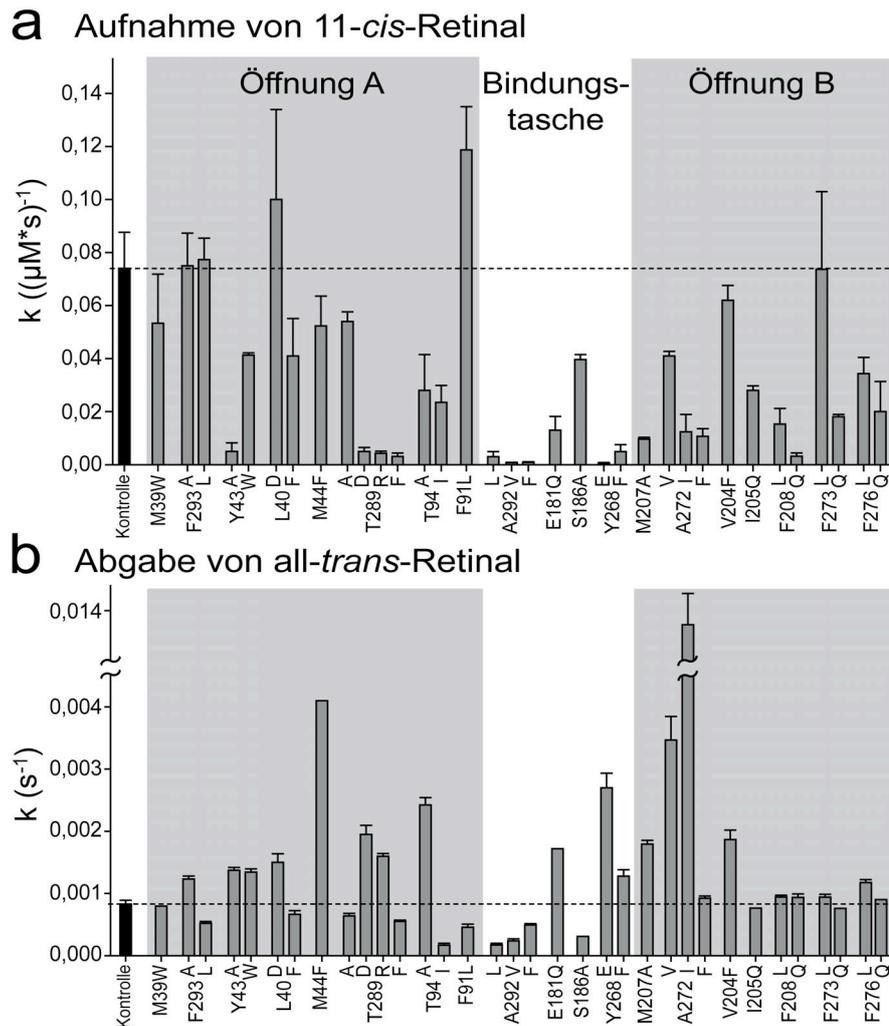


Abbildung 3.13: Reaktionsgeschwindigkeiten der Retinalaufnahme und -abgabe durch die Rhodopsinmutanten. (a) Regenerationsgeschwindigkeiten der Opsinmutanten (Messung siehe Abbildung 3.12a). Die Geschwindigkeiten spiegeln eine bimolekulare Reaktion wider. (b) Fluoreszenzabhängige Messung der Geschwindigkeit des lichtinduzierten Meta II-Zerfalls (Messung siehe Abbildung 3.12b). Die Geschwindigkeiten wurden mittel einer monoexponentiellen Gleichung ermittelt. (a und b) Die gestrichelte Linie beruft sich auf den Wert für die N2C/D282C-Kontrolle und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von fünf (Kontrolle) oder drei (alle anderen Mutanten) unabhängigen Messungen. Messbedingungen: BTP-Puffer (pH 6,0) und 0,03 % DDM bei 20 °C.

Die Effekte einzelner Mutationen auf die lichtinduzierte Abgabe von all-*trans*-Retinal zeigten zum Teil extreme Abweichungen vom Kontrollrhodopsin. Es wurden sowohl sehr langsame (Ala292, S186A, T94I; Abb. 3.13b) als auch sehr

schnelle Reaktionen (M44F, T94A, Y268E und A272V/I; Abb. 3.13b) beobachtet. Der stark verlangsamte Meta II-Zerfall der Mutationen von Ala292 und Ser186 könnte sich mit der dichten Lage dieser zum Lys296 erklären lassen, wobei die Mutationen an der Stelle Ala272 durch eine Beeinflussung der Lage des Retinals innerhalb der Bindungstasche erklärbar wären.

Der Austausch der Aminosäurereste, die im äußeren Bereich der Öffnungen A und B lokalisiert sind (Met39, Tyr43; Phe293 an der Öffnung A und Ile205, Phe208, Phe273 und Phe276 an Öffnung B), hatten nur kleine oder überhaupt keine Effekte auf die Abgabe des all-*trans*-Retinals (Abb. 3.13b). Im Gegensatz dazu beeinflussten die meisten ausgetauschten Reste innerhalb der Retinalbindungstasche oder innerhalb des angrenzenden inneren Teils der Öffnungen die Reaktionsgeschwindigkeit stark (Abb. 3.13b). In einigen Fällen (z.B. Thr289 und Thr94) ergab die Substitution der Aminosäurereste entweder eine beschleunigte (T289D/R und T94A) oder eine verlangsamte (T289A/F und T94I) Retinalabgabe.

Die Effekte der Mutanten T94I, Y268F, E181Q und S186A auf die all-*trans*-Retinal-Abgabe befinden sich in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Janz und Farrens 2004). Der langsame Meta II-Zerfall der T94I- und S186A-Mutante könnte mit der dichten Lage zur Retinalbindungsstelle und durch die Interaktion mit Wassermolekülen innerhalb der Bindungstasche erklärt werden (Janz und Farrens 2004, Ramon *et al.* 2003). Das könnte bedeuten, dass diese beiden Aminosäureseitenketten am chemischen Prozess der Schiff'schen Base-Hydrolyse beteiligt sind. Die Mutation des Glu181 zu Glutamin könnte Einfluss auf den Protonierungszustand der Schiff'schen Base haben und den lichtinduzierten Übergang des Protons von der Schiff'schen Base auf das Glu113 stören (Lüdeke *et al.* 2005), wodurch ein schnellerer Zerfall dieser Mutante erklärbar wäre. Der schnellere Zerfall der Y268F-Mutante kann durch destabilisierende Effekte innerhalb der Bindungstasche erklärt werden, da eine Beteiligung dieses Aminosäurerests bei der Hydrolyse der Schiff'schen Base ausgeschlossen wird (Janz und Farrens 2004). Eventuelle Abweichungen der Daten dieser Arbeit von den Daten früherer Arbeiten kann durch die hohe Detergenzkonzentration in den früheren Arbeiten erklärt werden (Janz und Farrens 2004).

Die Abgabe des all-*trans*-Retinals durch das lichtaktivierte Rhodopsin wird zum einen durch die Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base und zum anderen durch die strukturelle Beschaffenheit des Ligandenkanals innerhalb des Proteins determiniert. Um den unterschiedlichen Einfluss der Mutationen auf diese zwei Faktoren herauszuarbeiten, wurde ein Parallelansatz in Anwesenheit von Hydroxylamin (HA) belichtet. Da seit langem bekannt ist, dass die Zugabe von HA die

3 ERGEBNISSE

Spaltung der Retinyliden-Schiff'schen Base beschleunigt, konnte der Einfluss der Mutation auf die ligandenkanaldeterminierte Retinalabgabe untersucht werden. Die Geschwindigkeit des lichtinduzierten Meta II-Zerfalls des N2C/D282C-Kontrollrhodopsins in Anwesenheit von 25 mM HA hatte um das 80-fache zugenommen (Abb. 3.14a). Der Vergleich des Meta II-Zerfalls der Mutanten mit der Kontrolle zeigte in Anwesenheit von HA den gleichen relativen Effekt auf die Abgabe des *all-trans*-Retinals (Abb. 3.14a; dunkelgraue Balken) wie in Abwesenheit des HA (Abb. 3.14a; hellgraue Balken), die gesamte Zerfallsreaktion war nur beschleunigt. Ein Beispiel ist die Mutationsstelle Thr94, die durch den Austausch zu Isoleucin oder Alanin den gleichen gegenteiligen Effekt in Anwesenheit und Abwesenheit von HA aufwies (Abb. 3.14a). Aus diesem Ensemble fallen zwei Mutationen heraus (M44F und A292V), die in Anwesenheit von HA langsamer (M44F) bzw. schneller (A292V) zerfallen als die Kontrolle, sich in Abwesenheit des Nukleophils aber umgekehrt zur Kontrolle verhielten (Abb. 3.14a).

Die Untersuchung des Meta II-Zerfalls der Kanalmutanten in Anwesenheit von HA kann Änderungen in der Zugänglichkeit der Retinalbindungstasche für das Nukleophil (Wasser oder HA) nicht eindeutig abbilden (vor allem eine Verbesserung der Zugänglichkeit), da HA im Volumen klein genug ist, um die Schiff'sche Base im Meta II-Wildtyp zu erreichen (Abschnitt 3.1.3). Aus diesem Grund wurde der Meta II-Zerfall in Anwesenheit des größeren Hydroxylaminderivats *o*-Methyl-HA (MHA) untersucht (Abb. 3.14b). Dieses MHA kann die Schiff'sche Base in der Retinalbindungstasche unter normalen Umständen nicht erreichen (Abschnitt 3.1.3). Treten nun durch die Mutationen im Rhodopsin Änderungen in der Zugänglichkeit für das Nukleophil auf, insbesondere eine Verbesserung dieser, dann könnte die Anwesenheit von MHA die Hydrolyse der Schiff'schen Base stark beschleunigen.

Der Meta II-Zerfall des N2C/D282C-Kontrollrhodopsins wurde durch die Anwesenheit von 25 mM MHA um das 2,4-fache beschleunigt. Der Vergleich des Meta II-Zerfalls der Mutanten zeigte in Anwesenheit von MHA (Abb. 3.14b; dunkelgraue Balken) das gleiche Wirkungsspektrum für die Abgabe des *all-trans*-Retinals, wie in Abwesenheit des MHA (Abb. 3.14a; hellgraue Balken), wobei die gesamte Zerfallsreaktion in Anwesenheit des MHA leicht beschleunigt war.

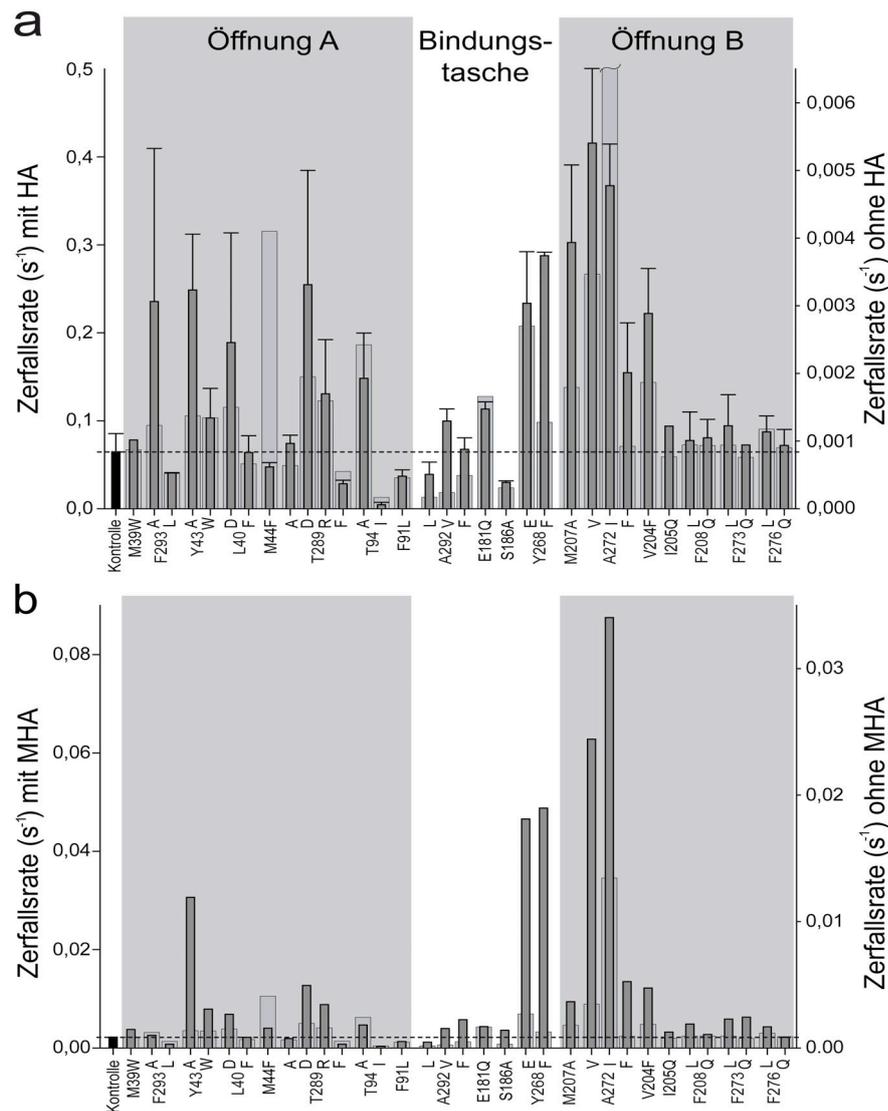


Abbildung 3.14: Reaktionsgeschwindigkeiten der Retinalaufnahme und -abgabe durch die Rhodopsinmutanten in Anwesenheit von Hydroxylamin (HA) und seinem Derivat o-Methyl-Hydroxylamin (MHA). (a) Fluoreszenzmessung der Meta II-Zerfallsgeschwindigkeit in Anwesenheit von 25 mM HA. Die Fehlerbalken definieren die Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. (b) Fluoreszenzmessung der Meta II-Zerfallsgeschwindigkeit in Anwesenheit von 25 mM MHA. (a und b) Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden durch die Normierung der Anfangssteigung der Fluoreszenzänderung auf die maximalen Amplituden ermittelt. Die hellgrauen Balken im Hintergrund zeigen die Zerfallsgeschwindigkeiten des Meta II in Abwesenheit von HA und MHA (rechte Y-Achse) und entsprechen der Darstellung in Abbildung 3.13b ohne Fehlerbalken. Die gestrichelte Linie spiegelt den Wert der Kontrolle wider. Messbedingungen: 0,5 μ M Rhodopsinmutante in BTP-Puffer (pH 6,0), 0,03 % DDM bei 20 °C.

Die Mutationen T289D/R, Y268E/F, A272V/I/F, V204F und F273L/Q zeigten zwar die gleiche beschleunigte Abgabe des all-*trans*-Retinals in Bezug zur Kontrolle, wiesen aber einen größeren Effekt der Beschleunigung in Bezug zur Kontrolle in Anwesenheit von MHA auf (Abb. 3.14b). Die Mutante M44F beschleunigte die Abgabe des all-*trans*-Retinals mit und ohne MHA, zeigte aber in Anwesenheit von MHA einen geringeren Effekt in Bezug zur Kontrolle (Abb. 3.14b). Annähernd gleiche Effekte auf den Meta II-Zerfall in Abwesenheit des MHA zeigten die Mutationen Tyr43 zu Alanin

und Tryptophan, was sich aber nicht im Meta II-Zerfall in Anwesenheit von MHA widerspiegelte – Y43A war 15,5-fach und Y43W war nur 3,5-fach schneller als die Kontrolle (Abb. 3.14b).

Die Mutationen Ala292 zu Valin und Phenylalanin zeigten in Anwesenheit des MHA einen beschleunigten Meta II-Zerfall und in Abwesenheit von MHA einen verlangsamten Zerfall von Meta II in Bezug zur Kontrolle (Abb. 3.14b). Diese Ergebnisse deuten an, dass die Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'sche Base der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Abgabe des all-*trans*-Retinals durch das Meta II ist, wobei die Zugänglichkeit der Schiff'schen Base für Wasser wiederum die Geschwindigkeit der Hydrolyse beeinflussen könnte.

3.2.3 Effekt der K296G-Mutation auf die Aufnahme und Abgabe des Retinal-PrSB

Um die Rolle der Retinyliden-Schiff'schen Base im Rhodopsinmolekül besser verstehen zu können, wurde in dieser Arbeit die Mutante K296G untersucht, bei der das retinalbindende Lys296 durch ein Glycin ausgetauscht wurde. Eine Bindung des Liganden 11-*cis*-Retinal ist nicht mehr möglich, aber die K296G-Mutante kann mit dem 11-*cis*-PrSB einen stabilen rhodopsinähnlichen Zustand bilden. Das 11-*cis*-PrSB ist ein Retinoid, das eine Schiff'sche Base zwischen *n*-Propylamin und dem 11-*cis*-Retinal ausgebildet hat (Robinson *et al.* 1992, Zhukovsky *et al.* 1991) und somit den fehlenden Aminosäurerest des Lysins ausgleicht.

Die Untersuchung der Regeneration von 0,5 μM K296G-Opsinmutante (Abb. 3.15a, Spektrum 1) mit 1 μM 11-*cis*-PrSB mittels UV/Vis-Spektroskopie zeigte bei 10 °C nach 90 s eine vollständige Regeneration (Abb. 3.15a, Spektrum 2). Die 15-sekündige Belichtung der regenerierten Probe führte zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von λ_{max} 488 nm auf λ_{max} 440 nm (Abb. 3.15a, Spektrum 3) und die anschließende Zugabe von 25 mM HA wiederum zu einer Verschiebung des Maximums auf λ_{max} 360 nm (Abb. 3.15a, Spektrum 4). Um den Startpunkt der Regeneration zu erhalten, wurde die Probe nochmals mit 15 s belichtet (Abb. 3.15a, Spektrum 5). Da die zeitliche Auflösung bei der UV/Vis-spektroskopischen Untersuchung auf 30 s begrenzt war, die Regeneration der K296G-Mutante aber sehr schnell erfolgte, wurde die Aufnahme des 11-*cis*-PrSB zusätzlich fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Abb. 3.15a, eingefügte Grafik).

Als erstes erfolgte die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Aufnahme von 11-*cis*- oder all-*trans*-Retinal (1 μM) durch das N2C/D282C-Kontrollopsin (0,5 μM). Die Zugabe der Retinale zum Kontrollopsin führte zu einer

rapiden Abnahme der anfänglichen Fluoreszenz (Abb. 3.15a, eingefügte Grafik). Eine weitere Abnahme der Fluoreszenz in Anwesenheit von *all-trans*-Retinal konnte nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Nach der anfänglichen schnellen Abnahme der Fluoreszenz in Anwesenheit von *11-cis*-Retinal folgte eine weitere langsame Komponente, die die Retinalaufnahme durch die Bindungstasche des Kontrollopsins reflektieren könnte (Abb. 3.15a, eingefügte Grafik, grünes Spektrum). Diese langsame Komponente entspricht der bimolekularen Geschwindigkeitskonstante der Regeneration des Kontrollopsins bei 10 °C ($k = 0,014 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), die UV/Vis-spektroskopisch ermittelt wurde (nicht gezeigt).

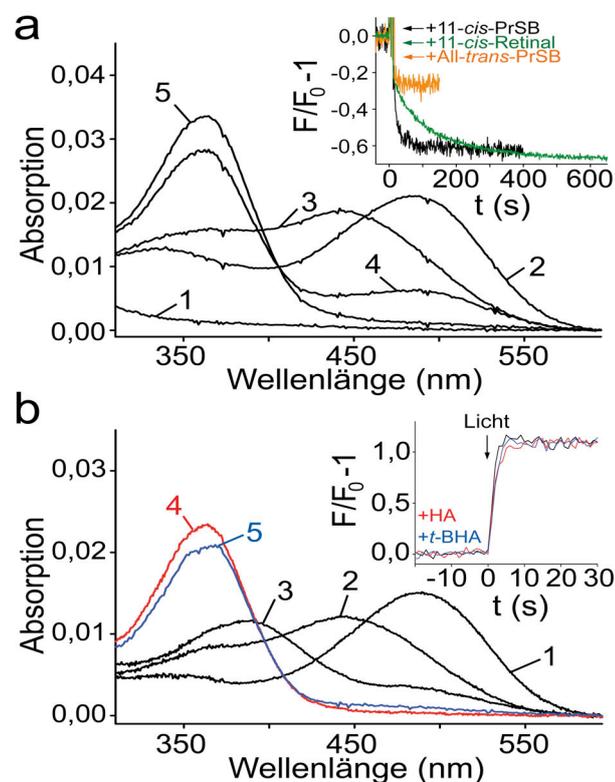


Abbildung 3.15: Charakterisierung der K296G-Mutante. (a) UV/Vis-Spektren der K296G-Opsinmutante (0,5 μM ; Spektrum 1), 90 s nach Zugabe von 1 μM *11-cis*-PrSB (Spektrum 2), 30 s nach Belichtung der Probe (Spektrum 3), 5 min nach Zugabe von 25 mM Hydroxylamin (HA) (Spektrum 4) und 30 s nach zweiter Belichtung der Probe (Spektrum 5). *Eingefügte Grafik:* Fluoreszenzänderung, induziert durch Zugabe von 1 μM *11-cis*-PrSB (schwarz) oder *all-trans*-PrSB (orangefarben) zu 0,5 μM K296G-Opsin. Zugabe von *11-cis*-Retinal zu Kontrollopsin (N2C/D282C) (grüne Kurve). (b) UV/Vis-Spektren der mit *11-cis*-PrSB regenerierten K296G-Opsinmutante im Dunkelnzustand (Spektrum 1), 30 s (Spektrum 2) und 160 min (Spektrum 3) nach der Belichtung der Probe. Spektren 4 und 5 wurden 30 s nach der Belichtung der Probe in Anwesenheit von 25 mM HA (Spektrum 4) oder *o-tert*-Butyl-HA (*t*-BHA) (Spektrum 5) aufgenommen. *Eingefügte Grafik:* Fluoreszenzspektroskopische Messung der lichtinduzierten Retinalabgabe durch die K296G-Rhodopsinmutante in Abwesenheit eines HA (schwarz) oder in Anwesenheit von 25 mM HA (rot) bzw. *t*-BHA (blau). Messbedingungen: BTP-Puffer (pH 6,0), 0,03 % DDM, 10 °C.

Die Zugabe von *all-trans*-PrSB zu K296G-Opsin zeigte, analog zur Zugabe von *all-trans*-Retinal, ausschließlich die anfängliche schnelle Abnahme der Fluoreszenz (Abb. 3.15a, eingefügte Grafik, orangefarbenes Spektrum), wohingegen die Zugabe

3 ERGEBNISSE

von 11-*cis*-PrSB zum K296G-Opsin, ähnlich der Regeneration der Opsinkontrolle, in einer biphasischen Abnahme der Fluoreszenz resultierte (Abb. 3.15a, eingefügte Grafik, schwarzes Spektrum). Die Analyse der langsamen Komponente ($k = 0,375 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) zeigte, dass die Regeneration der K296G-Mutante im Vergleich zur Kontrolle um das 30-fache beschleunigt war.

Die 15-sekündige Belichtung der K296G-Rhodopsinmutante führte innerhalb von 30 s zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des rhodopsinähnlichen Zustands (λ_{max} 488 nm (Abb. 3.15b, Spektrum 1)) zu λ_{max} 440 nm (Abb. 3.15b, Spektrum 2). Die 440 nm-Spezies entspricht der Absorption eines protonierten all-*trans*-PrSB, welches langsam zu all-*trans*-Retinal (λ_{max} 380 nm) und *n*-Propylamin zerfällt (Abb. 3.15b, Spektrum 3). Die 15-sekündige Belichtung des K296G-Rhodopsins in Anwesenheit von Hydroxylamin (HA) oder *o*-*tert*-Buthyl-Hydroxylamin (*t*-BHA) führte innerhalb von 30 s zur Bildung von Retinaloxim (λ_{max} 360 nm (Abb. 3.15b, Spektren 4 und 5). Da das *t*-BHA nicht in die Bindungstasche eindringen kann (siehe Abschnitt 3.1), unterstützt dieser Befund die Hypothese, dass die Hydrolyse der Schiff'schen Base erst nach der schnellen lichtinduzierten Abgabe der all-*trans*-PrSB durch K296G außerhalb des Rezeptors stattfindet.

Die Untersuchung der Abgabe des all-*trans*-Retinals durch K296G mittels Fluoreszenzspektroskopie ergab eine 100-fach schnellere Zunahme der Fluoreszenzintensität verglichen mit dem 11-*cis*-Retinal regenerierten Kontrollrhodopsin (Abb. 3.15b, eingefügte Grafik, schwarze Spur). Um die Interpretation der schnellen Abgabe des all-*trans*-PrSB zu bestätigen (Matsuyama *et al.* 2010), wurde jeweils ein Parallelansatz in Anwesenheit von HA oder *t*-BHA belichtet (Abb. 3.15b, eingefügte Grafik, rote (HA) und blaue (*t*-BHA) Spur). Da die Anwesenheit von HA die Zunahme der Fluoreszenz nach Belichtung der K296G-Mutante nicht beschleunigen konnte und *t*-BHA ebenfalls keinen Effekt auf den Anstieg der Fluoreszenz hatte³, wird gezeigt, dass all-*trans*-PrSB die K296G-Mutante innerhalb von fünf Sekunden verlässt und die Spaltung der Schiff'schen Base durch die Oximbildung außerhalb des Proteins erfolgt.

Die lichtinduzierte G_t -Proteinaktivierung durch die K296G-Rhodopsinmutante (Abb. 3.16, rote Spur) war im Vergleich zum Kontrollrhodopsin um 50 % reduziert (Abb. 3.16, schwarze Spur; siehe auch Abb. 3.11a). Dagegen war die basale Aktivität des K296G-Opsins für das G_t -Protein annähernd viermal so hoch (Abb. 3.16, grüne

³ Der Fluoreszenzanstieg wird in Anwesenheit von HA nach Belichtung des Kontrollrhodopsins durch die schnelle Spaltung der Schiff'schen Base im Protein beschleunigt. Die Anwesenheit von *t*-BHA hat keinen Einfluss auf die Hydrolyse-Reaktion der Schiff'schen Base, da dieses nicht in das Protein eindringen kann (siehe Abschnitt 3.1).

Spur) wie die basale Aktivität der Opsinkontrolle (Abb. 3.16, graue Spur; siehe auch Abb. 3.11b).

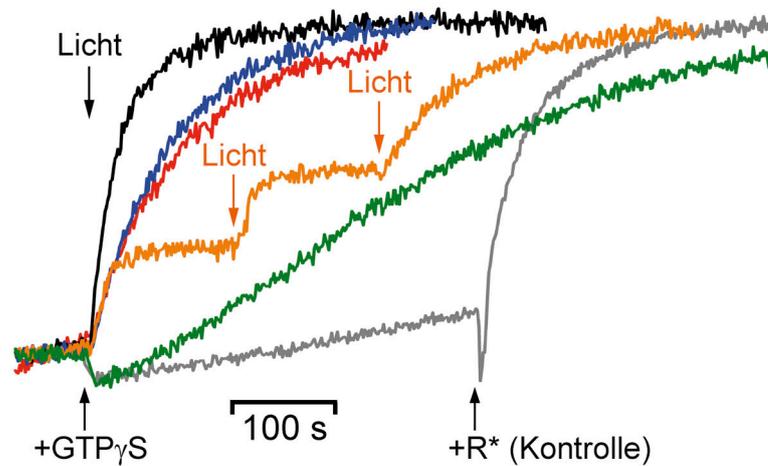


Abbildung 3.16: G_t -Proteinaktivierung durch die N2C/D282C-Kontrolle und die K296G-Mutante.

Die G_t -Proteinaktivierung durch das N2C/D282C-Kontrollrhodopsin (5 nM) wurde durch eine zehnekündige Belichtung (schwarzer Pfeil) induziert (schwarze Spur). Die G_t -Proteinaktivierung durch das N2C/D282C-Kontrollopsin (5 nM) wurde durch die Zugabe von $GTP\gamma S$ gestartet (graue Spur). Der Pfeil (+R*) markiert die weitere Zugabe eines lichtaktivierten N2C/D282C-Rhodopsins (R*) um das gesamte G_t -Protein in der Probe zu aktivieren. Die G_t -Proteinaktivierung durch die mit 11-*cis*-PrSB regenerierte K296G-Mutante wird ebenfalls durch eine zehnekündige Belichtung (schwarzer Pfeil) induziert (rote Spur). Die G_t -Proteinaktivierung durch das K296G-Opsin wird wiederum durch die Zugabe von $GTP\gamma S$ gestartet (grüne Spur). Die G_t -Proteinaktivierung durch das K296G-Opsin, in Anwesenheit von 11-*cis*-PrSB im Überschuss (0,5 μM), wird durch eine kontinuierliche Belichtung (Startpunkt: schwarzer Pfeil) induziert (blaue Spur). Der zehnekündigen Belichtung (schwarzer Pfeil) des K296G-Opsin, in Anwesenheit von 11-*cis*-PrSB im Überschuss (0,5 μM), folgt eine weitere zehnekündige Belichtung (orangefarbene Spur, erster Pfeil) und abschließend eine kontinuierliche Belichtung (orangefarbene Spur, zweiter Pfeil). Messbedingungen BTP-Puffer (pH 6,0), 130 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT und 0,01 % DDM bei 20°C.

Die lichtinduzierten G_t -Proteinaktivierung der K296G-Rhodopsinmutante (Abb. 3.16, rote Spur) übersteigt über einen Zeitraum von mehr als 60 s signifikant die des ligandenfreien K296G-Opsins (Abb. 3.16, grüne Spur). Diese Ergebnisse würden den Aspekt der schnellen lichtinduzierten all-*trans*-PrSB-Abgabe durch die K296G-Mutante widerlegen, da im Fall eines schnellen Meta II-Zerfalls die lichtinduzierte G_t -Proteinaktivierung der basalen Aktivierung entsprechen würde. Die Anwesenheit eines Überschusses 11-*cis*-PrSB führte während der zehnekündigen Belichtung zu einer Aktivierung des G_t -Proteins, die nach Beendigung der Belichtung aber wieder durch das 11-*cis*-PrSB inhibiert wurde (Abb. 3.16, orangefarbene Spur). Dieses Ergebnis demonstriert, dass das 11-*cis*-PrSB nach der lichtinduzierten Aktivierung der K296G-Rhodopsinmutante einen sofortigen Zugang zur Bindungstasche hat, und es bestätigt die schnelle Aufnahme und Abgabe des Retinoidliganden durch diese Mutante. Die lichtinduzierte Aktivität, die nach der Abgabe des all-*trans*-PrSB durch

den Rezeptor entsteht, könnte aus der Interaktion des Liganden mit einer möglichen zweiten Bindungsstelle resultieren, die die G_t -Proteinaktivierung fördert (Heck *et al.* 2003b, Jäger *et al.* 1994, Kono *et al.* 2008).

3.3 Reversible Aufnahme des all-*trans*-Retinals durch aktives Opsin

Im Rhodopsin ist der 11-*cis*-Retinalligand mit dem Apoprotein über eine Schiff'sche Base kovalent verknüpft, und erst die Isomerisierung zu all-*trans*-Retinal erzeugt die aktive Meta II-Konformation des Rezeptors. Die exogene Zugabe des all-*trans*-Retinals zu Opsin führt zu einer Aktivität für das G_t -Protein von 14 % des lichtinduzierten Rhodopsins (Han *et al.* 1996, Jäger *et al.* 1996). Die Frage ist nun, wie diese aktive Spezies des Opsins entsteht: Wird all-*trans*-Retinal kovalent in der Bindungstasche des Rezeptors gebunden oder existiert eine sekundäre Bindestelle für all-*trans*-Retinal, wodurch der Rezeptor partiell aktiviert wird?

Die lichtinduzierte Aktivierung des Rhodopsins (0,5 μ M N2C/D282C-Kontrollrhodopsin) führte zu einem Anstieg der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz, die die Hydrolyse und Abgabe des all-*trans*-Retinals widerspiegelt (Abb. 3.17a, schwarze Spur). Die Belichtung in Anwesenheit von 50 μ M CT α -Peptid (modifizierte C-terminale Oligopeptidsequenz der α -Untereinheit des G_t -Proteins) führte zu einem unvollständigen Zerfall des Meta II (Abb. 3.17a, rote und grüne Spur). Die Zugabe von Hydroxylamin (HA) in der stationären Phase der Zerfallsreaktion sorgte für eine schnelle Bildung des Retinaloxims. Dies führte zur vollständigen Abgabe des all-*trans*-Retinaloxims durch das Opsin und somit zu einem Anstieg der gemessenen Fluoreszenz (Abb. 3.17a, rote Spur). Die Zugabe des Hydroxylaminderivats *t*-BHA in der stationären Phase der Reaktion zeigte die gleiche Abgabekinetik des all-*trans*-Retinals (Abb. 3.17a, grüne Spur) wie die Messung des normalen Meta II-Zerfalls in Abwesenheit des CT α -Peptids (Abb. 3.17a, schwarze Spur). Durch die Bildung des Retinaloxims, die mit *t*-BHA nur außerhalb des Proteins möglich ist, wurde das freie all-*trans*-Retinal dem Gleichgewicht entzogen, wodurch sich ein neues Gleichgewicht zwischen freiem und proteingebundenem all-*trans*-Retinal einstellte. Die Kinetik der Abgabe des all-*trans*-Retinals in Anwesenheit des CT α -Peptids und des *t*-BHA (Abb. 3.17a, grüne Spur) war identisch mit der normalen Abgabekinetik in Abwesenheit des CT α -Peptids und *t*-BHA (Abb. 3.17a, schwarze Spur).

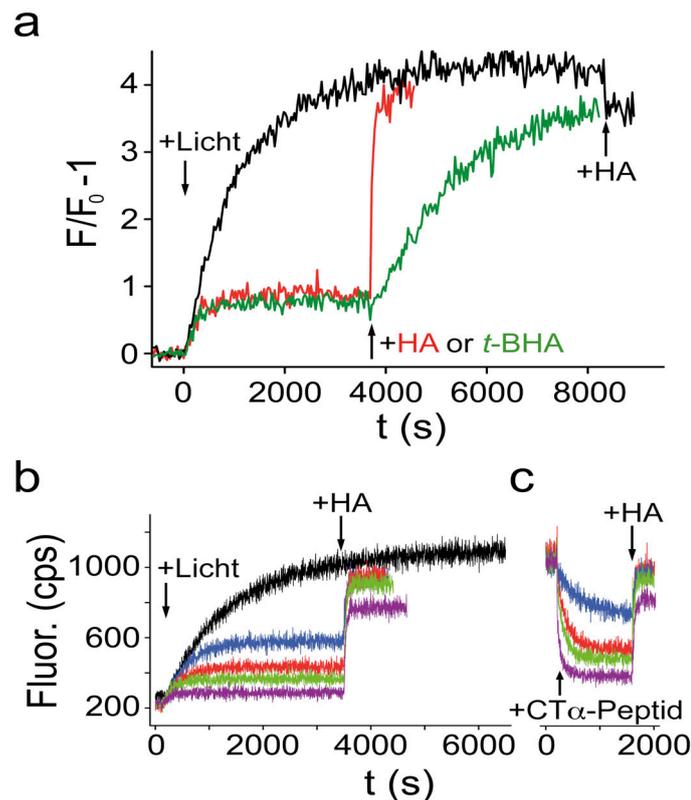


Abbildung 3.17: Einfluss des CT α -Peptids auf den lichtinduzierten Zerfall von Meta II bzw. auf zerfallenes Rhodopsin. (a) Die Untersuchung des lichtinduzierten Meta II-Zerfalls der N2C/D282C-Kontrollrhodopsinmutante erfolgte fluorenszenzspektroskopisch (schwarze Spur). Die Zugabe von 25 mM Hydroxylamin (HA) in der stationären Phase der Messung dient der Bestimmung des Fluoreszenzauslöschungseffekts dieser Verbindung. Der Meta II-Zerfall in Anwesenheit von 50 μ M CT α -Peptid ist in der roten und grünen Spur dargestellt. Die Effekte durch die Zugabe von HA nach Erreichen der stationären Phase sind in der roten Spur (+HA) und die durch die Zugabe von *o*-tert-Buthyl-HA in der grünen Spur (+*t*-BHA) gezeigt. (b) Abhängigkeit des lichtinduzierten Meta II-Zerfalls von der CT α -Peptid-Konzentration. Dargestellt ist der Meta II-Zerfall in Abwesenheit des CT α -Peptids (schwarze Spur) und in Anwesenheit von 10 μ M (blaue Spur), 50 μ M (rote Spur), 100 μ M (grüne Spur) und 500 μ M (violette Spur) CT α -Peptid. Zugabe von 25 mM HA nach Erreichen der stationären Phase (+HA). (c) Einfluss des CT α -Peptids auf das zerfallene Rhodopsin. Zugabe der unter (b) erwähnten Konzentrationen des CT α -Peptids (gleicher Farbcode) zum zerfallenen Rhodopsin (Zerfallszeit: 1 $\frac{1}{2}$ h). Nach dem Erreichen der stationären Phase wurde 25 mM HA zugegeben. Messbedingungen: 0,5 μ M Rhodopsin in BTP-Puffer (pH 6,0), 0,03 % DDM, 20°C.

Die Zugabe verschiedener Mengen des CT α -Peptids vor der lichtinduzierten Aktivierung des N2C/D282C-Rhodopsins zeigte, dass die Fluoreszenzänderung bis zum Erreichen der stationären Phase mit steigender Konzentration (Abb. 3.17b, 10 μ M (blaue Spur) bis 500 μ M (violette Spur)) an CT α -Peptid abnahm. Die Zugabe des CT α -Peptids zu zerfallenem Rhodopsin führte zu einer Abnahme der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des Opsins, die abhängig von der Menge an zugegebenem CT α -Peptid war (Abb. 3.17c). Je höher die Konzentration an CT α -Peptid, desto stärker war die Änderung der Fluoreszenz (Abb. 3.17c, 10 μ M (blaue Spur) und 500 μ M (violette Spur)). Die stationäre Phase der CT α -Peptid-induzierten Fluoreszenzänderung aus Abbildung 3.17c entsprach annähernd der Höhe der entsprechenden stationären Phase der lichtinduzierten Fluoreszenzänderung aus Abbildung 3.17b. Die Zugabe von

3 ERGEBNISSE

HA diente der Kontrolle des Einflusses des CT α -Peptids auf die gemessene Fluoreszenz (Abb. 3.17b und c, +HA).

Die Ergebnisse aus der Abbildung 3.17 sprechen für eine reversible Aufnahme des all-*trans*-Retinals durch Opsin, das durch die Bindung des CT α -Peptids in eine aktive Konformation gebracht werden kann (Scheerer *et al.* 2008). Diese Ergebnisse werfen eine weitere Frage auf: Ist das durch das aktive Opsin reversibel aufgenommene all-*trans*-Retinal kovalent mit dem Protein verknüpft?

Die Untersuchung der Bindung des all-*trans*-Retinals an das Opsin erfolgte durch die Säuredenaturierung des Proteins und anschließende UV/Vis-spektroskopische Analyse. Die Säuredenaturierung mittels 1 N HCl-Lösung führte zur Protonierung der Lys296-Retinylyden-Schiff'schen Base, die dann durch die Verschiebung des Absorptionsmaximums von λ_{max} 382 nm auf 440 nm nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.7c, eingefügte Grafiken). Die Untersuchung der kovalenten Verknüpfung im zerfallenen Rhodopsin (0,5 μM) in Abwesenheit des CT α -Peptids zeigte im Differenzspektrum („nach Zugabe von HCl“ minus „vor Zugabe von HCl“) keine Änderungen des bestehenden Absorptionsmaximums bei λ_{max} 382 nm (Abb. 3.18a, gestricheltes Spektrum). Dagegen wies das Differenzspektrum der Säuredenaturierung der Probe des zerfallenen Rhodopsins nach der Zugabe von 500 μM CT α -Peptid und einer 30-minütigen Inkubation eine Verschiebung des λ_{max} von 382 nm auf 440 nm auf (Abb. 3.18a, Spektrum mit durchgezogener Linie). Der Ansatz mit 0,5 μM Opsin und 0,5 μM exogen zugegebenem all-*trans*-Retinal führte zum gleichen Ergebnis der Säuredenaturierung in An- und Abwesenheit des CT α -Peptids (Abb. 3.18a). Das all-*trans*-Retinal kann reversibel durch das aktivierte Opsin aufgenommen werden und bildet eine kovalente Verknüpfung mit dem Apoprotein. Die Untersuchungen der Affinität des CT α -Peptids in Anwesenheit von all-*trans*-Retinal im Überschuss (40-fach) bzw. der Affinität des all-*trans*-Retinals in Anwesenheit des CT α -Peptids im Überschuss (1000-fach) zum Opsin basierten auf der Bestimmung der Konzentration der protonierten Schiff'schen Base (SBH $^+$). Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mit einem Extinktionskoeffizienten für die SBH $^+$ (Daten aus Abbildung 3.7c, eingefügte Grafiken) von 38 000 M $^{-1}$ cm $^{-1}$. Der Zusammenhang zwischen dem proteingebundenen all-*trans*-Retinal (Konz. SBH $^+$) und der Menge an CT α -Peptid in Anwesenheit von freiem all-*trans*-Retinal im Überschuss (20 μM) konnte mit einer hyperbolischen Funktion beschrieben werden und ergab eine Affinität von $K_d = 3,25 \mu\text{M}$ für 0,5 μM Opsin (Abb. 3.18b, linke Grafik, ●). Der Zusammenhang zwischen dem proteingebundenen all-*trans*-Retinal (Konz. SBH $^+$) und der Menge an exogen zugegebenem all-*trans*-Retinal in Anwesenheit des CT α -Peptids im

Überschuss (500 μM) konnte ebenfalls mit einer hyperbolischen Funktion beschrieben werden und ergab eine Affinität von $K_d = 0,922 \mu\text{M}$ für 0,5 μM aktiviertes Opsin (Abb. 3.18b, rechte Grafik, ●). Da das all-*trans*-Retinal an das im CT α -Peptid befindliche Lysin binden kann, wurde eine Bestimmung dieser Bindung ohne Opsin durchgeführt (Abb. 3.18b, beide Grafiken, ○). Diese Bindung zeigte einen linearen Zusammenhang und kann von der Gesamtkonzentration an gebundenem all-*trans*-Retinal abgezogen werden. Eine weitere Frage stellt sich wie folgt: Befindet sich die kovalente Verknüpfung des all-*trans*-Retinals mit dem aktivierten Apoprotein, genauso wie die des 11-*cis*-Retinals, am Lys296? Wenn das der Fall ist, müsste all-*trans*-Retinal die Regeneration des Rhodopsins beeinflussen.

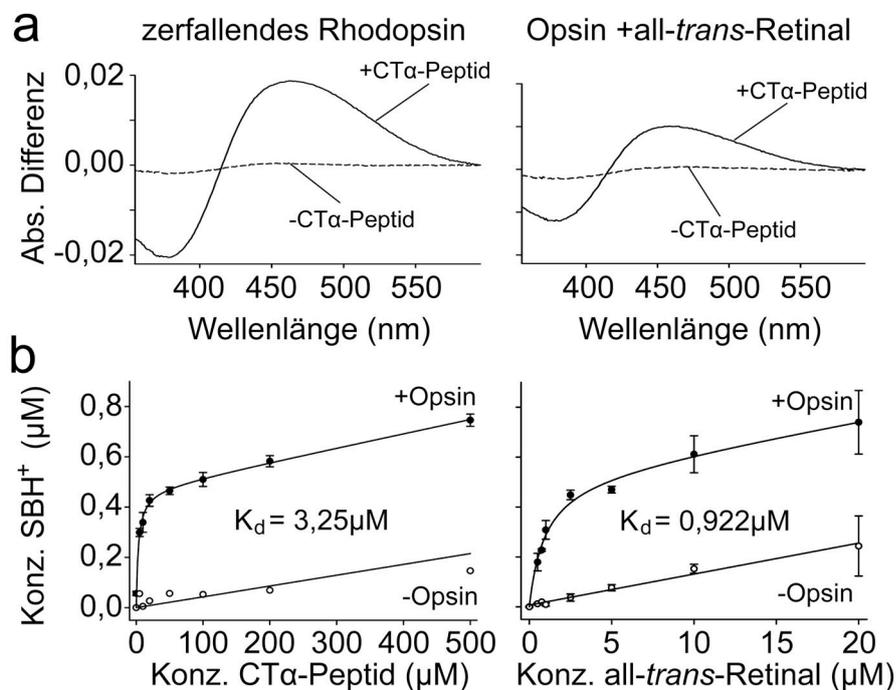


Abbildung 3.18: Untersuchung der Bildung der protonierten Schiff'schen Base (SBH⁺) zwischen Opsin und all-*trans*-Retinal in Anwesenheit des CT α -Peptids. (a) Spektren repräsentieren die Ergebnisse nach der Zugabe von HCl. Die Zugabe von HCl zu zerfallendem Rhodopsin oder Opsin mit equimolarer Konzentration an all-*trans*-Retinal führt in Anwesenheit von 500 μM CT α -Peptid zur Bildung einer SBH (λ_{max} 440 nm; durchgezogene Linie). Die Spektren der Proben nach HCl-Denaturierung und SB-Protonierung in Abwesenheit des CT α -Peptids zeigen kein Maximum bei 440 nm (gestrichelte Linie). (b) Abhängigkeit der Bildung der all-*trans*-Retinyliden-SBH⁺ in Opsin von den Konzentrationen des CT α -Peptids und des all-*trans*-Retinals. *Linke Grafik:* Korrelation zwischen den Konzentrationen der gebildeten SBH⁺ und des CT α -Peptids in Anwesenheit von 40-fachem Überschuss an all-*trans*-Retinal in einer Probe mit 0,5 μM Opsin (●) und ohne Opsin (○). *Rechte Grafik:* Korrelation zwischen den Konzentrationen der gebildeten SBH⁺ und all-*trans*-Retinal in Anwesenheit von 500 μM CT α -Peptid in einer Probe mit 0,5 μM Opsin (●) und ohne Opsin (○). Der Zusammenhang der Datenpunkte wurde mit einer Kombination aus hyperbolischer und linearer (●) oder einer linearen (○) Funktion beschrieben. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung dreier unabhängiger Messungen. Messbedingungen: BTP-Puffer (pH 6,0), 0,03 % DDM, 20°C.

Die Aufnahme von 1 μM 11-*cis*-Retinal in das N2C/D282C-Opsin (Abb. 3.19a, ○) wurde durch eine Zugabe von 10 μM all-*trans*-Retinal in Abwesenheit

3 ERGEBNISSE

des CT α -Peptids nur leicht verlangsamt und konnte mit einer bimolekularen Funktion beschrieben werden (Abb. 3.19a, \triangle). Die Zugabe von 50 μ M CT α -Peptid hatte nahezu keinen Effekt auf die Regeneration des Opsins und zeigte ebenfalls einen bimolekularen Zusammenhang der Datenpunkte (Abb. 3.19a, \bullet). Die Kombination von 50 μ M CT α -Peptid und 10 μ M all-*trans*-Retinal führte im Gegensatz zu den Einzelzugaben zu einer drastischen Reduzierung der Regenerationsrate und konnte durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden (Abb. 3.19a, \blacktriangle).

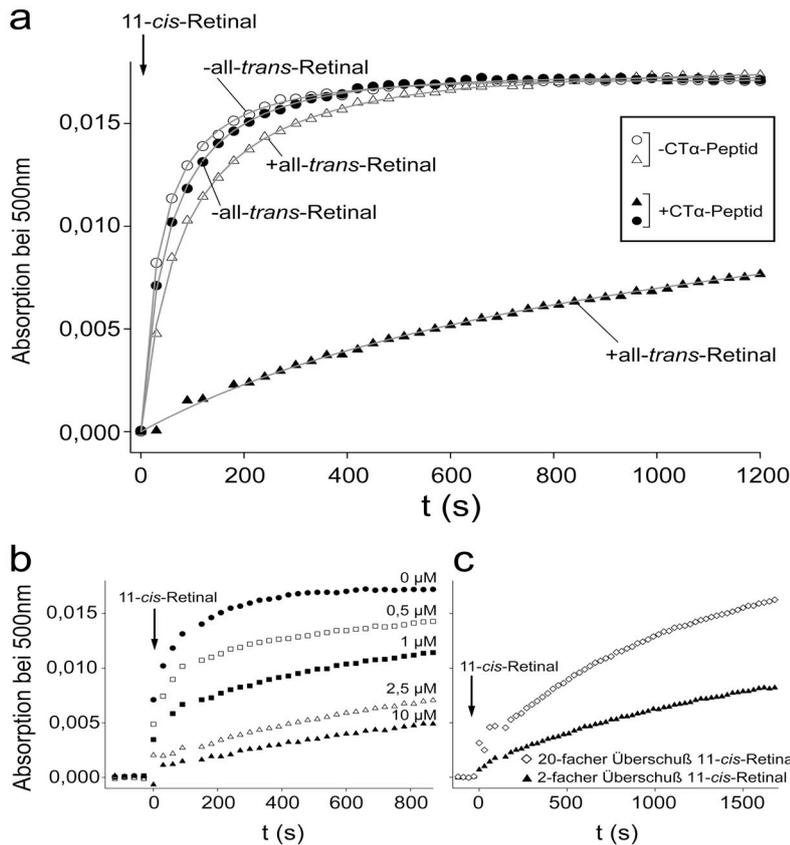


Abbildung 3.19: Beeinflussung der Regeneration des Rhodopsins durch all-*trans*-Retinal in Anwesenheit des CT α -Peptids. Untersuchung der Aufnahme des 11-*cis*-Retinals (1 μ M) durch Opsin (0,5 μ M) erfolgte durch die UV/Vis-spektroskopische Messung bei λ_{max} 500 nm. Die Zugabe des 11-*cis*-Retinals wird durch den Pfeil gekennzeichnet. (a) Geschlossene Symbole beschreiben die Regeneration des Rhodopsins in Anwesenheit von 50 μ M CT α -Peptid und offene Symbole in Abwesenheit des CT α -Peptids. Kreise repräsentieren die Regeneration des Rhodopsins in Abwesenheit des all-*trans*-Retinals. Dreiecke beschreiben die Regeneration in Anwesenheit von 20-fachem Überschuss an all-*trans*-Retinal. Der Zusammenhang der Datenpunkte wurde mit einer bimolekularen Funktion beschrieben, ausgenommen die Datenpunkte der geschlossenen Dreiecke, die mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben wurden. (b) Rhodopsinregeneration in Anwesenheit von 50 μ M CT α -Peptid und den angegebenen all-*trans*-Retinal-Konzentrationen (10 μ M = 20-facher Überschuss von all-*trans*-Retinal zu Rhodopsin). (c) Regeneration des Rhodopsins (0,5 μ M) in Anwesenheit von 50 μ M CT α -Peptid und 10 μ M all-*trans*-Retinal. (\blacktriangle) beschreiben die Regeneration mit 1 μ M 11-*cis*-Retinal (Analog zu (a) \blacktriangle und (b) \blacktriangle) und (\diamond) die Regeneration mit 10 μ M 11-*cis*-Retinal. Messbedingungen: BTP-Puffer (pH 6,0), 0,03 % DDM, 20 °C.

Die Untersuchung der kompetitiven Inhibition der Regeneration durch all-*trans*-Retinal in Anwesenheit von 50 μ M CT α -Peptid wies eine initiale schnelle und eine späte langsame Komponente auf (Abb. 3.19b). Die Geschwindigkeit der schnellen

Phase änderte sich mit zunehmender Konzentration an *all-trans*-Retinal nicht, der Anteil dieser Phase wurde aber mit zunehmender Konzentration an *all-trans*-Retinal kleiner (Abb. 3.19b). Die späte langsame Phase zeigte keine Abhängigkeit von der Konzentration des *all-trans*-Retinals, der Beginn dieser wurde nur mit steigender Konzentration an *all-trans*-Retinal vorgezogen (Abb. 3.19b). Das bedeutet, dass die schnelle initiale Komponente der Aufnahme von 11-*cis*-Retinal in ein leeres Opsinmolekül entspricht und die langsame Komponente den Austausch des am Lys296 gebundenen *all-trans*-Retinals durch das 11-*cis*-Retinal beschreibt (Abb. 3.19b). Das zeigt auch, dass die Aufnahme von *all-trans*-Retinal reversibel ist, während die Aufnahme von 11-*cis*-Retinal durch die Bildung des Rhodopsins irreversibel ist (Abb. 3.19b). Der Anteil der initialen schnellen Phase war schon bei einer equimolaren Menge beider Retinale (1 μM) um nahezu die Hälfte reduziert (Abb. 3.19b, ■), was für eine halbmaximale Besetzung der Bindungstasche des aktivierten Opsins mit *all-trans*-Retinal sprechen würde.

Die erhöhte Konzentration an zugegebenem 11-*cis*-Retinal (10 μM anstatt 1 μM (Abb. 3.19c, ◇ (10 μM) und ◆ (1 μM))) zum Ansatz mit 0,5 μM Opsin, 50 μM CT α -Peptid und 10 μM *all-trans*-Retinal zeigte eine Beschleunigung der langsamen Komponente, jedoch keine initiale schnelle Komponente, was für eine volle Besetzung der Bindungstasche mit *all-trans*-Retinal unter diesen Bedingungen sprechen würde. Diese Daten bestätigen die Daten aus Abbildung 3.18b (rechte Grafik).

Da die exogene Zugabe des *all-trans*-Retinals zu Opsin, die zu einer partiellen Aktivität für das G $_t$ -Protein führte, in aufgereinigten Diskmembranen durchgeführt wurde (Han *et al.* 1996, Jäger *et al.* 1996), soll nun geklärt werden, ob dieser Effekt auch in Detergenzlösung beobachtet werden kann. Dadurch könnte die Frage über die Existenz einer sekundären Bindestelle für *all-trans*-Retinal am Opsinmolekül beantwortet werden.

Die Untersuchung der *all-trans*-Retinal induzierten partiellen G $_t$ -Proteinaktivierung durch Opsin erfolgte durch die Zugabe der verschiedenen Mengen an Retinal direkt in die Messküvette fünf Minuten bevor die lichtunabhängige Aktivierung des G $_t$ -Proteins mit GTP γ S gestartet wurde. Die Messung selbst wurde fluoreszenzspektroskopisch durchgeführt (Abschnitt 2.4.2.2). Die Auswertung der G $_t$ -Proteinaktivität erfolgte durch die Ermittlung der Anfangssteigung normiert auf die Endamplitude. Die Endamplitude wurde durch die direkte Zugabe von Meta II in die Küvette *circa* fünf Minuten nach dem Start der Messung ermittelt. Die in

3 ERGEBNISSE

Abbildung 3.20 dargestellten Daten zeigen eine relative G_t -Proteinaktivierung, die sich auf die lichtinduzierte Aktivierung des G_t -Proteins durch Meta II (100 %) bezieht.

Die basale Aktivierung des G_t -Proteins durch das Opsin (2,5 nM) in Abwesenheit des *all-trans*-Retinals betrug unter diesen Messbedingungen weniger als ein Prozent der lichtinduzierten Meta II-Aktivität. Mit steigender Menge an *all-trans*-Retinal im Ansatz erhöhte sich die Aktivität des Opsins auf maximal 25 % der lichtinduzierten Meta II-Aktivität. Die Anpassung der Datenpunkte an Gleichung 2.6 (siehe Abschnitt 2.5) ergab eine Affinität des *all-trans*-Retinals für Opsin von $K_d = 1,57$ nM. Die höhere partielle G_t -Proteinaktivität in diesem Ansatz im Vergleich zu den 14 % des in der Literatur beschriebenen Wertes (Han *et al.* 1996, Jäger *et al.* 1996) kann durch die Messung des Opsins in Detergenz erklärt werden.

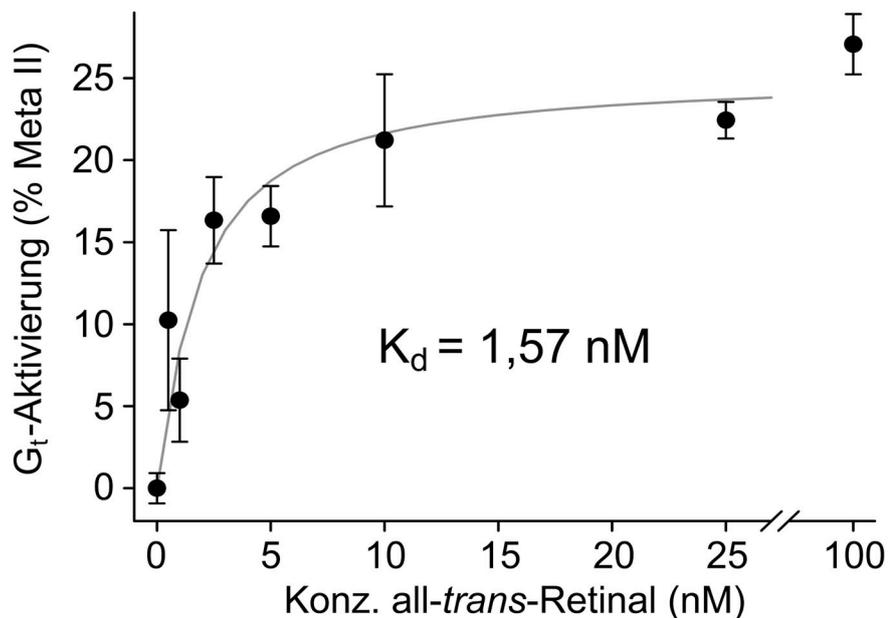


Abbildung 3.20: Titration der *all-trans*-Retinal-induzierten partiellen G_t -Proteinaktivierung von Opsin. Die partielle G_t -Proteinaktivierung durch Opsin und *all-trans*-Retinal wurde relativ zur lichtinduzierten G_t -Proteinaktivierung durch Meta II dargestellt. Die basale Opsinaktivität in Abwesenheit von *all-trans*-Retinal betrug unter diesen Bedingungen weniger als ein Prozent der lichtinduzierten Meta II-Aktivität. In Anwesenheit von 100 nM *all-trans*-Retinal erreichte das Opsin eine G_t -Proteinaktivierung von ca. 25 % der lichtinduzierten Aktivität von Meta II (maximal mögliche G_t -Proteinaktivierung durch Opsin und *all-trans*-Retinal). Die Datenpunkte konnten an die Gleichung 2.6 angepasst werden und ergaben eine Affinität von *all-trans*-Retinal für Opsin von $K_d = 1,57$ nM. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen. Messbedingungen: 2,5 nM N2C/D282C-Opsin in BTP-Puffer (pH 7), 130 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT und 0,01 % DDM bei 20 °C.

Da durch *all-trans*-Retinal nur eine G_t -Proteinaktivität von maximal 25 % der Meta II-Aktivität erreicht wurde, kann die entstandene Spezies kein reversibel gebildetes Meta II sein. Durch die Erhöhung der Konzentration an *all-trans*-Retinal außerhalb des Opsins müsste die reversibel gebildete Meta II-Spezies mit steigender

all-trans-Retinal-Konzentration zunehmen. Das ist aber aus den Daten in Abbildung 3.20 nicht ersichtlich, zudem ist unter diesen Bedingungen keine kovalente Schiff'sche Base-Verknüpfung vorhanden (siehe Abb. 3.18a, rechte Grafik). Demzufolge muss eine sekundäre Bindestelle für *all-trans*-Retinal existieren, die es dem Retinal erlaubt, das Opsin ohne kovalente Verknüpfung partiell zu aktivieren.

4 DISKUSSION

4.1 Hydroxylamin und seine alkylierten Derivate als molekulares Werkzeug zur Untersuchung von Rhodopsin und seinen Metazuständen

Das starke Nukleophil Hydroxylamin (HA) (Abb. 4.1) wird seit langem zur Spaltung Retinyliden-Schiff'scher Basen genutzt, unter anderem, um dadurch Meta II zu Opsin und Retinaloxim umzuwandeln oder um die relative Stabilität von Rhodopsinmutanten zu bestimmen. Die alkylierten Hydroxylaminderivate *o*-Methyl-Hydroxylamin (MHA) und *o*-Ethyl-Hydroxylamin (EHA) (Abb. 4.1) wurden bisher nur zur Umwandlung von Retinal zu alkyliertem Retinaloxim für die HPLC-Analyse verwendet (Buczylko *et al.* 1996, Rattner *et al.* 2000, van Kuijk *et al.* 1985). *O*-tert-Buthyl-Hydroxylamin (*t*-BHA) wurde bisher zur Herstellung von antibakteriellen Agenzien eingesetzt (Tran *et al.* 2004) oder um den Mechanismus der Schwefeloxidsynthese zu verstehen (Huang *et al.* 2001). Im Zusammenhang mit Rhodopsin wurde *t*-BHA bisher noch nicht beschrieben.

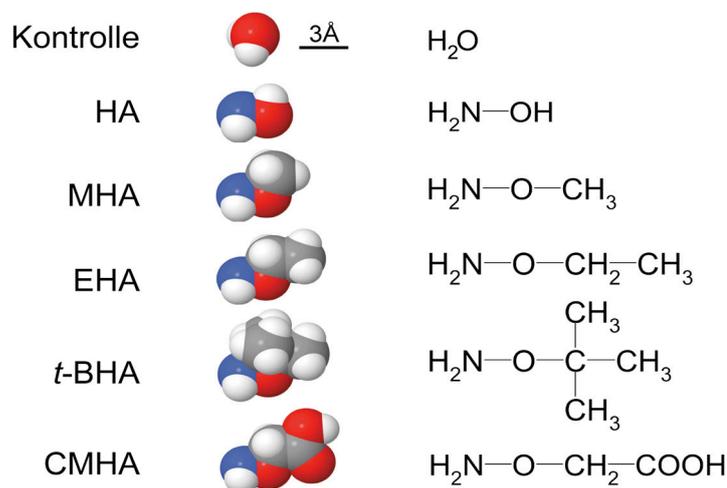


Abbildung 4.1: Molekulare Strukturen von Wasser (Kontrolle), Hydroxylamin (HA), *o*-Methyl-Hydroxylamin (MHA), *o*-Ethyl-Hydroxylamin (EHA), *o*-tert-Buthyl-Hydroxylamin (*t*-BHA) und *o*-(Carboxymethyl)-Hydroxylamin (CMHA). Das platzfüllende Modell wurde dargestellt in *Jmol* (www.jmol.org) mit Hilfe von publizierten Van-der-Waals-Radien (Mantina *et al.* 2009). Atome sind farbig als grau (Kohlenstoff), rot (Sauerstoff), blau (Stickstoff) und weiß (Wasserstoff) dargestellt.

Neben der Nutzung von HA und dessen Derivaten bei der Untersuchung des Rezeptors selbst ist ihr Einsatz zur Eliminierung peripherer Retinyliden-Schiff'scher Basen von großer Bedeutung, da diese die Untersuchung der Aktivierung

des Rhodopsins und des Meta II-Zerfallsprozesses erschweren. Das Retinal reagiert mit Aminen und bildet unter anderem eine Schiff'sche Base-Verbindung mit Phosphatidylethanolaminen (Anderson und Maude 1970, Poincelot *et al.* 1969), Phosphatidylserinen (Sommer *et al.* 2006) und zytoplasmatisch ausgerichteten Lysinresten des Opsinmoleküls (Fishkin *et al.* 2003, Sparrow *et al.* 2003). Basierend auf den beschriebenen pK_a von 6,1 bzw. von 7,5 für Retinyliden-Schiff'sche Basen in Lösung (Cooper 1987, Steinberg *et al.* 1993), würde etwa die Hälfte dieser nichtspezifischen, peripheren Schiff'schen Basen bei physiologischem pH-Wert protoniert sein. Die protonierten Schiff'schen Basen haben eine Absorption bei $\lambda_{max} = 440$ nm (Ball und Morton 1949) und überlagern somit die Absorption vieler Metarhodopsinspezies, so dass Photoprodukte des Rhodopsins als nichtspezifische Schiff'sche Basen missverstanden werden. Diese nichtspezifischen Schiff'schen Basen werden auch als Pseudophotoprodukte bezeichnet. Ein Beispiel für diese Missinterpretation ist Meta III, das immer wieder als Pseudophotoprodukt bezeichnet wurde (Übersicht: Kolesnikov *et al.* 2003).

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der alkylierten Hydroxylaminderivate MHA, EHA und *t*-BHA zeigten, dass diese schnell und effizient mit den peripheren Retinyliden-Schiff'schen Basen reagierten, aber keinen signifikanten Einfluss auf das Rhodopsin und seine lichtaktivierten Spezies (Meta II / III) hatten. Diese Resultate sind eine große Hilfe für das Verständnis der Rhodopsinstruktur und -funktion und können als Basis für zukünftige Untersuchungen sehr gut genutzt werden.

4.1.1 Die Metarhodopsin-Spezies sind HA-sensitiv

Die Retinyliden-Schiff'sche Base im lichtsensitiven Rhodopsin wird durch HA nicht beeinflusst (Abb. 3.2), weil in Lösung befindliche Substanzen in dieser Konformation keinen Zugang zur Retinalbindungstasche haben (Janz und Farrrens 2003, Rath *et al.* 1998). Die aktive Form des Rezeptors (Meta II) kann Transducin und, nach Phosphorylierung durch die Rhodopsinkinase, Arrestin binden. Diese Form des Rezeptors ist, wie schon lange bekannt, zugänglich für HA (Akhtar *et al.* 1968, Jastrzebska *et al.* 2011, Matthews *et al.* 1963, Vogel *et al.* 2003). Es stellt sich nun die Frage: An welcher Stelle der Photoaktivierungssequenz bekommt HA einen Zugang zur Retinyliden-Schiff'schen Base?

Der Einfluss auf die Retinyliden-Schiff'sche Base im Meta I wird kontrovers diskutiert (Katayama *et al.* 2010, Ratner *et al.* 1981). Die Zugänglichkeit für HA im Meta I ist durch das schnelle Meta I/Meta II-Gleichgewicht experimentell schwierig

nachzuweisen, da eine detektierbare Anhäufung von Meta I nur bei niedrigen Temperaturen möglich ist, was aber die HA-Reaktivität inhibieren könnte. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass bei pH 8 und 2 °C, wo ca. 8 % des lichtaktivierten Rhodopsins in Meta II-Form existiert (Parkes und Liebman 1984), auch bei hohen Mengen an HA (500 mM) keine Retinaloximbildung beobachtet werden konnte. Deshalb ist eine Schlussfolgerung über die HA-Sensitivität des Meta I schwierig.

Es wurde gezeigt, dass das HA im Meta II-Zustand des Rezeptors die Möglichkeit besitzt, die Retinalbindungsstelle zu erreichen (Abb. 3.2) (Akhtar *et al.* 1968, Jastrzebska *et al.* 2011, Matthews *et al.* 1963, Vogel *et al.* 2003). Die Bindung von Transducin oder Arrestin an Meta II behindert diesen Zugang zur Retinyliden-Schiff'schen Base, was durch die langsame HA-induzierte Dissoziation von Arrestin und Transducin gezeigt wurde (Hofmann *et al.* 1983, Hofmann *et al.* 1992, Piechnick *et al.* 2011 (Abb. 5, B und C)). Diese Beobachtungen sind konsistent mit der Aussage, dass HA von der zytoplasmatischen Seite, über das helikale Gerüst in den Rezeptor gelangen kann (Jastrzebska *et al.* 2011).

Die Zugänglichkeit des membrangebundenem Meta III für HA ist schon lange bekannt (Chabre und Breton 1979). Die Zugänglichkeit des in Detergenz solubilisierten Meta III für HA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 3.5). Die Rate des HA-induzierten Meta III-Zerfalls war signifikant langsamer als die des HA-induzierten Meta II-Zerfalls (Abb. 3.3 und 3.5). Diese Ergebnisse belegen, dass die Retinyliden-Schiff'sche Base in Meta III weniger gut für HA zugänglich ist. Das könnte bedeuten, dass entweder die Proteinstruktur des Rezeptors HA besser ausschließen kann oder die Reaktion mit HA durch die Isomerisierung und/oder durch den Protonierungszustand der Schiff'schen Base beeinflusst wird (Ritter *et al.* 2008). Der langsamere HA-induzierte Meta III-Zerfall im Vergleich zum HA-induzierten Meta II-Zerfall würde mit der Auffassung übereinstimmen, dass Meta III dem unbelichteten Rhodopsin ähnlicher ist als dem Meta II (Bartl und Vogel 2007).

4.1.2 Meta II und Meta III sind nicht *t*-BHA-sensitiv

Die Untersuchungen des Einflusses von *t*-BHA auf die Meta II- und Meta III-Spezies ergaben, dass Meta III komplett unempfindlich gegenüber *t*-BHA war (Abb. 3.5) und sich die Rate des Meta II-Zerfalls in Anwesenheit von 25 mM *t*-BHA bei 20 °C lediglich verdoppelte (Abb. 3.3). Die relative Unempfindlichkeit von Meta II und Meta III gegenüber *t*-BHA lässt sich durch die sperrige *tert*-Buthyl-Gruppe erklären, die verhindert, dass das *t*-BHA die Retinalbindungstasche im Opsin erreichen kann. Es wurde gezeigt, dass HA destabilisierend auf die Sekundärstruktur des Opsins wirkt

und die Struktur der extrazellulären Peptidschleife 2 (EL2) beeinflusst (Katayama *et al.* 2010), die den „Deckel“ der Retinalbindungstasche ausbildet (Janz *et al.* 2003). Die Hydroxylamino-Gruppe des *t*-BHA könnte ebenfalls die EL2 im Opsin beeinflussen, wodurch die verdoppelte Meta II-Zerfallsgeschwindigkeit in Anwesenheit von *t*-BHA erklärt werden könnte. Aufgrund dessen, dass die *tert*-Buthyl-Gruppe das Molekül im Übergangsbereich vom hydrophilen und hydrophoben Anteil der Membran verteilt und es dadurch zu einer Erniedrigung der effektiven Konzentration von *t*-BHA kommt, könnte seine Wirkung geringer ausfallen. Da aber die aufgereinigten Diskmembranen experimentell bedingt in niedriger Konzentration vorliegen, können sie nicht die gesamte Menge des *t*-BHA aufnehmen, wodurch die noch in Lösung befindlichen *t*-BHA-Verbindungen die Verdoppelung der Meta II-Zerfallsrate induzieren könnten. Dafür, dass sich *t*-BHA in der Membran und in Lösung befinden kann, spricht auch, dass alle Hydroxylaminderivate, einschließlich *t*-BHA, in Wasser löslich waren.

Die alkylierten Hydroxylaminderivate hätten theoretisch die Möglichkeit, über die relativ großen Öffnungen zwischen den Transmembranhelices in das Opsinmolekül zu gelangen (d.h. durch den postulierten, kontinuierlichen Kanal für die Aufnahme und Abgabe des Retinals in und aus der Bindungstasche, Hildebrand *et al.* 2009). Die Ergebnisse aus Abbildung 3.3 zeigten aber, dass keines der alkylierten Hydroxylaminderivate hydrophob genug ist, um komplett durch die Membran aufgenommen werden zu können und über den Ligandenkanal in das Opsinmolekül zu gelangen. Wäre das der Fall gewesen, dann wäre der Meta II-Zerfall stärker beschleunigt worden, weil die HA-Derivate die Retinyliden-Schiff'sche Base über den Ligandenkanal ungehindert hätten erreichen können.

Generell kann gesagt werden, dass der Einfluss von *t*-BHA und der anderen alkylierten Hydroxylamine auf Meta II und Meta III klein genug ist, um sie zur Unterscheidung des Meta II oder Meta III von Pseudophotoprodukten brauchbar einsetzen zu können (siehe Abschnitt 4.1.3).

4.1.3 Alkylierte Hydroxylaminderivate als molekulares Werkzeug zur Untersuchung der visuellen Signaltransduktion

Während die peripheren Retinyliden-Schiff'schen Basen (Pseudophotoprodukte) sehr schnell durch HA und *t*-BHA gespalten werden können, haben Meta II und Meta III verschiedene Abhängigkeiten von HA und *t*-BHA. Meta II in aufgereinigten Diskmembranen zerfällt in Anwesenheit von HA 50-mal schneller als in Anwesenheit von *t*-BHA (Abb. 3.3). Der Meta III-Zerfall ist in Anwesenheit von HA sehr

viel langsamer als der HA-induzierte Meta II-Zerfall, und Meta III ist komplett beständig gegen *t*-BHA (Abb. 3.3 und 3.5).

Unter Berücksichtigung dieser Unterschiede repräsentieren HA und *t*-BHA ein Werkzeug, das sehr einfach genutzt werden kann, um zwischen peripheren Retinyliden-Schiff'schen Basen und den Meta-Spezies sowie zwischen Meta II und Meta III unterscheiden zu können. Die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen peripheren Retinyliden-Schiff'schen Basen und Meta III mit Hilfe von *t*-BHA repräsentiert einen enormen Fortschritt gegenüber vorher verwendeten Methoden. Zum Beispiel identifizierten verschiedene Gruppen Meta III anhand der Orientierung des Chromophors in Bezug zur Membran, was magnetisch orientierte Diskmembranen (Chabre und Breton 1979) oder immobilisierte Einzelzellen (Kolesnikov *et al.* 2003) notwendig machte, um diese mittels dichroistischer Absorptionsspektroskopie messen zu können. Während solche Techniken für die meisten Laboratorien unerreichbar sind, ist die Anwendung von *t*-BHA eine einfache biochemische Methode zur Identifizierung von Meta III und anderen Photozerfallsprodukten des Rhodopsins. Die Untersuchung der Photozerfallsprodukte des Rhodopsins bei der Bindung von Transducin oder Arrestin wird im Folgenden als ein Beispiel beschrieben.

Da die Bindung von Transducin oder Arrestin durch *t*-BHA nicht beeinflusst wurde (Piechnick *et al.* 2011), kann nun unter Verwendung des *t*-BHA folgende Frage geklärt werden: Welche Spezies des Rhodopsins wird durch die Bindung des Arrestins stabilisiert bzw. welche Spezies des Rhodopsins stabilisiert die Bindung des Arrestins? Denn es konnte beobachtet werden, dass ein Teil des Arrestins auch noch lange nach dem Meta II-Zerfall am Opsin gebunden blieb (Piechnick *et al.* 2011 (Abb. 6B, schwarze Kurve), Gurevich und Benovic 1993, Hofmann *et al.* 1992, Sommer *et al.* 2005). Ist *t*-BHA vorhanden, bevor das Rhodopsin belichtet wird, dann wird die Bildung dieses Komplexes verhindert (Piechnick *et al.* 2011 (Abb. 6B, rote Kurve)). Bei einer Zugabe von *t*-BHA oder HA nach dem Meta II-Zerfall dissoziierten beide Verbindungen diesen Komplex, *t*-BHA tat dies deutlich langsamer als HA (Piechnick *et al.* 2011 (Abb. 6B)). Da aber dieses an Arrestin gebundene Photozerfallsprodukt sensitiver auf *t*-BHA reagierte, ist diese unbekannte Spezies nicht Meta III, wie es vorher vermutet wurde (Sommer *et al.* 2005). Diese Spezies ist höchstwahrscheinlich reversibel gebildetes Meta II, das durch die Bindung von Arrestin stabilisiert wird. Die Zugabe von HA oder *t*-BHA führte zu einer *all-trans*-Retinaloxim-Bildung, welche durch das kleinere HA schneller erfolgte als durch das größere *t*-BHA. Demzufolge verlief die Dissoziation von Arrestin in Anwesenheit von *t*-BHA deutlich langsamer als in Anwesenheit von HA.

Diese Methode kann nicht nur für aufgereinigte Komponenten verwendet werden, sondern z.B. auch für die in der Elektrophysiologie genutzten isolierten Stäbchenzellen (Fain *et al.* 2001, Leibrock und Lamb 1997). Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass der Meta III-Zerfall in Abwesenheit von Arrestin die Geschwindigkeit der Ruhepotentialbildung von Mausstäbchenzellen nach Belichtung beeinflusst (Imai *et al.* 2007). Außerdem wurde beschrieben, dass HA einen minimalen Effekt auf die Ruhepotentialbildung von Wildtypstäbchenzellen hat (Leibrock und Lamb 1997, Ripps und Pepperberg 1987). Deshalb wäre es sehr interessant, die Effekte von HA und *t*-BHA auf die Ruhepotentialbildung von Stäbchenzellen zu testen, die eine verminderte Menge an Arrestin exprimieren. Hier würde man erwarten, dass HA den Meta III-Zerfall induziert und somit die Geschwindigkeit der Ruhepotentialbildung in den Stäbchenzellen beschleunigt, während *t*-BHA keinen Effekt auf den Meta III-Zerfall hätte und dadurch eine gute Kontrolle wäre.

4.2 Indizien für einen Wasserkanal im aktivierten Rhodopsin

Die Öffnung des helikalen Gerüsts bei der Meta II-Bildung (Choe *et al.* 2011, Standfuss *et al.* 2011) ermöglicht den Einstrom gelöster Moleküle von der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors in die Bindungstasche zur Retinyliden-Schiff'sche Base (Janz und Farrens 2004, Jastrzebska *et al.* 2011, Rath *et al.* 1998). Obwohl bereits fest gebundene, strukturelle Wassermoleküle im helikalen Gerüst des unbelichteten Rhodopsins vorhanden sind (Okada *et al.* 2002), sind Wassermoleküle der umgebenen Flüssigkeit notwendig, um die Retinyliden-Schiff'sche Base hydrolysieren zu können (Janz und Farrens 2004, Jastrzebska *et al.* 2011). Nur kleine Moleküle wie Wasser, Hydroxylamin oder Borhydrid haben die Möglichkeit, das helikale Gerüst im Meta II-Zustand zu passieren und zur Retinalbindungstasche zu gelangen (Bownds und Wald 1965, Janz und Farrens 2004, Jastrzebska *et al.* 2011). Dieser Wasserkanal muss sehr selektiv für die Größe und/oder Polarität eines Moleküls sein, da das Hinzufügen einer Methylgruppe zum Hydroxylaminmolekül das Eindringen dieser Verbindung in das helikale Gerüst verhindert (Abb. 3.2 und 3.3). Dieser beschränkte Zugang über den Wasserkanal wird auch durch den hyperbolischen Verlauf der Hydroxylamintitrationskurve widerspiegelt (Abb. 3.4). Die Reaktion von Hydroxylamin mit der Retinyliden-Schiff'schen Base ist ein Prozess in zwei Schritten – Ein Vorgleichgewicht, in dem Hydroxylamin die Retinalbindungstasche erreicht, gefolgt durch die Aminolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base. Die hohe apparente K_d von 60 mM (Abb. 3.4) deutet an, dass auch Hydroxylamin nicht einfach das helikale Gerüst passieren kann. Dieses könnte dementsprechend die obere Grenze der Größe

repräsentieren, die Moleküle maximal haben dürfen, um die Retinalbindungstasche im Meta II erreichen zu können. Die geringere Größe könnte erklären, warum ein kontinuierlicher Wasserkanal in der Meta II-Kristallstruktur nicht sichtbar ist (Choe *et al.* 2011, Standfuss *et al.* 2011).

4.3 Die Aufnahme und Abgabe des Retinals durch einen hypothetischen Ligandenkanal im aktivierten Rhodopsin

Durch die Strukturaufklärung des aktiven Opsins (Opsin*) (Park *et al.* 2008, Scheerer *et al.* 2008) in Kombination mit computergestützten Methoden konnte ein Kanal identifiziert werden, der die Retinalbindungstasche mit der hydrophoben Membrenumgebung verbindet (Hildebrand *et al.* 2009). Dieser Kanal ist ebenfalls in der Struktur der aktiven Meta II-Konformation des Rezeptors geöffnet (Choe *et al.* 2011, Standfuss *et al.* 2011), wohingegen der Kanal im 11-*cis*-Retinal-gebundenen inaktiven Rhodopsinzustand geschlossen ist (Palczewski *et al.* 2000). Für die inaktive Opsinkonformation, die vorwiegend unter neutralem pH-Wert und in nativen Membranen existiert (Vogel und Siebert 2001), konnte bis heute keine Kristallstruktur ermittelt werden. In dieser Arbeit gewonnene Ergebnisse deuten aber auf eine geschlossene, mehr dem Dunkelzustand entsprechende Opsinkonformation hin (siehe Abschnitt 4.3.7).

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, wie die Aufnahme und Abgabe des Retinals durch einen Austausch von Aminosäuren an den Engstellen entlang des Retinalkanals im Opsinmolekül beeinflusst wurde und welche Faktoren für die Bildung des Rhodopsins (Aufnahme des 11-*cis*-Retinals) bzw. für den Zerfall des Meta II (Abgabe des all-*trans*-Retinals) verantwortlich sind.

4.3.1 Effekte der Mutationen im Retinalligandenkanal auf die Struktur und Funktion des Rezeptors

Der Austausch der Aminosäuren entlang des Retinalligandenkanals führte zu veränderten UV/Vis-spektroskopischen Absorptionseigenschaften, wie die Rot- oder Blauverschiebung des λ_{\max} der protonierten Schiff'schen Base (SBH⁺) im lichtsensitiven Rhodopsinzustand (Abb. 3.9). Die Rot- oder Blauverschiebung der Absorption der SBH⁺ im lichtsensitiven Rezeptorzustand zeigt, dass Wechselwirkungen mit der SBH⁺, die Form der Bindungstasche oder das interne Wassernetzwerk durch die Mutationen der Aminosäuren verändert werden. Des Weiteren könnten ausgetauschte Aminosäureseitenketten die Lage des Retinals

4 DISKUSSION

innerhalb der Bindungstasche verändern (Crocker *et al.* 2006) und somit über die Polyenkette des Retinals wiederum einen Effekt auf die SBH⁺ haben (z.B. M207A und A272V/I/F).

Neben den Veränderungen der Absorptionseigenschaften im lichtsensitiven Rhodopsin zeigten einige Rezeptormutanten nach Lichtaktivierung eine Verschiebung des Meta I/Meta II-Gleichgewichts (Abb. 3.10). Diese Verschiebung macht deutlich, dass nach Belichtung bei einigen Mutanten durch den Aminosäureaustausch der Mechanismus des Übergangs von Meta I (protonierte Schiff'sche Base, SBH⁺) zu Meta II (deprotonierte Schiff'sche Base, SB) gestört ist. Das all-*trans*-Retinal und seine C9-Methylgruppe sorgen innerhalb der Bindungstasche dafür, dass die Donor- und Akzeptorseitenketten für die Protontransferreaktion optimal zueinander arrangiert sind und stabilisieren somit die aktive Meta II-Konformation (Meyer *et al.* 2000). Eine Beeinflussung der Lage des Retinals durch Mutationen im Ligandenkanal könnte diese optimale Ausrichtung der Seitenketten stören und somit den Protonentransfer behindern. Die Mutanten, die einen signifikanten Anteil Meta I aufwiesen, erstrecken sich über die gesamte Länge des Ligandenkanals, was den Schluss zulässt, dass eine Mutation der Aminosäuren innerhalb des Ligandenkanals einen Effekt auf das gesamte Netzwerk in der Bindungstasche haben könnte.

Die katalytische Funktion des lichtaktivierten Rhodopsins auf das G_t-Protein wurde durch die Mutationen im Ligandenkanal, mit Ausnahme der K296G-Mutante (nähere Details dazu, siehe Abschnitt 4.3.6), nur wenig beeinflusst (Abb. 3.11a). Das bedeutet, dass die Mutationen im Bereich des Ligandenkanals generell einen geringen Effekt auf die Ausbildung der G_t-Proteinbindungsdomäne haben. Überraschend ist jedoch, dass bei den Rhodopsinmutanten keine Korrelation zwischen der Bildung von Meta I (Abb. 3.10) und der G_t-Proteinaktivierung erkennbar war. Da gezeigt wurde, dass die G_t-Proteinbindung am Meta II erfolgt (Bennett *et al.* 1982, Emeis *et al.* 1982, Hofmann 1985), hätte sich die G_t-Proteinaktivierung, durch die mutationsbedingte Verschiebung des Meta I/Meta II-Gleichgewichts auf Meta I verlangsamen müssen. Die Ergebnisse aus den Abbildungen 3.10 und 3.11a würden dafür sprechen, dass die hier bestimmte Meta I-Spezies strukturelle Eigenschaften von Meta II besitzen muss, die es dem G_t-Protein ermöglichen, an den Rezeptor zu binden. Die basale Aktivität des ligandenfreien Opsins wurde durch einige Mutationen stark erhöht (Abb. 3.11b). Das zeigt, dass einige Mutationen im ligandenfreien Opsin eine partiell aktive Struktur induzieren können, die es dem G_t-Protein ermöglicht, an das Opsin zu binden. Die größeren Abweichungen der basalen Opsinaktivität der Mutanten im Vergleich zu relativ geringen Abweichungen der lichtaktivierten Rhodopsinmutanten (Meta II)

könnten durch die *all-trans*-Retinal-vermittelte Stabilisierung der Meta II-Konformation erklärt werden (Meyer *et al.* 2000).

4.3.2 Mutationen der Aminosäureseitenketten entlang des Retinalligandenkanals haben einen weitreichenden Einfluss auf die gesamte Funktion der Bindungstasche

Basierend auf der computergestützten Identifizierung des Ligandenkanals mit seinen vier Engstellen im Opsin* (Abb. 1.15) sollte die ortsgerichtete Mutagenese an diesen Engstellen durch den Einbau größerer, kleiner oder geladener Aminosäureseitenketten Aufschluss über den Einfluss des Kanals bei der Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden sowie über die Zuordnung der Öffnungen zur Aufnahme und Abgabe geben.

Die Annahme, dass die Mutationen an den Engstellen im Ligandenkanal als lokale Sonden für die Untersuchung der Retinalpassage dienen könnten, würde z.B. die Mutation der Thr289-Aminosäure bestätigen, die Teil der Engstelle 1 an TM7 ist (siehe Abb. 1.15). Die Mutation von Thr289 zum größeren Phenylalanin führte zu einer sehr langsamen Aufnahme des 11-*cis*-Retinals und einer nur wenig veränderten Abgabegeschwindigkeit des *all-trans*-Retinals (Abb. 3.13). Die Mutation von Thr289 zur kleinen Aminosäure Alanin hatte dagegen nur einen sehr kleinen Effekt auf die Aufnahmegeschwindigkeit des 11-*cis*-Retinals und zeigte ebenso wie die Thr289Phe-Mutation keinen ausgeprägten Effekt auf die Abgabe des *all-trans*-Retinals (Abb. 3.13). Der Austausch des Thr289 durch ein Phenylalanin könnte im Bereich der Öffnung A zu einem Hindernis führen, das die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals in die Bindungstasche erschwert. Diese Ergebnisse würden für eine Aufnahme des 11-*cis*-Retinals über die Öffnung A sprechen, was mit früheren Zuordnungen übereinstimmen würde (Hildebrand *et al.* 2009, Wang und Duan 2011). Dagegen sprechen aber die Ergebnisse der Mutationen der Phenylalanin-Seitenketten (Phe208, Phe273 und Phe276) an der Öffnung B. Die Mutationen zum hydrophoben Leucin oder neutralen Glutamin zeigten, dass die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals ebenso wie bei den Thr289-Mutationen verlangsamt war und die erwartete beschleunigte Abgabe des *all-trans*-Retinals nicht auftrat (Abb. 3.13).

Die Mutanten der Phe293 (Öffnung A) zeigten weder einen Einfluss auf die Aufnahme noch auf die Abgabe des Liganden. Diese Aminosäureseitenkette zeigt zwar die größten konformationellen Änderungen zwischen der Rhodopsin- und aktiven Opsinstruktur (Park *et al.* 2008), könnte aber durch seine auswärts gerichtete Lage in

Detergenz sehr flexibel sein, wodurch Mutationen an dieser Stelle die Rezeptorstruktur und -funktion nicht beeinflussen.

Dadurch, dass Mutationen am Phe293 (Öffnung A) keine Effekte auf die Retinalaufnahme und -abgabe hatten, Mutationen am Thr289 (Öffnung A) ausschließlich Effekte auf die Retinalaufnahme zeigten und Mutationen am Phenylalaninring (Phe208, Phe273 und Phe276), die die Öffnung B erweitern sollten, keine Effekte auf die Abgabe des Retinals hatten, aber die Aufnahme verlangsamten, können die einzelnen Mutationen nicht als lokale Sonden interpretiert werden, und daher kann auch keine Aussage über die Richtung der Retinalpassage gemacht werden.

Die Retinalaufnahme- und -abgabekinetiken aller Mutanten dieser Untersuchung zeigten, dass die Mutationen nicht begrenzt auf ihre lokale Umgebung im Protein wirken. Die Mutationen der Seitenketten des Ligandenkanals stören eher ein Netzwerk innerhalb des Proteins, was weitreichende Effekte auf die gesamte Funktion und Struktur des Rezeptors hat. Aufgrund dessen, dass die Effekte mit zunehmender Nähe zur Bindungstasche immer größer werden, könnte hier der Mittelpunkt dieses Netzwerks angenommen werden.

4.3.3 Die Retinalpassage ist unidirektional

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch Opsin (Bildung von Rhodopsin) nahezu irreversibel ist, da das intramolekulare Wasserstoffbrückennetzwerk die thermische Retinalisomerisierung sowie die Schiff'sche Base-Hydrolyse verhindert und demzufolge den lichtsensitiven Zustand des Rhodopsins stabilisiert (Liu *et al.* 2011a, Liu *et al.* 2011b). Mit anderen Worten, wenn nach der Bildung der 11-*cis*-Retinyliden-Schiff'schen Base die strukturellen Änderungen zum Rhodopsin erfolgen und der Rezeptor sich wie eine „Mausefalle“ schließt, ist die Abgabe von 11-*cis*-Retinal bzw. der Austausch durch ein anderes Retinal extrem langsam (in Froschstäbchenzellen *ca.* 10^{-7} s^{-1} pro Rhodopsin, Defoe und Bok 1983).

Für einen unidirektionalen Weg der Retinalpassage (Heck *et al.* 2003b, Hildebrand *et al.* 2009, Schädel *et al.* 2003) spricht, dass die meisten Mutationen (Öffnung A und B) dieser Studie unterschiedlich starke Effekte auf die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden haben. Würden beide Retinale nur durch eine der beiden Öffnungen aufgenommen und abgegeben werden, dann wären Effekte der Mutationen mehrheitlich auf einer Seite des Ligandenkanals zu erwarten (Öffnung A oder B). In einigen Fällen war außerdem die Aufnahme verlangsamt, die Abgabe aber

beschleunigt (Abb. 3.13, T94A (Öffnung A) und V204F (Öffnung B)), was zeigt, dass eine einzelne Mutation die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals anders beeinflusst als die Abgabe des all-*trans*-Retinals. Alles zusammen spricht also dafür, dass die Aufnahme und Abgabe des Retinals nicht durch die selbe Öffnung erfolgt und deshalb ein unidirektionaler Weg für die Retinalpassage angenommen werden kann.

4.3.4 Die Aufnahme des inversen Agonisten 11-*cis*-Retinal benötigt die aktive Rezeptorkonformation

Die Regeneration des Rhodopsins beinhaltet die Aufnahme und richtige Positionierung des 11-*cis*-Retinals in der Bindungstasche, die Protonierung der Schiff'schen Base und wird durch die konformationelle Änderung der Rezeptorstruktur zum lichtsensitiven Zustand abgeschlossen.

Die Untersuchung der Bindung des CT α -Peptids (hochaffines C-terminales Ende des G $_t\alpha$ -Proteins) an Opsin zeigte, dass Opsin durch die Bindung in einer aktiven Konformation gehalten werden kann (Opsin*) (Abschnitt 4.4) (Vogel und Siebert 2001). Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch einen niedrigen pH-Wert eine höhere Menge Opsin* vorliegt (Vogel und Siebert 2001). Damit ist nachgewiesen, dass mindestens zwei Opsinspezies (Opsin und Opsin*) existieren und im Gleichgewicht vorliegen. Dieses Gleichgewicht kann durch die Bindung des CT α -Peptids, den pH-Wert und weitere Faktoren beeinflusst werden. Der Vergleich der Strukturen von Rhodopsin und Opsin* legt nahe (Palczewski *et al.* 2000, Park *et al.* 2008), dass durch die Neuausrichtung der TM5 und TM6 im aktiven Zustand (Opsin*) die Rotation der Seitenketten hervorgerufen wird, wodurch die Öffnung B des Retinalkanals entsteht (Abb. 3.6). Die Öffnung A muss dagegen ausschließlich durch Rotation der Aminosäureseitenketten entstehen, weil keine Bewegung der TM1 und TM7 erkennbar ist (Abb. 3.6). In dieser Arbeit wird nun vermutet, dass der Ligandenkanal nur in der aktiven Konformation des Rezeptors existiert, was bedeuten würde, dass sich die beiden Opsinspezies strukturell unterscheiden. Die aktive Opsinkonformation weist den geöffneten Ligandenkanal auf, wohingegen die inaktive Konformation mehr der des Rhodopsins entspricht und eine von der Rezeptorumgebung abgeschlossene Bindungstasche besitzt.

Die Regeneration im Wildtyp des Rhodopsins ist langsam, kann aber durch die Erhöhung der Menge an 11-*cis*-Retinal bis zur hyperbolischen Sättigung beschleunigt werden. Das bedeutet, dass das Retinal in einem Vorgleichgewicht an Opsin bindet und anschließend ein nahezu irreversibler Übergang in den Rhodopsindunkelzustand

4 DISKUSSION

erfolgt (Matsumoto und Yoshizawa 1975, 2008). Die einfachste Erklärung dieses Mechanismus wäre, dass der Ligandenkanal sowohl im inaktiven (Opsin) als auch im aktiven Opsin (Opsin*) geöffnet ist und ein Vorgleichgewicht die Menge des Retinals innerhalb und außerhalb der Bindungstasche bestimmt. Andererseits ergaben die Untersuchungen an intakten Stäbchenzellen, dass die exogene Zugabe von 11-*cis*-Retinal zu einer transienten Aktivierung der Phototransduktionskaskade führt (Kefalov *et al.* 2001). Diese Ergebnisse werden durch Kefalov und Kollegen so interpretiert, dass, bevor Rhodopsin gebildet wird, 11-*cis*-Retinal nichtkovalent mit ligandenfreiem Opsin interagiert und es dadurch aktiviert. Die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals zur Regeneration des Rhodopsins setzt also die aktive Opsinkonformation voraus.

Es stellt sich die Frage, ob 11-*cis*-Retinal den im Gleichgewicht vorliegenden Anteil an aktiviertem Opsin benötigt, um aufgenommen werden zu können (*Conformational-Selection*) oder ob es die aktive Opsinkonformation selbst induziert (*Induced-Fit*) (vgl. Hammes *et al.* 2009). Da aber unter physiologischen Bedingungen nur ca. 0,1 % des Opsins in aktivem Zustand vorliegt (Vogel und Siebert 2001) und dadurch die Regeneration über den *Conformational-Selection*-Mechanismus extrem langsam wäre, kann von einem *Induced-Fit*-Mechanismus ausgegangen werden.

Die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals kann aber nicht ausschließlich über das 11-*cis*-Retinal-induzierte Opsin*/Opsin-Gleichgewicht gesteuert werden, da die Verschiebung des Gleichgewichts zu Opsin* durch die Anwesenheit des CT α -Peptids zu keiner Beschleunigung der Regeneration führte (Abb. 3.19a). Das würde bedeuten, dass ein weiterer regulatorischer Mechanismus existieren muss, der neben der benötigten aktiven Opsinkonformation die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals steuert. Diese Rolle könnte die Kanalengstelle am Lys296^{7.43} spielen (nahe der Öffnung A), die durch die Aminosäureseitenkette des Tyr268^{6.51} gesteuert werden könnte. Die Mutation des Tyr268^{6.51} zu Phenylalanin, bei dem die Hydroxylgruppe an der aromatischen Seitenkette fehlt, führte zu einer stark verlangsamten Aufnahme des 11-*cis*-Retinals (Abb. 3.13). Der gleiche Effekt konnte beim Austausch des Tyr268^{6.51} durch Glutaminsäure beobachtet werden, die zwar eine Hydroxylgruppe besitzt, aber über keinen Benzolring verfügt (Abb. 3.13). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kombination aus Hydroxylgruppe und Benzolring (Tyrosinseitenkette) bei der regulatorischen Aufgabe des Tyr268^{6.51} während der Regeneration entscheidend ist. Durch das Entfernen eines der beiden wird eine Interaktion zwischen Lys296^{7.43} und Tyr268^{6.51} nicht mehr möglich. Kann Lys296^{7.43} keine Wasserstoffbrückenbindung zum Tyr268^{6.51} aufbauen, bleibt Lys296^{7.43} ein Teil des Ser186^{EL2}-Glu181^{EL2}-Netzwerkes,

wodurch diese Engstelle den Ligandenkanal blockiert und das Retinal seine Bindungsstelle nicht erreicht. Ausschließlich die Rotamerstellung des Lys296^{7.43}, die eine Wasserstoffbrückenbindung zum Tyr268^{6.51} zulässt, öffnet einen kontinuierlichen Kanal (Hildebrand *et al.* 2009). Die Änderung der Rotamerstellung des Lys296^{7.43} und somit die Erweiterung der Engstelle 1 könnte durch 11-*cis*-Retinal induziert werden, wodurch dieses seine eigene Aufnahme steuern würde.

Die durch 11-*cis*-Retinal induzierte Gleichgewichtsverschiebung auf Opsin* könnte die erste Stufe des Aufnahmeprozesses sein, gefolgt von dem, durch 11-*cis*-Retinal induzierten, Öffnen der sogenannten Lys296-Schranke. Da bei diesem Prozess keine Konkurrenz mit all-*trans*-Retinal auftritt, muss davon ausgegangen werden, dass die Affinität des 11-*cis*-Retinals für die Lys296^{7.43}-Bindungsstelle um ein Vielfaches höher ist als die des all-*trans*-Retinals oder dass all-*trans*-Retinal durch die Öffnung B entweicht, ohne eine kovalente Verknüpfung im Protein auszubilden.

4.3.5 Die Abgabe des Agonisten all-*trans*-Retinal wird durch die Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base bestimmt

Die Geschwindigkeit des lichtinduzierten Meta II-Zerfalls wird durch die Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base und die Abgabe des all-*trans*-Retinals durch das Opsinmolekül bestimmt (Farrens und Khorana 1995). Die anfängliche Annahme, dass die Mutationen der im Ligandenkanal lokalisierten Aminosäuren entweder zu einer Verengung oder Aufweitung des Kanals und demnach zu einer veränderten Meta II-Zerfallsgeschwindigkeit führen könnten, konnte durch diese Arbeit nicht bestätigt werden. Wie können also die verschiedenen Meta II-Zerfallsraten durch die Mutationen erklärt werden?

Hydroxylamin ersetzt Wasser in der Spaltungsreaktion der Schiff'schen Base und beschleunigt den Meta II-Zerfall. Die Aminolyse der Schiff'schen Base folgt einem bimolekularen Reaktionsschema (Hofmann *et al.* 1983) mit einer hyperbolischen Sättigungskurve (Abb. 3.4). Die Zerfallsreaktion in Anwesenheit von HA wird um das bis zu 300-fache beschleunigt (Abb. 3.4), was zeigt, dass die Abgabe des gebildeten Retinaloxims sehr schnell erfolgt, sobald die Schiff'sche Base gespalten ist. Das wird durch die Mutation der Lys296 zu Glycin und die Verwendung eines *n*-Propyl-Retinylidens (PrSB) anstelle des Retinals bestätigt. Da in diesem Fall keine kovalente Verknüpfung des *n*-Propyl-Retinylidens zum Apoprotein besteht, muss auch keine Hydrolyse stattfinden, damit das *n*-Propyl-Retinyliden das Protein verlassen kann. Die Abgabe des *n*-Propyl-Retinylidens durch die K296G-Mutante ist um das 400-fache beschleunigt (Abb. 3.15) (Matsuyama *et al.* 2010), was dem Meta II-Zerfall des Wildtyps

4 DISKUSSION

unter sättigenden HA-Bedingungen entspricht. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass im Wildtyp die Hydrolyse der Schiff'schen Base der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Meta II-Zerfalls ist (Janz und Farrens 2001).

In der definierten Umgebung der Schiff'schen Base führen Änderung in der Bindungstasche zu Störungen der Lage des Retinals und Lys296, was Effekte auf die Hydrolysereaktion hat. Diese Änderungen in der Bindungstasche durch den Austausch einer Aminosäure können über die Proteinstruktur oder über den Liganden selbst die Umgebung der Schiff'schen Base stören.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Meta II-Zerfalls der Mutanten in An- und Abwesenheit des HA zeigen, dass das Wirkungsprofil des Meta II-Zerfalls der Mutanten erhalten bleibt, wobei in Anwesenheit des HA die Gesamtreaktion schneller abläuft (Abb. 3.14a). Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass der initiale bimolekulare Schritt durch die Mutationen beeinflusst wird. Dieser initiale bimolekulare Schritt führt zur Bildung der Carbinolaminzwischenstufe im Meta II, gefolgt von der Spaltung der all-*trans*-Retinyliden-Bindung (im Fall des HA als Nukleophil ist Aminoal die entsprechende Zwischenstufe bei der Aminolyse mit Oxim als Produkt) (Abb. 4.2). Die Schiff'sche Base und das Nukleophil (Wasser oder Hydroxylamin) nehmen als Reaktionspartner an dieser bimolekularen Reaktion teil. Das Hydroxylamin erhöht die Wirksamkeit des nukleophilen Angriffs, worin die beschleunigte Abgabe des Retinals begründet liegt (Abb. 3.14). Durch mutationsbedingte Änderungen der Proteinstruktur kann es zu einer Änderung der Umgebung der Schiff'schen Base kommen. Dadurch wird der nukleophile Angriff beeinflusst, was sich im gleichen Wirkungsprofil des Meta II-Zerfalls der Kanalmutanten mit und ohne HA widerspiegelt.

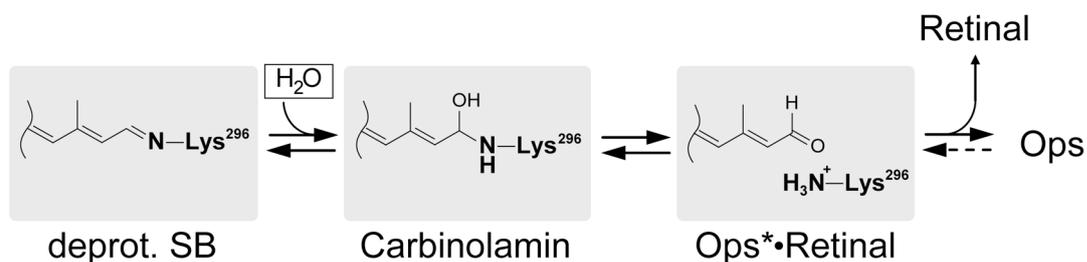


Abbildung 4.2: Hydrolyse der deprotonierten Retinyliden-Schiff'schen Base (deprot. SB). Die deprotonierte SB liegt im Meta II vor und ist Voraussetzung für die Hydrolyse der SB. Die Hydrolyse der deprot. SB erfolgt über die Bildung der Carbinolaminzwischenstufe durch Bindung von Wasser (H₂O) aus der SB-Umgebung, gefolgt von der Spaltung der Retinyliden-Bindung, wodurch Retinal sich zwar noch in der Bindungstasche befindet, aber nicht mehr kovalent mit dem Lys296^{7,43} im Opsin verknüpft ist. Danach verlässt das Retinal das Opsin.

Die Lage des Meta I/Meta II-Gleichgewichts liegt auf der Seite des Meta II. Die im Meta II deprotonierte Schiff'sche Base wird in der Bindungstasche durch die Protonierung des Gegenions (Glu113^{3,28}) stabilisiert. Die Aufnahme des Nukleophils

(Wasser oder Hydroxylamin) führt zu einer instabilen Carbinolaminzwischenstufe der Retinyliden-Bindung, die durch die Spaltung der Retinyliden-Bindung ins Opsin*•all-*trans*-Retinal-Addukt übergeht (Abb. 4.2). Da die Carbinolaminzwischenstufe instabil ist, existiert sie im Gegensatz zur stabilisierten, deprotonierten Schiff'schen Base des Meta II in einer sehr niedrigen Konzentration. Weil die Hydrolyse der Schiff'schen Base diese Zwischstufe überwinden muss, wird die Gesamtgeschwindigkeit des Meta II-Zerfalls durch die Menge an Carbinolamin bestimmt.

Es stellt sich aber noch die Frage, warum der Austausch einer Aminosäureseitenkette in der Nähe der Öffnungen, relativ weit entfernt von der Schiff'schen Base, Effekte auf ihre Bildung und Hydrolyse hat. Ein Beispiel für eine solche Aminosäure ist Ala272, die sich an der TM6 in der Nähe des retinalen β -Iononrings innerhalb der Bindungstasche befindet. Der Austausch dieser Aminosäure durch Aminosäuren mit größeren Seitenketten sollte den Ligandenkanal im Bereich der Öffnung B verengen und somit die Abgabegeschwindigkeit des all-*trans*-Retinals verlangsamen. Der Austausch durch ein leicht größeres Valin führte aber zu einer schnelleren Abgabe des Retinals (4,2-fach), das noch größere Isoleucin zeigte eine um das 14-fache beschleunigte Abgabe, wohingegen das große und starre Phenylalanin keinen Effekt auf die Retinalabgabe hatte. Die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch diese drei Mutanten war dagegen generell verlangsamt und zeigte mit zunehmender Größe der ausgetauschten Seitenkette eine stärkere Reduzierung der Regenerationsgeschwindigkeit (Abb. 3.13a). Die Aminosäure befindet sich in unmittelbarer Nähe zum β -Iononring des Retinals. Das könnte bedeuten, dass der Einbau einer größeren Aminosäureseitenkette die Lage des Retinals innerhalb der Bindungstasche stört. Das spiegelt sich auch in der Regenerationsgeschwindigkeit dieser Mutanten wider. Je größer die Seitenkette ist, desto langsamer ist die Regeneration, weil es schwieriger für das Retinal ist, seine richtige Position in der Bindungstasche zu finden, um die Bildung der Schiff'schen Base zu ermöglichen. Die beschleunigte Abgabe des Retinals durch die A272-Mutanten lässt sich ebenfalls durch die gestörte Positionierung des Retinals erklären. Das Retinal überträgt über seine Polyenkette die gestörte Positionierung seines β -Iononrings auf die Umgebung der Schiff'schen Base (Gegenion und gesamtes Wassernetzwerk innerhalb der Bindungstasche) und könnte somit Einfluss auf die Hydrolysereaktion haben. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen der Glu122Gln- und Ile189Pro-Mutanten (Imai *et al.* 1997, Kuwayama *et al.* 2002). Die beiden Seitenketten Glu122 und Ile189 im Opsin der Stäbchenzellen sind in den grünen Pigmenten der Zapfenzellen durch Glutamin

und Prolin ersetzt und bestimmen die Unterschiede in der Geschwindigkeit der Regeneration und des Meta II-Zerfalls zwischen Rhodopsin und dem Zapfenzellenpigment. Der Austausch von Glu122 durch das im Pigment der grünen Zapfenzellen zu findende korrespondierende Glutamin führte zu einem 20-fach schnelleren Meta II-Zerfall (Imai *et al.* 1997). Der Austausch von Ile189 durch das ebenfalls im Pigment der grünen Zapfenzellen zu findende korrespondierende Prolin führte zu einem zweifach schnelleren Meta II-Zerfall (Kuwayama *et al.* 2002). Diese beiden Seitenketten befinden sich wie die Ala272-Seitenkette in der Nähe des retinalen β -Iononrings und bestätigen, dass die Positionierung des Retinals innerhalb der Bindungstasche Einfluss auf die Hydrolysereaktion hat.

Diese sehr komplexen Anforderungen an die Positionierung der Seitenketten und Reaktionspartner zur Bildung oder Hydrolyse der Schiff'schen Base sind vermutlich auch bei anderen Kanalmutanten gestört und zeigen, dass die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden ein sehr fein abgestimmtes Wechselspiel zwischen Rezeptor und Ligand benötigt.

4.3.6 Ein hypothetischer Wasserkanal könnte mit dem Ligandenkanal funktionell gekoppelt sein

Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrolysereaktion exogenes Wasser benötigt und dass das Nukleophil von der cytoplasmatischen Seite in den Rezeptor eindringen kann (Jastrzebska *et al.* 2011). Es wird daher vermutet, dass ein Wasserkanal existiert, der die cytoplasmatische Umgebung des Rezeptors mit der Retinalbindungstasche im aktiven Opsinmolekül (Opsin*) verbindet und den Zugang der Nukleophile vermittelt (Abb. 4.3 und Abschnitt 4.2) (Angel *et al.* 2009, Jastrzebska *et al.* 2011, Piechnick *et al.* 2011). Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen vermuten, dass dieser Wasserkanal funktionell mit dem Ligandenkanal gekoppelt ist, da Mutationen im Ligandenkanal die Geschwindigkeit der wasserinduzierten Hydrolyse der Schiff'schen Base und die darauffolgende Abgabe des Retinals beeinträchtigen können.

Indizien für einen Wasserkanal sind in den unterschiedlichen Wirkungsprofilen des Meta II-Zerfalls einiger Kanalmutanten (M44F, S186A und A292V/F) in An- und Abwesenheit von Hydroxylamin (HA) oder *o*-Methyl-Hydroxylamin (MHA) zu finden. Diese Mutationsstellen befinden sich in unmittelbarer Nähe zur Schiff'schen Base.

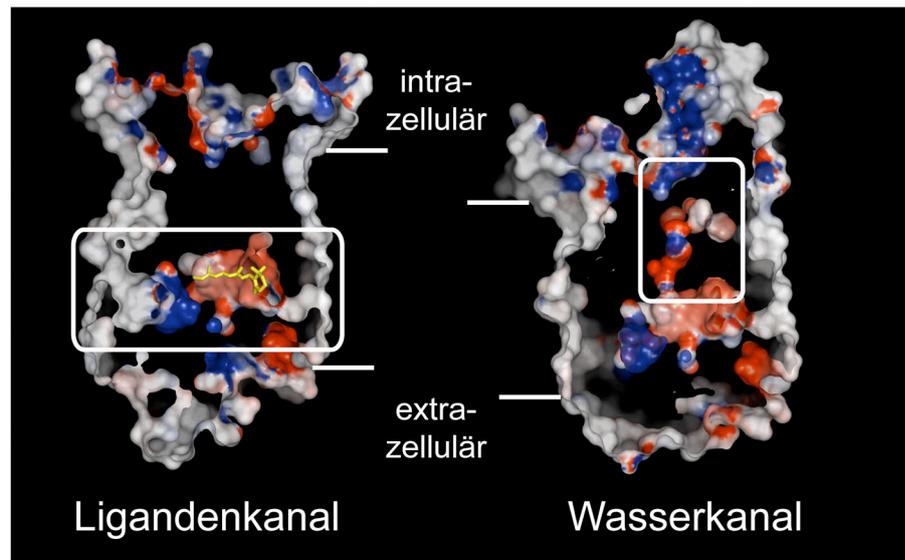


Abbildung 4.3: Hypothetischer Liganden- (links) und Wasserkanal (rechts). Die computergestützte Berechnung der Oberfläche der Meta II-Kristallstruktur (PDB: 3PXO) verdeutlichte den Ligandenkanal (links), den hypothetischen Wasserkanal (rechts), sowie die Verknüpfung beider Kanäle im Bereich der Bindungstasche. Die rechte Meta II-Struktur (Wasserkanal) ist um ca. 90 ° in ihrer Längsachse gedreht. Die elektrostatischen Oberflächenpotentiale der Meta II-Struktur sind mit ± 30 kT/e negativ (rot) und positiv (blau) geladenen Oberflächenarealen konturangepasst und verdeutlichen die polaren und unpolaren Regionen des Proteins. Die Abbildung wurde mit der PyMol-Software (www.pymol.org) erstellt.

Die Mutation der Met44 zu Phenylalanin zeigte eine beschleunigte Hydrolyse in Abwesenheit eines Hydroxylamins. Die Anwesenheit von HA oder MHA führte aber zu einem weniger starken (MHA) oder überhaupt keinem (HA) Effekt auf den Meta II-Zerfall der Mutante im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.14). Das bedeutet, dass die beschleunigte Hydrolyse mit Wasser durch eine bessere Zugänglichkeit der Retinyliden-Schiff'schen Base für Wasser erklärt werden kann. Der aufgehobene Effekt gegenüber der Kontrolle in Anwesenheit von HA zeigt, dass die Zugänglichkeit für HA nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war. Der weniger starke Effekt auf die Hydrolyse der Schiff'schen Base in Bezug zur Kontrolle in Anwesenheit von MHA bestätigt diese Aussage. Das bedeutet, dass die Aminosäure Met44 Teil des hypothetischen Wasserkanals sein könnte und Änderungen an dieser die Zugänglichkeit für Wasser erhöhen, wodurch die Hydrolyse der Schiff'schen Base beschleunigt wird.

Das Zusammenspiel aller Faktoren des Meta II-Zerfalls ist sehr komplex. Allgemein kann aber gesagt werden, dass die Zugänglichkeit der Bindungstasche für Wasser oder HA mitbestimmend für die Geschwindigkeit der Hydrolyse ist. Verändern Mutationen diese Zugänglichkeit, dann hat das Einfluss auf die durch das Nukleophil induzierte Spaltung der Schiff'schen Base.

4.3.7 Detailliertes Schema der Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden

In dieser Arbeit wird postuliert, dass der inaktive Opsinzustand (Opsin) mit einem geschlossenen Retinalkanal korreliert, während die aktive Opsinkonformation (Opsin*) den geöffneten Retinalkanal präsentiert. In diesem Zusammenhang ist der Kanal ausschließlich im Rhodopsin (11-*cis*-Retinyliden-Opsin) und in der inaktiven ligandenfreien Konformation des Opsins geschlossen. Die anderen Zustände des Opsins weisen als aktive Konformation den geöffneten Retinalkanal auf. Der Prozess des Öffnens und Schließens des Kanals wird durch das Umschalten zwischen der Opsin- und Opsin*-Konformation gesteuert. Zu welchem Zeitpunkt nach der Lichtaktivierung der Rhodopsinstruktur der Ligandenkanal geöffnet wird, kann nicht gesagt werden. Es ist aber bekannt, dass der Ligandenkanal im Meta II-Zustand existiert (Choe *et al.* 2011). Sobald der Kanal durch die Bildung der aktiven Konformation geöffnet ist, bestimmt die Bildung und Hydrolyse der Schiff'schen Base die Geschwindigkeit der Regeneration des Rhodopsins und des Meta II-Zerfalls. Die lokalen Eigenschaften der Öffnungen spielen bei diesen beiden Prozessen (Regeneration und Meta II-Zerfall) eine untergeordnete Rolle. Um diese Beobachtungen beschreiben zu können, wurde ein detailliertes Schema erstellt, in dem postuliert wird, dass ausschließlich die Opsin- und Opsin*-Konformation des Apoproteins existieren. Das lichtensitive Rhodopsin und das aktive Meta II beschreiben die durch 11-*cis*- und all-*trans*-Retinal stabilisierten Formen des inaktiven und des aktiven Opsins.

Beide Prozesswege (Regeneration und Meta II-Zerfall) basieren auf einem Umschalten zwischen der Opsin- und Opsin*-Konformation und ihren ligandenstabilisierten Formen (Rhodopsin und Meta II). Die Regeneration des Rhodopsins verläuft über eine Sequenz von zwei Schaltern. Der erste Schalter beschreibt die Konformationsänderung von Opsin zu Opsin*, wodurch der Ligandenkanal geöffnet wird. Der zweite Schalter beschreibt die Bildung der inaktiven Rhodopsinkonformation durch die Aufnahme von 11-*cis*-Retinal über den Ligandenkanal des Opsin* (Opsin* zu Opsin-11-*cis*-Retinal). Der Meta II-Zerfall hingegen erfolgt nur über *einen* Schalter, der das Umschalten von Opsin*-all-*trans*-Retinal zum inaktiven Opsin beschreibt.

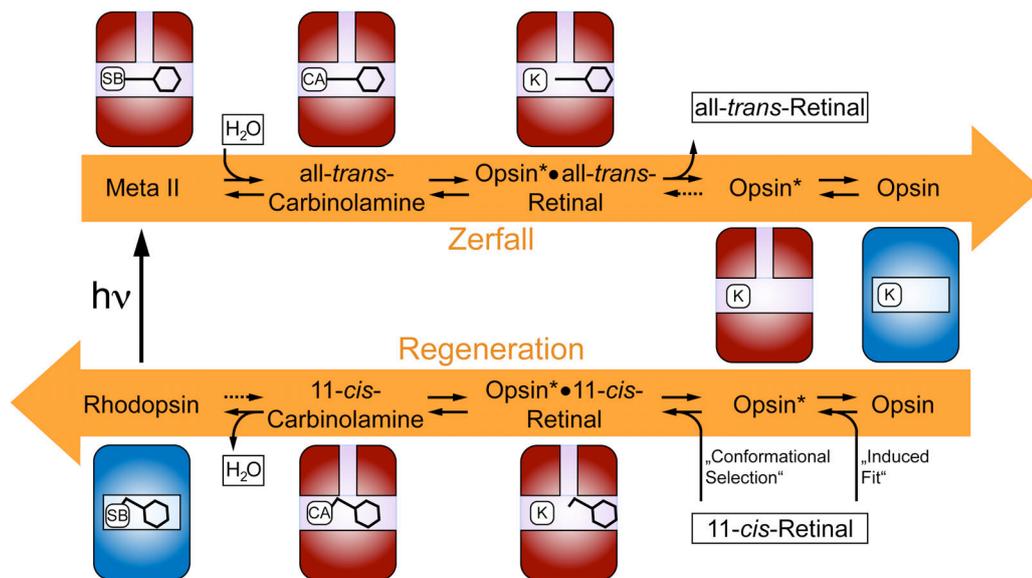


Abbildung 4.4: Aktivierungs-/Deaktivierungskreislauf des Rhodopsins. Im Meta II ist der Ligand all-*trans*-Retinal kovalent an das Lys296 (K) des Opsinapoproteins durch eine deprotonierte Schiff'sche Base (SB) gebunden. Der Zerfall von Meta II (oben) umfasst die Hydrolyse der Schiff'schen Base über eine Carbinolaminzwischenstufe (CA), was zur Bildung eines nichtkovalenten Opsin*•all-*trans*-Retinal-Addukts und zu einer möglichen Abgabe des Retinals aus der Bindungstasche führt. Die Regeneration des Rhodopsins (unten) startet mit der Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch das Opsin*, entweder durch die Bindung an ein bereits existierendes Opsin* (*Conformational-Selection*) oder durch die Interaktion mit Opsin (*Induced-Fit*). Die Rezeptor-Ligand-Interaktion innerhalb des nichtkovalenten Opsin*•11-*cis*-Retinal-Addukts steuert die Bildung der deprotonierten 11-*cis*-Retinyliden-Schiff'schen Base des lichtsensitiven Rhodopsins. Die Bildung der Schiff'schen Base erfolgt über eine Carbinolaminzwischenstufe und die Abgabe von Wasser. Beide Prozesswege sind vom Umschalten zwischen der aktiven (rot) und inaktiven (blau) Rezeptorkonformation abhängig. Die Absorption eines Lichtphotons ($h\nu$) schließt den Kreislauf durch Bildung des Meta II aus Rhodopsin.

Die Absorption eines Photons durch das Rhodopsin (Opsin-11-*cis*-Retinal) führt zur Bildung von Meta II (Opsin*•all-*trans*-Retinal), wodurch der Aktivierungs-/Deaktivierungskreislauf geschlossen wird. In diesem Fall wird die aktive Opsin-Konformation durch die Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zu all-*trans*-Retinal induziert. Durch diese Retinalisomerisierung wird ein Teil der Lichtenergie in der verdrehten Konformation des all-*trans*-Retinyliden-Lys296^{7.43} gespeichert und anschließend über die Retinaltranslation in Richtung TM5 auf das Apoprotein übertragen (Li *et al.* 2004, Vogel *et al.* 2007, Ye *et al.* 2010). Durch das Umschalten diverser Schalter (Motive) innerhalb des Proteins wird die aktive Konformation des Apoproteins erzeugt und stabilisiert (Übersicht: Hofmann *et al.* 2009). Die Deprotonierung der Schiff'schen Base durch die Verlagerung eines H⁺ auf das Gegenion Glu113^{3.28} (Arnis *et al.* 1994, Arnis und Hofmann 1993, Okada *et al.* 2001) sorgt für eine Stabilisierung der Meta II-Konformation, bevor die Schiff'sche Base im Meta II langsam hydrolysiert wird und das all-*trans*-Retinal das aktive Apoprotein verlässt.

Beide Isomere (11-*cis*- und all-*trans*-Retinal) können über den Kanal der Opsin*-Konformation in den Rezeptor eindringen und eine kovalente Verknüpfung mit

dem Lys296^{7.43} eingehen (Choe *et al.* 2011), aber nur 11-*cis*-Retinal kann in der Bindungstasche eine Konformationsänderung auslösen („Mausefalle“). Das heißt, dass unmittelbar nach der Verknüpfung des 11-*cis*-Retinals mit dem Lys296^{7.43} die Translokation eines H⁺ vom Glu113^{3.28} zur Schiff'schen Base erfolgt. Dadurch wird die Schiff'sche Base protoniert und bildet zum jetzt negativ geladenen Glu113^{3.28} eine Salzbrücke aus. Die zusätzliche Bewegung weiterer negativ geladener und polarer Aminosäurereste näher an die protonierte Bindung heran (Palczewski *et al.* 2000), zwingt das Molekül zur Bildung des lichtsensitiven Rhodopsins. Dieses Betätigen der „Mausefalle“ verhindert durch die Stabilisierung der protonierten Schiff'schen Base den Verlust an transient hydrolysierbarem 11-*cis*-Retinal (Janz und Farrens 2003) und macht dadurch die Bildung des Rhodopsins irreversibel.

Der Ligandenkanal hat also die Aufgabe, die Bildung der Carbinolamine (11-*cis*- und *all-trans*-Carbinolamin) und somit die Bildung der zwei Addukte Opsin•11-*cis*-Retinal und Opsin•*all-trans*-Retinal zu kontrollieren (Abb. 4.4). Bei beiden Addukten kann davon ausgegangen werden, dass sich das Retinal noch nicht oder nicht mehr in seiner vorgesehenen Lage in der Bindungstasche befindet.

4.4 Aktiviertes Opsin als Rezeptor für diffusible Liganden

Die strukturellen Änderungen, die bei der Aktivierung des Rhodopsins auftreten, sind ähnlich zu anderen GPCRs seiner Klasse (Hofmann *et al.* 2009). Der Mechanismus, der diese Änderungen induziert, unterscheidet aber das Rhodopsin von den vielen anderen GPCRs. Die Isomerisierung des kovalent mit dem Rezeptorprotein verknüpften 11-*cis*-Retinalliganden durch die Absorption eines Photons führt zur *all-trans*-Retinal-vermittelten Stabilisierung der aktiven Konformation (Meta II) des Rhodopsins. Das Rhodopsin wird ausschließlich über die Isomerisierung des kovalent gebundenen 11-*cis*-Retinals aktiviert. Die große Mehrheit der anderen GPCRs wird durch die Diffusion eines Liganden in den ligandenfreien Rezeptor aktiviert, wobei keine kovalente Verknüpfung zwischen Ligand und Rezeptor auftritt.

In diesem Abschnitt soll gezeigt werden, dass das Opsinmolekül unter bestimmten Bedingungen den Agonisten, der die aktive Konformation stabilisiert (*all-trans*-Retinal), reversibel aufnehmen kann und dass eine kovalente Verknüpfung zwischen Ligand und Apoprotein ausgebildet wird.

4.4.1 Das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem Opsin steuert die reversible Aufnahme des Agonisten all-*trans*-Retinal

Ligandenfreies Opsin existiert, wie alle GPCRs, in einer aktiven (Opsin*) und einer inaktiven (Opsin) Konformation. Das Gleichgewicht zwischen Opsin* und Opsin kann unter anderem durch die Verringerung des pH-Wertes und durch die Anwesenheit von Detergenz in Richtung Opsin* verschoben werden (Scheerer *et al.* 2008, Vogel und Siebert 2001). Es ist bekannt, dass bei Opsin in Diskmembranen unter physiologischem pH-Wert die Zugabe von all-*trans*-Retinal zu keiner Behinderung der Regeneration führt (Heck *et al.* 2003b). Das heißt, dass die Aufnahme von 11-*cis*-Retinal und Bildung des lichtsensitiven Rhodopsins durch die Anwesenheit von all-*trans*-Retinal nicht beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund kann gesagt werden, dass keine reversible Aufnahme des all-*trans*-Retinals mit Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung erfolgt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass all-*trans*-Retinal die Regeneration auch dann nicht beeinträchtigt, wenn die Untersuchung in membranfreier Detergenzlösung durchgeführt wird (Abb. 3.19a). Die Verschiebung des Opsin*/Opsin-Gleichgewichts in Richtung der aktiven Opsin*-Konformation durch das CT α -Peptid (Vogel und Siebert 2001) führte zu einer Blockierung der Regeneration eines Teils der Rhodopsinmoleküle durch das all-*trans*-Retinal (Abb. 3.19a). In Kombination mit den Ergebnissen aus den Abbildungen 3.17 und 3.18a kann gesagt werden, dass all-*trans*-Retinal reversibel durch das aktive Opsin aufgenommen werden kann und in der Retinalbindungstasche mit dem Lys296^{7.43} eine Schiff'sche Base ausbildet. Die Aufnahme des all-*trans*-Retinals könnte ebenso wie die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch den hypothetischen Ligandenkanal erfolgen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Opsin im inaktiven Zustand hochspezifisch für 11-*cis*-Retinal ist, sobald aber Opsin im aktiven Zustand gehalten wird, besteht auch für all-*trans*-Retinal die Möglichkeit, eine kovalente Retinyliden-Lys296-Verknüpfung mit dem Apoprotein auszubilden. Die all-*trans*-Retinyliden-Lys296-Verknüpfung ist im Vergleich zur 11-*cis*-Retinyliden-Lys296-Verknüpfung reversibel, da all-*trans*-Retinal die „Mausefalle“ zur irreversiblen Bildung von Rhodopsin nicht auslösen kann (Janz und Farrens 2003, Palczewski *et al.* 2000).

4.4.2 Das kubisch-ternäre Komplexmodell beschreibt die reversible Aufnahme des Agonisten in Abhängigkeit vom Opsin*/Opsin-Gleichgewicht und vom CT α -Peptid

Die kooperative Interaktion zwischen dem aktiven bzw. inaktiven Rezeptor, dem G-Protein und dem Agonisten wird durch das kubisch-ternäre Komplexmodell beschrieben (Weiss *et al.* 1996). In diesem spezifischen Fall soll die Interaktion zwischen aktivem Opsin (bzw. inaktivem Opsin), CT α -Peptid und all-*trans*-Retinal durch das Modell beschrieben werden. Dieses Modell ist für die Untersuchung der Interaktion von Opsin mit all-*trans*-Retinal und CT α -Peptid anwendbar, da das Opsin zwei getrennte Bindungsstellen für all-*trans*-Retinal und CT α -Peptid besitzt, das Opsin in aktivem und inaktivem Zustand existiert und die Interaktionen zwischen den Opsinzuständen, all-*trans*-Retinal und CT α -Peptid dem Massenwirkungsgesetz unterliegen.

Um im System der gekoppelten Gleichgewichte einzelne Bindungskonstanten bestimmen zu können, wurde einer der beiden Reaktionspartner in hoher Konzentration vorgelegt und mit dem anderen titriert (Abb. 3.18b). Mit der Annahme, dass eine der Reaktionen gesättigt ist, konnte die Konstante der anderen Reaktion des Gleichgewichts isoliert werden. Es konnte nur das Produkt Opsin*-all-*trans*-Retinal-CT α -Peptid experimentell nachgewiesen werden, was die Abschätzung der einzelnen Gleichgewichtskonstanten erschwerte.

In dieser Arbeit konnten zwei Konstanten des gekoppelten Gleichgewichtssystems abgeschätzt werden. Die erste ($K_a \cdot \beta K_G$) beschreibt das Gleichgewicht zwischen Opsin, Opsin* und Opsin*-CT α -Peptid und definiert die Bindung des CT α -Peptids an Opsin* (βK_G), wodurch das Gleichgewicht zwischen Opsin und Opsin* (K_a) in Richtung Opsin* gezogen wird. Das Produkt der beiden einzelnen Gleichgewichtskonstanten K_a und βK_G zeigt, dass 3,25 μ M CT α -Peptid ausreichen, um die Hälfte des Opsins in die Opsin*-Konformation zu bringen (Abb. 4.5). Die zweite Gleichgewichtskonstante ($\delta\alpha\gamma K_L$) beschreibt das Gleichgewicht zwischen Opsin*-CT α -Peptid und Opsin*-all-*trans*-Retinal-CT α -Peptid und zeigt, dass 0,922 μ M all-*trans*-Retinal ausreichen, um die Bindungstasche in 0,5 μ M Opsin*-CT α -Peptid halbmaximal zu besetzen (Abb. 4.5b). Weil davon ausgegangen werden kann, dass die Konformation des Opsin* in CT α -Peptid-gebundenem Zustand dem Opsin* ohne CT α -Peptid entspricht (Park *et al.* 2008, Scheerer *et al.* 2008), kann die Gleichgewichtskonstante $\delta\alpha\gamma K_L$ auch die Reaktion von Opsin* zu

Opsin*-all-*trans*-Retinal (αK_L) beschreiben und somit die reversiblen Aufnahme des Liganden.

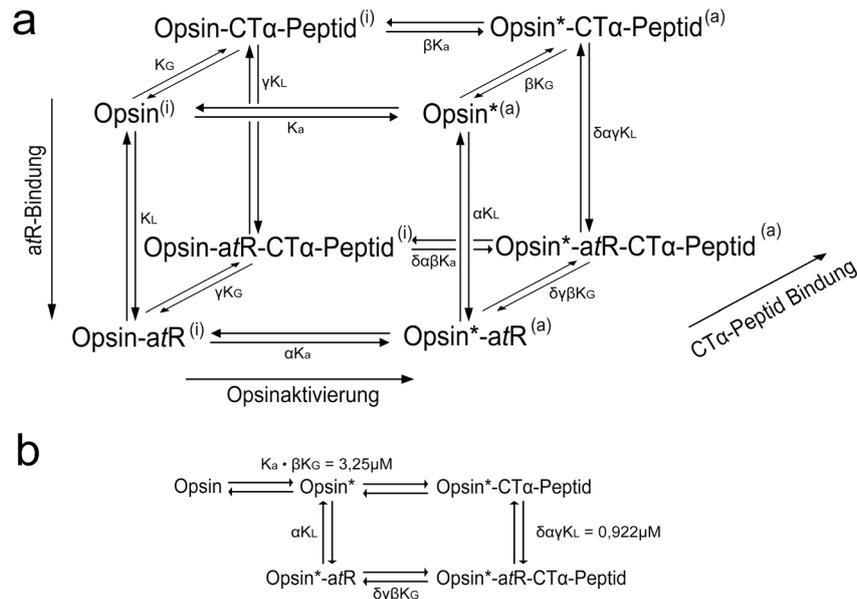


Abbildung 4.5: Kubisch-ternäres Komplexmodell für Opsin. (a) In diesem Modell existieren drei Ebenen des Opsinzustands. Die erste Ebene zeigt von links (inaktiv) nach rechts (aktiv) die Opsinaktivierung mit jeweils vier Zuständen (Opsin allein (Opsin), Opsin mit all-*trans*-Retinal (Opsin-atR), Opsin mit CT α -Peptid (Opsin-CT α -Peptid) und Opsin mit all-*trans*-Retinal und CT α -Peptid (Opsin-atR-CT α -Peptid)). Die zweite Ebene zeigt die all-*trans*-Retinal-Bindung mit ebenfalls vier Zuständen (Opsin-atR, Opsin*-atR, Opsin-atR-CT α -Peptid und Opsin*-atR-CT α -Peptid). Die dritte Ebene beschreibt die CT α -Peptid-Bindung mit den vier verschiedenen Zuständen (Opsin-CT α -Peptid, Opsin*-CT α -Peptid, Opsin-atR-CT α -Peptid und Opsin*-atR-CT α -Peptid). K_a ist als Gleichgewichtskonstante für die Aktivierung des Opsins, K_L als Gleichgewichtskonstante für die Bindung des all-*trans*-Retinals an das inaktive Opsin und K_G als Gleichgewichtskonstante für die Bindung des CT α -Peptids an das inaktive Opsin definiert. Der Faktor α beschreibt den Effekt der all-*trans*-Retinal-Bindung auf die Aktivierung des Opsins, der Faktor β definiert den Effekt der Opsinaktivierung auf die CT α -Peptid-Bindung, der Faktor γ erklärt den Effekt der all-*trans*-Retinal-Bindung auf die CT α -Peptid-Bindung, und der Faktor δ ist eine Größe, die den Effekt von zwei Opsinebenen zusammen auf die dritte Ebene beschreibt. Die Abbildung stammt aus (Weiss *et al.* 1996) und wurde für die Untersuchung an Opsin angepasst. (b) Aus dem kubisch-ternären Komplexmodell extrahiertes Reaktionsschema für die in dieser Arbeit untersuchten Gleichgewichte.

Für alle Spezies der Ebene des aktiven Opsins (Opsin*) existieren Kristallstrukturen (Opsin* (PDB: 3CAP), Opsin*-atR (PDB: 3PXO), Opsin*-CT α -Peptid (PDB: 3DQB) und Opsin*-atR-CT α -Peptid (PDB: 3PQR)) (Abb. 4.5a), was dafür spricht, dass diese Opsinkonformationen existieren und eine entscheidende Rolle im Aktivierungsprozess des Rezeptors spielen. Des Weiteren wird die inaktive Opsinkonformation in der Diskmembran der Photorezeptorzellen vorkommen. Die nur in unmessbar geringer Konzentration vorliegenden Opsinkonformationen Opsin-all-*trans*-Retinal, Opsin-CT α -Peptid und Opsin-all-*trans*-Retinal-CT α -Peptid sind dennoch thermodynamisch möglich (Abb. 4.5a). Die reversible Aufnahme des all-*trans*-Retinals durch das Opsin ermöglicht die Beschreibung der

Opsin*-all-*trans*-Retinal-Interaktionen durch das kubisch-ternäre Komplexmodell und somit den Vergleich zu anderen GPCRs.

4.5 Die Aufnahme von 11-*cis*- und all-*trans*-Retinal könnte über zwei verschiedene Mechanismen verlaufen

Wie schon in Abschnitt 4.3.4 beschrieben wurde, könnte das 11-*cis*-Retinal seine eigene Aufnahme in das inaktive Opsinmolekül durch die Induzierung der aktiven Opsinkonformation und durch die Änderung der Lys296^{7.43}-Rotamerstellung steuern (*Induced-Fit*). 11-*cis*-Retinal zeigt in Anwesenheit des CT α -Peptids keine Beschleunigung der Regeneration (Abb. 3.19a), was auf einen mehrstufigen sequenziellen Aufnahmeprozess hindeutet, der nicht ausschließlich von der bereits vorhandenen Opsin*-Konformation abhängig ist. Die Steuerung der regulatorischen Lys296^{7.43}-Schranke durch das 11-*cis*-Retinal könnte die zweite Stufe des Aufnahmeprozesses beschreiben und würde die selektive Aufnahme des 11-*cis*-Retinals erklären. Zur Induzierung der Opsin*-Konformation und Steuerung der Lys296-Rotamerstellung wäre eine sekundäre Bindestelle für 11-*cis*-Retinal am Opsinmolekül notwendig. Die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals in die Bindungstasche des Opsins könnte über die Öffnung A erfolgen, da in diesem Bereich des Ligandenkanals die regulatorische Lys296^{7.43}-Schranke lokalisiert ist. Da die Bindung des CT α -Peptids hauptsächlich strukturelle Änderungen an der Öffnung B induziert, die Änderungen im Bereich der Öffnung A aber minimal sind, könnte das die nicht-beschleunigte Regeneration des Rhodopsins in Anwesenheit des CT α -Peptids erklären, wenn die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals über die Öffnung A erfolgt. Die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals endet in der irreversiblen Bildung des lichtsensitiven Rhodopsins.

Im Gegensatz zum 11-*cis*-Retinal muss all-*trans*-Retinal auf die aktive Opsin*-Konformation „warten“, um den geöffneten Kanal zu nutzen und eine kovalente Retinyliden-Lys296-Schiff'sche Base-Bindung ausbilden zu können (*Conformational-Selection*). Den *Conformational-Selection*-Mechanismus können die Messungen aus Abbildung 3.18b (rechts) bestätigen. Je mehr Opsin* vorhanden ist, desto mehr all-*trans*-Retinal kann in der Bindungstasche am Lys296 gebunden werden. Die Aufnahme des all-*trans*-Retinals in equimolarer Menge Opsin* folgt einem monoexponentiellen Verlauf (Abb. 3.17c), was für eine Reaktionsgeschwindigkeit sprechen würde, die ausschließlich durch die Bildung der Schiff'schen Base bestimmt wird. Die Bindung von all-*trans*-Retinal ist reversibel, da die Zugabe von 11-*cis*-Retinal

durch die irreversible Bildung des Rhodopsins zu einer Verdrängung des all-*trans*-Retinals führt (Abb 3.19c). Dies spricht dafür, dass die Aufnahme des all-*trans*-Retinals in das aktive Opsinmolekül über die Öffnung B erfolgt. Das könnte die Kristallstruktur des reversibel gebildeten Meta II erklären. In dieser Struktur zeigt das all-*trans*-Retinal eine Ausrichtung der Methylgruppen C16 und C17 am β -Iononring in Richtung der cytoplasmatischen Seite (Choe *et al.* 2011), wohingegen das 11-*cis*-Retinal in der Rhodopsinstruktur diese Methylgruppen in Richtung extrazellulärer Seite präsentiert (Okada *et al.* 2004, Palczewski *et al.* 2000). Da für die Signalübertragung vom Retinal zum Protein das Retinal relativ fixiert in der Bindungstasche liegen muss, ist es wahrscheinlich, dass eine Drehung des Retinals innerhalb der Bindungstasche nicht möglich ist. Deshalb ist die Aufnahme des all-*trans*-Retinals in das Opsin* über die Öffnung B wahrscheinlicher. Außerdem würde die hypothetische Lys296^{7.43}-Schranke in geschlossener und geöffneter Stellung die Aufnahme des all-*trans*-Retinals über die Öffnung A verhindern (Hildebrand *et al.* 2009).

Untersuchungen der G_t-Proteinaktivierung haben gezeigt, dass all-*trans*-Retinal das Opsin partiell aktivieren kann (Abb. 3.20) (Han *et al.* 1996, Jäger *et al.* 1996). Das würde dafür sprechen, dass eine sekundäre Bindestelle für all-*trans*-Retinal am Opsin existiert, wodurch ein partiell aktiviertes Opsin (Opsin⁺) entsteht. Dieses Opsin⁺ besitzt aber nicht die Möglichkeit, all-*trans*-Retinal in die Bindungstasche aufzunehmen und kovalent mit dem Lys296^{7.43} zu verknüpfen (Abb. 3.18a). Es könnte aber die Bindung des CT α -Peptids begünstigen, was dann zur vollen Aktivierung des Opsins (Opsin*) führt. Diese Aussage steht nicht im Widerspruch zur Hypothese, dass die Aufnahme von all-*trans*-Retinal durch Opsin* über den *Conformational-Selection*-Mechanismus verläuft. Die genauen Aufnahmemechanismen für 11-*cis*- und all-*trans*-Retinal können anhand der aktuellen Ergebnisse aus der Literatur und aus dieser Arbeit nicht erklärt werden. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.6 Vergleich der Ligandenaufnahme und -abgabe des Rhodopsins mit anderen GPCRs

Im Rhodopsinmolekül wird die Retinalbindungstasche im Kern der 7TM-Struktur durch die extrazelluläre Peptidschleife 2 (EL2) vom extrazellulären Raum getrennt. Diese EL2 besteht aus zwei β -Peptidsträngen, die durch eine Disulfidbrückenbindung zur TM3 und durch das Glu181^{EL2}-Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert werden (Okada *et al.* 2004). Da dieser sogenannte hochgeordnete „Deckel“ im ligandenfreien Opsinzustand sowie im durch

4 DISKUSSION

den Agonisten gebundenen Meta II-Zustand seine Struktur nicht verliert (Choe *et al.* 2011, Park *et al.* 2008), ist eine Aufnahme des hydrophoben Retinalliganden über die extrazelluläre Domäne unwahrscheinlich, was wiederum für die Aufnahme über die in der Membran exponierten Öffnungen spricht (Hildebrand *et al.* 2009). Der Vergleich der rhodopsinähnlichen GPCRs macht eine außergewöhnliche Variabilität der extrazellulären Domäne sichtbar, was auch die große Diversität der Ligandenerkennung erklärt. Die Klasse der rhodopsinähnlichen GPCRs macht aber deutlich, dass trotz unterschiedlicher Struktur der EL2 die meisten Liganden innerhalb einer Kavität zwischen den TMs binden. Die ECL2 des β 2-adrenergen Rezeptors (analog zur EL2 im Rhodopsin) besitzt ein helikales Segment und existiert in drei verschiedenen Konformationen, deren Bildung vom gebundenen Liganden im TM-Kern des Moleküls abhängt (Antagonist, Agonist oder inverser Agonist) (Bokoch *et al.* 2010, Wang und Duan 2009). Da die Bindungstasche im β 2-adrenergen Rezeptor relativ gut zur extrazellulären Umgebung exponiert ist und die Liganden mehr hydrophile Eigenschaften besitzen, könnte ihre Aufnahme über zwei extrazellulär ausgerichtete Kanäle erfolgen (Gonzalez *et al.* 2011). Dieser Weg der Ligandenaufnahme ist für GPCRs anzunehmen, die meist hydrophile Agonisten binden, um aktiviert zu werden. Der Weg durch membranständige Öffnungen, wie im Fall des Rhodopsins, könnte bei der Aufnahme von hydrophoben Liganden verwirklicht sein. Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor ist der olfaktorische GPCR hOR2AG1, der als hydrophober Ligand das Amylbutyrat bindet (Gelis *et al.* 2011, Neuhaus *et al.* 2006).

Rhodopsin ist einer der wenigen GPCRs, die ihren Liganden kovalent an das Apoprotein binden, und nimmt deshalb unter den GPCRs eine besondere Stellung ein. Des Weiteren wird in Rhodopsin nur die Form des Liganden (11-*cis*-Retinal) gebunden, die die basale Aktivität des Rezeptors stoppt (inverser Agonist). Die zweite Form wird durch eine lichtinduzierte Isomerisierung innerhalb der Bindungstasche erzeugt (all-*trans*-Retinal) und aktiviert den Rezeptor. Dennoch ist es möglich, das Rhodopsin bezüglich der ligandeninduzierten Rezeptoraktivierung mit z.B. dem β 2-adrenergen Rezeptor zu vergleichen. Zur vollen Aktivierung benötigen die Rezeptoren einen Agonisten. Beim β 2-adrenergen Rezeptor ist dieser Agonist das Adrenalin, und beim Rhodopsin ist es das durch Licht isomerisierte kovalent verknüpfte all-*trans*-Retinal. Neben der agonistischen Wirkung des all-*trans*-Retinals in Schiff'sche Base-gebundener Form kann das all-*trans*-Retinal, das sich an einer sekundären Bindestelle befindet, als partieller Agonist angesehen werden. Dies zeigt die exogene Zugabe von all-*trans*-Retinal, durch die eine Aktivierung von nur 14 % im Vergleich zur lichtinduzierten G_i -Proteinaktivierung erreicht wird (Han *et al.* 1996,

Jäger *et al.* 1996). Beim β 2-adrenergen Rezeptor sorgen Substanzen wie das Catechol und Dopamin, die von der agonistischen Struktur abweichen, für eine partielle Aktivierung. Die Verbindungen, die die basale Aktivität des ligandenfreien Rezeptors inhibieren, werden als inverse Agonisten bezeichnet. Ein inverser Agonist beim β 2-adrenergen Rezeptor ist z.B. ICI118,551. Beim Rhodopsin ist 11-*cis*-Retinal der inverse Agonist. Als Antagonisten bezeichnet man Verbindungen, die keinen Effekt auf die basale Rezeptoraktivität haben, aber den Zugang für andere Liganden kompetitiv blockieren. Beim β 2-adrenergen Rezeptor ist diese Verbindung z.B. Butoxamin, beim Rhodopsin ist die antagonistische Blockierung der Bindungstasche nicht möglich, da der Agonist (*all-trans*-Retinal) bereits kovalent in der Bindungstasche des Rezeptors gebunden ist. Da die irreversible Bildung von Rhodopsin durch 11-*cis*-Retinal auf die Hydrolyse der *all-trans*-Retinyliden-Schiff'schen Base nach der lichtinduzierten Aktivierung des Rezeptors „warten“ muss, kann 11-*cis*-Retinal nicht antagonistisch wirken.

Tabelle 4.1: Vergleich der Ligandenklassen von Rhodopsin und β 2-adrenergen Rezeptor.
Anmerkung: Die Liganden des β 2-adrenergen Rezeptors repräsentieren nur eine Auswahl.

Ligandenklasse	Rhodopsin	β 2-adrenerger Rezeptor
Agonist	<i>all-trans</i> -Retinyliden-Lys296	Adrenalin
Partieller Agonist	<i>all-trans</i> -Retinal	Catechol und Dopamin
Inverser Agonist	11- <i>cis</i> -Retinyliden-Lys296	ICI118,551
Antagonist	—	Butoxamin

Durch die Verschiebung des Gleichgewichts vom inaktiven zum aktiven Opsin wird eine reversible Aufnahme des Agonisten *all-trans*-Retinal ermöglicht. Dadurch kann Opsin mit Hilfe der Modelle für die reversible Liganden-Rezeptor-Interaktionen anderer GPCRs charakterisiert werden (z.B. kubisch-ternäres Komplexmodell). Der für die Aufnahme von *all-trans*-Retinal favorisierte *Conformational-Selection*-Mechanismus wird auch als ein möglicher Aufnahmemechanismus des Catecholamins in den β 2-adrenergen Rezeptor angenommen (Übersicht: Gether und Kobilka 1998). Eine kovalente Verknüpfung des *all-trans*-Retinals nach der Aufnahme durch das aktive Opsin (Opsin*) wurde in dieser Arbeit bestätigt (Abb. 3.18a). Die Wirkung des *all-trans*-Retinals als partieller Agonist konnte ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 3.20). Es muss aber noch geklärt werden, inwieweit der Mechanismus der Aufnahme des *all-trans*-Retinals mit dem Mechanismus der Aufnahme

diffusionsfähiger Liganden wie z.B. des β 2-adrenergen Rezeptors übereinstimmen (*Induced-Fit* oder *Conformational-Selection*).

4.7 Abschließendes Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte durch die Untersuchung des Einflusses der alkylierten Hydroxylaminderivate gezeigt werden, wie diese als molekulares Werkzeug zur Untersuchung der visuellen Signaltransduktion verwendet werden können. Des Weiteren konnten mit Hilfe der alkylierten Hydroxylaminderivate Indizien für einen hypothetischen Wasserkanal im aktivierten Rhodopsin bestätigt werden, und es konnte gezeigt werden, dass nur kleine Moleküle wie Wasser und Hydroxylamin diesen Kanal passieren können, um zur Retinalbindungstasche zu gelangen.

Die Untersuchungen der Aufnahme und Abgabe des Retinals durch den hypothetischen Ligandenkanal im aktivierten Rhodopsin erfolgten durch den ortsspezifischen Austausch von Aminosäuren entlang des Kanals. Diese Untersuchungen ergaben, dass Mutationen der Aminosäureseitenketten entlang des Retinalligandenkanals weitreichende Effekte innerhalb des gesamten Rezeptors haben können und somit die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden beeinflussen. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass der Mechanismus der Retinalpassage unidirektional ist. Die Aufnahme des inversen Agonisten 11-*cis*-Retinal und Agonisten all-*trans*-Retinal erfolgt über die aktive Rezeptorkonformation. Durch die richtige Positionierung des 11-*cis*-Retinals in der Bindungstasche sorgt das ionische Schloss (*Ionic-Lock*) zwischen der Schiff'schen Base und dem Gegenion dafür, dass das Protein in seine inaktive, aber lichtensitive Rhodopsinkonformation überführt wird. Nach der lichtinduzierten Bildung von Meta II erfolgt die durch die Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base bestimmte Abgabe des Agonisten all-*trans*-Retinal über die aktive Rezeptorkonformation. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse der Retinyliden-Schiff'schen Base wird wiederum durch die Menge an Carbinolamin bestimmt. Außerdem wird die Hydrolyse oder Bildung der Schiff'schen Base durch die Positionierung der Aminosäureseitenketten und ihrer Reaktionspartner beeinflusst. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der hypothetische Wasserkanal mit dem Ligandenkanal im Bereich der Retinalbindungstasche gekoppelt ist.

Es wurde ein detailliertes Schema für die Aufnahme und Abgabe des Retinalliganden entwickelt, welches darauf basiert, dass nur zwei Opsinzustände existieren, die im aktiven Zustand einen offenen Wasser- und Ligandenkanal und im inaktiven Zustand geschlossene Kanäle aufweisen.

In dieser Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass aktiviertes Opsin ähnlich zu anderen GPCRs als Rezeptor für diffusionsfähige Liganden fungieren kann. Das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Konformation kann die reversible Aufnahme des Agonisten *all-trans*-Retinal steuern, was durch das kubisch-ternäre Komplexmodell in Abhängigkeit vom CT α -Peptid charakterisiert werden kann. Aufgrund dieser Daten kann postuliert werden, dass die Aufnahme des Agonisten *all-trans*-Retinal und des inversen Agonisten *11-cis*-Retinal über zwei verschiedene Mechanismen verläuft. *All-trans*-Retinal nutzt die seltene Gelegenheit der aktiven Opsinkonformation, um in das Protein zu gelangen (*Conformational-Selection*), während *11-cis*-Retinal selbst die aktive Konformation des Opsins induziert, um die Bindungstasche zu erreichen (*Induced-Fit*). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine sekundäre Bindestelle für *all-trans*-Retinal am Opsinmolekül existiert, wodurch das Protein partiell aktiviert wird. Auch wenn bei anderen GPCRs die Liganden nicht kovalent mit dem Apoprotein verknüpft sind, könnte die Aufnahme des Liganden und dessen Positionierung innerhalb der Bindungstasche ähnlichen Schemata folgen, wie es hier für Rhodopsin beschrieben wurde.

Für das Verständnis der Mechanismen der Rezeptor-Ligand-Interaktion am Beispiel des Rhodopsins sind aber weitere Untersuchungen notwendig, da die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen noch folgende Fragestellungen unbeantwortet ließen.

1) *Wie können die zwei Öffnungen des Ligandenkanals zur Aufnahme oder Abgabe des Liganden zugeordnet werden?*

Dazu wurden schon erste Versuche durchgeführt, in denen die Öffnungen getrennt von einander geblockt werden sollten. Der Austausch von zwei Aminosäuren am Ausgang oder Eingang durch Cystein in Kombination mit dem oxidativen Reagenz Kupfer-1,10-Phenanthrolin sollte dazu führen, dass Disulfidbrücken zwischen den zwei mutierten Cysteinen an einer Öffnung entstehen. Diese Disulfidbrücken sollten die entsprechende Kanalöffnung unpassierbar für das Retinal machen. Diese Prozedur brachte aber keinen Erfolg. Der Durchmesser der Öffnungen liegt zwischen 4 und 10 Å, deshalb wurden größere bifunktionale Reagenzien wie Bis-Maleimide verwendet, um den Kanal an den Öffnungen verschließen können. Diese Bis-Maleimide gehen kovalente Verbindungen mit den SH-Gruppen der Cysteine ein. Da sich aber die Öffnungen des Ligandenkanals im hydrophoben Bereich des Rhodopsins befinden und sich das Detergenz in diesem Bereich um den Rezeptor legt, war eine Verknüpfungsreaktion mit den verschiedenen Bis-Maleimiden nicht erfolgreich.

4 DISKUSSION

Weitere Möglichkeiten, die Öffnungen zu verschließen, bietet entweder HgCl_2 , das mit intramembranen Cysteinen reagiert, oder hydrophobe Crosslinker, wie 1,3-Dibromopropan. Außerdem bestünde noch die Möglichkeit, zwei Rhodopsinmoleküle im extra- und/oder intrazellulären Bereich so über Disulfidbrücken zu verbinden, dass der Ligandenkanal eines der beiden Rhodopsinmoleküle verschlossen wird. Diese Verknüpfung könnte so durchgeführt werden, dass zum einen Rhodopsin (Opsin-11-*cis*-Retinal) zur Untersuchung der Abgabe des Liganden und zum anderen Opsin zur Untersuchung der Aufnahme des Liganden genutzt werden kann.

2) *Welche Rolle spielt die Struktur des Ligandenkanals bei der Aufnahme und Abgabe des Retinals durch das Rhodopsin?*

Um die Effekte von sterischen Behinderungen durch den Einbau von großen Aminosäureseitenketten im Ligandenkanal besser hervorheben zu können, sollen Mutationen von ausgesuchten Aminosäuren auf dem K296G-Hintergrund untersucht werden. Durch die K296G-Mutation ist nicht mehr die Bildung und Hydrolyse der Schiff'schen Base der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Regeneration und dem Meta II-Zerfall, sondern es können Effekte der Mutationen auf die Wechselwirkungen von Retinal und Ligandenkanal sichtbar gemacht werden. Die weitere Untersuchung der Interaktion des Liganden mit den Aminosäuren innerhalb des Kanals ist durch das Verwenden eines Spin-markierten Retinals möglich.

3) *Welche Affinitäten können die Aufnahme des 11-*cis*-Retinals durch das Opsin und die Bildung der Schiff'schen Base beschreiben?*

Da die Regeneration in Detergenz mit hoher Konzentration an 11-*cis*-Retinal so beschleunigt wird, dass sie nicht mehr unter normalen Detektionsbedingungen gemessen werden kann, muss die Zugabe des 11-*cis*-Retinals beschleunigt und die Auflösung erhöht werden. Zur Quantifizierung der Affinitäten bei der Regeneration des lichtsensitiven Rhodopsins soll die 11-*cis*-Retinal-Titration mittels *Stopped-Flow*-UV/Vis-Spektrometer durchgeführt werden.

4) *Welchem Mechanismus folgt die Hydrolyse der Schiff'schen Base?*

Zur Analyse des Mechanismus der Schiff'schen Base-Hydrolyse könnte die reduktive Methylierung (Jäger *et al.* 1996) genutzt werden, um Rhodopsin herzustellen, in dem der Stickstoff der Schiff'schen Base methyliert und somit positiv geladen ist.

5) *Welche Rolle spielt das Lys296 während der Regeneration und des Meta II-Zerfalls?*

Um die Rolle des Lys296 aufklären zu können, könnte die ortsgerichtete Mutagenese mit einem chemischen Ansatz kombiniert werden, wodurch unnatürliche Aminosäureseitenketten an der Position 296 eingefügt werden können (z.B. durch Aminoalkylierung der K296S-Mutante).

6) *Können durch die Untersuchung der reversiblen Aufnahme des all-trans-Retinals durch das aktive Opsin weitere Erkenntnisse gewonnen werden?*

Da all-*trans*-Retinal eine Steigerung der G_i-Proteinaktivität von 14 % bis 25 % induziert (Abb. 3.20) (Han *et al.* 1996, Jäger *et al.* 1996), könnte, basierend auf einigen früheren Ergebnissen (Heck *et al.* 2003b, Schädel *et al.* 2003), untersucht werden, wo sich eine sekundäre Bindungsstelle für all-*trans*-Retinal am Opsinmolekül befindet. Dazu müssen weitere quantitative Untersuchungen zur reversiblen Aufnahme des all-*trans*-Retinals und zum Mechanismus der partiellen Aktivierung durch all-*trans*-Retinal gemacht werden.

5 ANHANG

Verzeichnis der Abkürzungen

11- <i>cis</i> - & all- <i>trans</i> -PrSB	11- <i>cis</i> - & all- <i>trans</i> -Propyl-Schiff'sche Base
A2-(P)E	<i>N</i> -Retinyliden- <i>N</i> -Retinyliden(phosphatityl)ethanolamin
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Bovines Serumalbumin)
BSI	<i>Blue-Shifted Intermediate</i> (Blauverschobene Zwischenstufe)
CMHA	<i>O</i> -(Carboxymethyl)-Hydroxylamin
CRBP	<i>Cellular Retinol Binding Protein</i>
CT α -Peptid	C-terminales hochaffines G $_t$ α -Proteinanalogon
DDM	<i>N</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHA	<i>O</i> -Ethyl-Hydroxylamin
EL	<i>Extracellular Loop</i> (extrazelluläre Peptidschleife)
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GDP / GTP	Guanosindi(tri)phosphat
GEF	<i>Guanosin Exchange Factor</i> (Guanosin-Austausch-Faktor)
cGMP	<i>Cyclic</i> Guanosinmonophosphat (zyklisches)
GPCR	<i>G Protein-coupled Receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GRK1	G-Protein-Rezeptor-Kinase 1
G $_t$ -Protein	Guanosinbindeprotein (Transducin)
G $_t$ α / G $_t$ $\beta\gamma$ -Protein	$\alpha/\beta\gamma$ -Untereinheit des G $_t$ -Proteins
GTP γ S	Guanosin- γ -[³⁵ S]thio-triphosphat
HA	Hydroxylamin
h ν	Licht

5 ANHANG

IL	<i>Intracellular Loop</i> (intrazelluläre Peptidschleife)
IPM	Interphotorezeptormatrix
IRBP	Interphotorezeptorretinoidbindendes Protein
LRAT	Lecithinretinolacetyltransferase
Meta I/II/III	Metarhodopsin I/II/III
MHA	O-Methyl-Hydroxylamin
NT / CT	N-Terminus / C-Terminus
PDE	Phosphodiesterase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RDH	Retinoldehydrogenase
(R)OS	<i>(Rod) Outer Segment</i> (Stäbchenzellen (Außensegment))
RPE	Retinalpigmentepithelium
RPE65	Retinalpigmentepitheliumprotein 65
SB / SBH ⁺	Schiff'sche Base / protonierte Schiff'sch Base
SER	<i>Smooth Endothelial Reticulum</i> (glattes endotheliales Retikulum)
<i>t</i> -BHA	O- <i>tert</i> -Buthyl-Hydroxylamin
TM	Transmembranhelix
UV/Vis	Ultraviolett/ <i>Visible</i> (sichtbar)
WMs	<i>Washed Membranes</i> (aufgereinigte Diskmembranen)

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1	Anatomischer Aufbau der vertebraten Netzhaut.	S. 21
Abb. 1.2	Aufbau einer vertebraten Stäbchenzelle.	S. 23
Abb. 1.3	Anatomische Eigenschaften der äußeren Retina, des Retinalpigmentepitheliums und des Photorezeptors.	S. 24
Abb. 1.4	Die visuelle Phototransduktionskaskade.	S. 27
Abb. 1.5	Lichtinduzierte Translokation von G _t -Protein und Arrestin im Dunkelzustand und unter Lichtbedingungen.	S. 28
Abb. 1.6	Retinoidzyklus – Lange Serie an Reaktionen zur Reisomerisierung des 11- <i>cis</i> -Retinals.	S. 30
Abb. 1.7	Aminosäuresequenz des Rhodopsins in zweidimensionaler Repräsentation.	S. 33
Abb. 1.8	Funktionale Mikrodomänen und konservierte Aminosäurereste in GPCRs.	S. 34
Abb. 1.9	Isomerisierung der C11=C12-Doppelbindung des 11- <i>cis</i> -Retinals zur <i>trans</i> -Konformation nach Absorption eines Photons ($h\nu$).	S. 37
Abb. 1.10	Fixierung des Retinals durch die Aminosäureseitenketten innerhalb der Bindungstasche.	S. 38
Abb. 1.11	Rhodopsin und seine lichtaktivierten Photoprodukte.	S. 40
Abb. 1.12	Der Vergleich der Kristallstrukturen des inaktiven Rhodopsins und aktiven Meta II.	S. 44
Abb. 1.13	Kanalengstelle am Lys296.	S. 45
Abb. 1.14	Kubisch-ternäres Komplexmodell zur Charakterisierung der Rezeptor-Liganden-G-Protein-Interaktion in GPCRs.	S. 47
Abb. 1.15	Engstellen innerhalb des hypothetischen Ligandenkanals mit den in dieser Arbeit verwendeten Mutationsstellen.	S. 49
Abb. 2.1	Eukaryotischer Expressionsvektor pMT4.	S. 52

Abb. 3.1	Reaktionen von HA und seinen Derivaten mit peripheren Schiff'schen Basen.	S. 75
Abb. 3.2	Einfluss von HA und seiner Derivate auf die Absorptionseigenschaften von Rhodopsin und Meta II.	S. 76
Abb. 3.3	Einfluss von HA und seiner Derivate auf den Zerfall von Meta II.	S. 77
Abb. 3.4	Einfluss der Konzentrationen von HA und <i>t</i> -BHA auf den Zerfall von Meta II.	S. 78
Abb. 3.5	Einfluss von HA und <i>t</i> -BHA auf den Zerfall von Meta III.	S. 79
Abb. 3.6	Vergleich der Strukturen vom aktiven Meta II und inaktiven Rhodopsin und Darstellung der Lage der in dieser Arbeit mutierten Aminosäurereste.	S. 81
Abb. 3.7	Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften des Wildtyp- und N2C/D282C-Rhodopsins.	S. 82
Abb. 3.8a	UV/Vis-Absorptionsspektren der Mutanten im Bereich der Öffnung A des hypothetischen Retinalligandenkanals.	S. 84
Abb. 3.8b	UV/Vis-Absorptionsspektren der Mutanten im Bereich der Bindungstasche und der Öffnung B des hypothetischen Retinalligandenkanals.	S. 85
Abb. 3.9	Spektroskopische Eigenschaften der Rhodopsinmutanten des hypothetischen Retinalligandenkanals.	S. 87
Abb. 3.10	Anteile an Meta I und an Isorhodopsin nach lichtinduzierter Aktivierung der Mutanten des hypothetische Retinal-ligandenkanals.	S. 88
Abb. 3.11	Lichtinduzierte und basale G _i -Proteinaktivierung durch ausgewählte Mutanten des hypothetischen Ligandenkanals.	S. 90
Abb. 3.12	Kinetik der Retinalaufnahme und -abgabe durch ausgewählte Rhodopsinmutanten.	S. 92
Abb. 3.13	Reaktionsgeschwindigkeiten der Retinalaufnahme und -abgabe durch die Rhodopsinmutanten.	S. 94
Abb. 3.14	Reaktionsgeschwindigkeiten der Retinalaufnahme und -abgabe durch die Rhodopsinmutanten in Anwesenheit von Hydroxylamin (HA) und seinem Derivat <i>o</i> -Methyl-Hydroxylamin (MHA).	S. 97
Abb. 3.15	Charakterisierung der K296G-Mutante.	S. 99
Abb. 3.16	G _i -Proteinaktivierung durch die N2C/D282C-Kontrolle und die K296G-Mutante.	S. 101

Abb. 3.17	Einfluss des CT α -Peptids auf den lichtinduzierten Zerfall von Meta II bzw. auf zerfallenes Rhodopsin.	S. 103
Abb. 3.18	Untersuchung der Bildung der protonierten Schiff'schen Base (SBH ⁺) zwischen Opsin und all- <i>trans</i> -Retinal in Anwesenheit des CT α -Peptids.	S. 105
Abb. 3.19	Beeinflussung der Regeneration des Rhodopsins durch all- <i>trans</i> -Retinal in Anwesenheit des CT α -Peptids.	S. 106
Abb. 3.20	Titration der all- <i>trans</i> -Retinal-induzierten partiellen G _i -Proteinaktivierung von Opsin.	S. 108
Abb. 4.1	Molekulare Strukturen von Wasser (Kontrolle), Hydroxylamin (HA), <i>o</i> -Methyl-Hydroxylamin (MHA), <i>o</i> -Ethyl-Hydroxylamin (EHA), <i>o-tert</i> -Buthyl-Hydroxylamin (<i>t</i> -BHA) und <i>o</i> -(Carboxymethyl)-Hydroxylamin (CMHA).	S. 111
Abb. 4.2	Hydrolyse der deprotonierten Retinyliden-Schiff'schen Base (deprot. SB).	S. 124
Abb. 4.3	Hypothetischer Liganden- (links) und Wasserkanal (rechts).	S. 127
Abb. 4.4	Aktivierungs-/Deaktivierungskreislauf des Rhodopsins.	S. 129
Abb. 4.5	Kubisch-ternäres Komplexmodell für Opsin.	S. 133

Literaturverzeichnis

Ahuja S., Eilers M., Hirshfeld A., Yan E.C., Ziliox M., Sakmar T.P., . . . Smith S.O. (2009a) 6-s-cis Conformation and polar binding pocket of the retinal chromophore in the photoactivated state of rhodopsin. *J Am Chem Soc* 131, 15160-15169.

Ahuja S., Hornak V., Yan E.C., Syrett N., Goncalves J.A., Hirshfeld A., . . . Eilers M. (2009b) Helix movement is coupled to displacement of the second extracellular loop in rhodopsin activation. *Nat Struct Mol Biol* 16, 168-175.

Akhtar M., Blosse P.T. and Dewhurst P.B. (1968) Studies on vision. The nature of the retinal-opsin linkage. *Biochem J* 110, 693-702.

Anderson R.E. and Maude M.B. (1970) Phospholipids of bovine outer segments. *Biochemistry* 9, 3624-3628.

Angel T.E., Gupta S., Jastrzebska B., Palczewski K. and Chance M.R. (2009) Structural waters define a functional channel mediating activation of the GPCR, rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14367-14372.

Arnis S., Fahmy K., Hofmann K.P. and Sakmar T.P. (1994) A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin. *J Biol Chem* 269, 23879-23881.

Arnis S. and Hofmann K.P. (1993) Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7849-7853.

Ball S. and Morton R.A. (1949) Vitamin A1 and retinene1 in relation to photopic vision. *Biochem J* 45, 298-304.

Ballesteros J., Kitanovic S., Guarnieri F., Davies P., Fromme B.J., Konvicka K., . . . Sealfon S.C. (1998) Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 273, 10445-10453.

Ballesteros J.A., Jensen A.D., Liapakis G., Rasmussen S.G., Shi L., Gether U. and Javitch J.A. (2001) Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* 276, 29171-29177.

Ballesteros J.A.W., H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences* 25, 366-428.

Bartl F.J., Ritter E. and Hofmann K.P. (2001) Signaling states of rhodopsin: absorption of light in active metarhodopsin II generates an all-trans-retinal bound inactive state. *J Biol Chem* 276, 30161-30166.

Bartl F.J. and Vogel R. (2007) Structural and functional properties of metarhodopsin III: recent spectroscopic studies on deactivation pathways of rhodopsin. *Phys Chem Chem Phys* 9, 1648-1658.

- Bennett N., Michel-Villaz M. and Kühn H. (1982) Light-induced interaction between rhodopsin and the GTP-binding protein. Metarhodopsin II is the major photoproduct involved. *Eur J Biochem* 127, 97-103.
- Birnbaumer L., Bearer C.F. and Iyengar R. (1980) A two-state model of an enzyme with an allosteric regulatory site capable of metabolizing the regulatory ligand. Simplified mathematical treatments of transient and steady state kinetics of an activator and its competitive inhibition as applied to adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 255, 3552-3557.
- Blazynski C. and Ostroy S.E. (1981) Dual pathways in the photolysis of rhodopsin: studies using a direct chemical method. *Vision Res* 21, 833-841.
- Blazynski C. and Ostroy S.E. (1984) Pathways in the hydrolysis of vertebrate rhodopsin. *Vision Res* 24, 459-470.
- Bokoch M.P., Zou Y., Rasmussen S.G., Liu C.W., Nygaard R., Rosenbaum D.M., . . . Kobilka B.K. (2010) Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 463, 108-112.
- Bownds D. and Wald G. (1965) Reaction of the Rhodopsin Chromophore with Sodium Borohydride. *Nature* 205, 254-257.
- Boycott B.B.D., J. E. (1969) Organization of the Primate Retina: Light Microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 255, 109-184.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brann M.R. and Cohen L.V. (1987) Diurnal expression of transducin mRNA and translocation of transducin in rods of rat retina. *Science* 235, 585-587.
- Broekhuysen R.M., Tolhuizen E.F., Janssen A.P. and Winkens H.J. (1985) Light induced shift and binding of S-antigen in retinal rods. *Curr Eye Res* 4, 613-618.
- Brown M.F., Salgado G.F. and Struts A.V. (2010) Retinal dynamics during light activation of rhodopsin revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1798, 177-193.
- Buczylko J., Saari J.C., Crouch R.K. and Palczewski K. (1996) Mechanisms of opsin activation. *J Biol Chem* 271, 20621-20630.
- Burns M.E. and Baylor D.A. (2001) Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci* 24, 779-805.
- Calvert P.D., Strissel K.J., Schiesser W.E., Pugh E.N., Jr. and Arshavsky V.Y. (2006) Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors. *Trends Cell Biol* 16, 560-568.
- Chabre M. and Breton J. (1979) The orientation of the chromophore of vertebrate rhodopsin in the "meta" intermediate states and the reversibility of the meta II-meta III transition. *Vision Res* 19, 1005-1018.

Chen Y. and Noy N. (1994) Retinoid specificity of interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Biochemistry* 33, 10658-10665.

Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., . . . Stevens R.C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.

Choe H.W., Kim Y.J., Park J.H., Morizumi T., Pai E.F., Krauss N., . . . Ernst O.P. (2011) Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* 471, 651-655.

Cideciyan A.V., Haeseleer F., Fariss R.N., Aleman T.S., Jang G.F., Verlinde C.L., . . . Palczewski K. (2000) Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-cis-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis Neurosci* 17, 667-678.

Cooper A. (1979) Energetics of rhodopsin and isorhodopsin. *FEBS Lett* 100, 382-384.

Cooper A.D., S.F.; Nutley, M.A.; Robb, J.L. (1987) Mechanism of retinal Schiff base formation and hydrolysis in relation to visual pigment photolysis and regeneration: resonance Raman spectroscopy of a tetrahedral carbinolamine intermediate and oxygen-18 labeling of retinal at the metarhodopsin stage in photoreceptor membranes. *J Am Chem Soc* 109, 7254-7263.

Corson D.W., Cornwall M.C., MacNichol E.F., Tsang S., Derguini F., Crouch R.K. and Nakanishi K. (1994) Relief of opsin desensitization and prolonged excitation of rod photoreceptors by 9-desmethylretinal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6958-6962.

Crocker E., Eilers M., Ahuja S., Hornak V., Hirshfeld A., Sheves M. and Smith S.O. (2006) Location of Trp265 in metarhodopsin II: implications for the activation mechanism of the visual receptor rhodopsin. *J Mol Biol* 357, 163-172.

Defoe D.M. and Bok D. (1983) Rhodopsin chromophore exchanges among opsin molecules in the dark. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24, 1211-1226.

Dror R.O., Arlow D.H., Borhani D.W., Jensen M.O., Piana S. and Shaw D.E. (2009) Identification of two distinct inactive conformations of the beta2-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4689-4694.

Elgeti M., Kazmin R., Heck M., Morizumi T., Ritter E., Scheerer P., . . . Bartl F.J. (2011) Conserved Tyr223(5.58) plays different roles in the activation and G-protein interaction of rhodopsin. *J Am Chem Soc* 133, 7159-7165.

Emeis D., Kühn H., Reichert J. and 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 Lett* 143, 29-34.

Fahmy K. and Sakmar T.P. (1993) Regulation of the rhodopsin-transducin interaction by a highly conserved carboxylic acid group. *Biochemistry* 32, 7229-7236.

Fain G.L., Matthews H.R., Cornwall M.C. and Koutalos Y. (2001) Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 81, 117-151.

Farrens D.L. and Khorana H.G. (1995) Structure and function in rhodopsin. Measurement of the rate of metarhodopsin II decay by fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* 270, 5073-5076.

- Ferretti L., Karnik S.S., Khorana H.G., Nassal M. and Oprian D.D. (1986) Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 599-603.
- Fishkin N., Jang Y.P., Itagaki Y., Sparrow J.R. and Nakanishi K. (2003) A2-rhodopsin: a new fluorophore isolated from photoreceptor outer segments. *Org Biomol Chem* 1, 1101-1105.
- Franke R.R., Sakmar T.P., Oprian D.D. and Khorana H.G. (1988) A single amino acid substitution in rhodopsin (lysine 248----leucine) prevents activation of transducin. *J Biol Chem* 263, 2119-2122.
- Fredriksson R., Lagerstrom M.C., Lundin L.G. and Schioth H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272.
- Garron L.K. (1963) The Ultrastructure of the Retinal Pigment Epithelium with Observations on the Choriocapillaris and Bruch's Membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc* 61, 545-588.
- Garwin G.G. and Saari J.C. (2000) High-performance liquid chromatography analysis of visual cycle retinoids. *Methods Enzymol* 316, 313-324.
- Gelis L., Wolf S., Hatt H., Neuhaus E.M. and Gerwert K. (2011) Prediction of a Ligand-binding Niche within a Human Olfactory Receptor by Combining Site-directed Mutagenesis with Dynamic Homology Modeling. *Angew Chem Int Ed Engl*.
- Gether U. and Kobilka B.K. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273, 17979-17982.
- Gluzman Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Gonzalez A., Perez-Acle T., Pardo L. and Deupi X. (2011) Molecular basis of ligand dissociation in beta-adrenergic receptors. *PLoS One* 6, e23815.
- Gonzalez-Fernandez F. (2002) Evolution of the visual cycle: the role of retinoid-binding proteins. *J Endocrinol* 175, 75-88.
- Groenendijk G.W., de Grip W.J. and Daemen F.J. (1979) Identification and characterization of syn- and anti-isomers of retinaloximes. *Anal Biochem* 99, 304-310.
- Gross A.K., Rao V.R. and Oprian D.D. (2003a) Characterization of rhodopsin congenital night blindness mutant T94I. *Biochemistry* 42, 2009-2015.
- Gross A.K., Xie G. and Oprian D.D. (2003b) Slow binding of retinal to rhodopsin mutants G90D and T94D. *Biochemistry* 42, 2002-2008.
- Gurevich V.V. and Benovic J.L. (1993) Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* 268, 11628-11638.
- Hamdorf K.P., R.; Schwemer, J. (1973) Photoregeneration and sensitivity control of photoreceptors of invertebrates. *Biochemistry and Physiology of Visual Pigments*, Springer, Berlin, 155-166.

Hammes G.G., Chang Y.C. and Oas T.G. (2009) Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13737-13741.

Han M., Lin S.W., Smith S.O. and Sakmar T.P. (1996) The effects of amino acid replacements of glycine 121 on transmembrane helix 3 of rhodopsin. *J Biol Chem* 271, 32330-32336.

Hargrave P.A. (1982) Rhodopsin chemistry, structure and topography. *Progress in retinal research* 1, 1-51.

Hargrave P.A. and McDowell J.H. (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *Faseb J* 6, 2323-2331.

Heck M. and Hofmann K.P. (1993) G-protein-effector coupling: a real-time light-scattering assay for transducin-phosphodiesterase interaction. *Biochemistry* 32, 8220-8227.

Heck M. and Hofmann K.P. (2001) Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *J Biol Chem* 276, 10000-10009.

Heck M., Schädel S.A., Maretzki D., Bartl F.J., Ritter E., Palczewski K. and Hofmann K.P. (2003a) Signaling states of rhodopsin. Formation of the storage form, metarhodopsin III, from active metarhodopsin II. *J Biol Chem* 278, 3162-3169.

Heck M., Schädel S.A., Maretzki D. and Hofmann K.P. (2003b) Secondary binding sites of retinoids in opsin: characterization and role in regeneration. *Vision Res* 43, 3003-3010.

Heidenreich K.A., Weiland G.A. and Molinoff P.B. (1980) Characterization of radiolabeled agonist binding to beta-adrenergic receptors in mammalian tissues. *J Cyclic Nucleotide Res* 6, 217-230.

Henselman R.A. and Cusanovich M.A. (1976) Characterization of the recombination reaction of rhodopsin. *Biochemistry* 15, 5321-5325.

Higashijima T., Ferguson K.M., Sternweis P.C., Ross E.M., Smigel M.D. and Gilman A.G. (1987) The effect of activating ligands on the intrinsic fluorescence of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *J Biol Chem* 262, 752-756.

Hildebrand P.W., Scheerer P., Park J.H., Choe H.W., Piechnick R., Ernst O.P., . . . Heck M. (2009) A ligand channel through the G protein coupled receptor opsin. *PLoS One* 4, e4382.

Hofmann K.P. (1985) Effect of GTP on the rhodopsin-G-protein complex by transient formation of extra metarhodopsin II. *Biochim Biophys Acta* 810, 278-281.

Hofmann K.P., Emeis D. and Schnetkamp P.P. (1983) Interplay between hydroxylamine, metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes. *Biochim Biophys Acta* 725, 60-70.

Hofmann K.P., Pulvermüller A., Buczylo J., Van Hooser P. and Palczewski K. (1992) The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin. *J Biol Chem* 267, 15701-15706.

- Hofmann K.P., Scheerer P., Hildebrand P.W., Choe H.W., Park J.H., Heck M. and Ernst O.P. (2009) A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem Sci* 34, 540-552.
- Hofmann K.P., Spahn C.M., Heinrich R. and Heinemann U. (2006) Building functional modules from molecular interactions. *Trends Biochem Sci* 31, 497-508.
- Huang H., Hah J.M. and Silverman R.B. (2001) Mechanism of nitric oxide synthase. Evidence that direct hydrogen atom abstraction from the O-H bond of NG-hydroxyarginine is not relevant to the mechanism. *J Am Chem Soc* 123, 2674-2676.
- Hubbard R., Brown P.K. and Bounds D. (1971) Methodology of vitamin A and visual pigments. *Methods Enzymol* 18, 615-653.
- Imai H., Kefalov V., Sakurai K., Chisaka O., Ueda Y., Onishi A., . . . Shichida Y. (2007) Molecular properties of rhodopsin and rod function. *J Biol Chem* 282, 6677-6684.
- Imai H., Kojima D., Oura T., Tachibanaki S., Terakita A. and Shichida Y. (1997) Single amino acid residue as a functional determinant of rod and cone visual pigments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2322-2326.
- Iyengar R., Abramowitz J., Bordelon-Riser M. and Birnbaumer L. (1980) Hormone receptor-mediated stimulation of adenylyl cyclase systems. Nucleotide effects and analysis in terms of a simple two-state model for the basic receptor-affected enzyme. *J Biol Chem* 255, 3558-3564.
- Jaakola V.P., Griffith M.T., Hanson M.A., Cherezov V., Chien E.Y., Lane J.R., . . . Stevens R.C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322, 1211-1217.
- Jäger F., Jäger S., Krutle O., Friedman N., Sheves M., Hofmann K.P. and 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, 7389-7397.
- Jäger S., Palczewski K. and Hofmann K.P. (1996) Opsin/all-trans-retinal complex activates transducin by different mechanisms than photolyzed rhodopsin. *Biochemistry* 35, 2901-2908.
- Janz J.M. and Farrens D.L. (2001) Engineering a functional blue-wavelength-shifted rhodopsin mutant. *Biochemistry* 40, 7219-7227.
- Janz J.M. and Farrens D.L. (2003) Assessing structural elements that influence Schiff base stability: mutants E113Q and D190N destabilize rhodopsin through different mechanisms. *Vision Res* 43, 2991-3002.
- Janz J.M., Fay J.F. and Farrens D.L. (2003) Stability of dark state rhodopsin is mediated by a conserved ion pair in intradiscal loop E-2. *J Biol Chem* 278, 16982-16991.
- Janz J.M. and Farrens D.L. (2004) Role of the retinal hydrogen bond network in rhodopsin Schiff base stability and hydrolysis. *J Biol Chem* 279, 55886-55894.
- Jastrzebska B., Palczewski K. and Golczak M. (2011) Role of bulk water in hydrolysis of the rhodopsin chromophore. *J Biol Chem* 286, 18930-18937.

Jencks W.P. (1969) Catalysis in Chemistry and Enzymology, *General Publishing Company, Ltd.*, Toronto, Kanada, 0-486-65460-5.

Jin M., Li S., Moghrabi W.N., Sun H. and Travis G.H. (2005) Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 122, 449-459.

Karlin A. (1967) On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *J Theor Biol* 16, 306-320.

Katayama K., Furutani Y. and Kandori H. (2010) FTIR study of the photoreaction of bovine rhodopsin in the presence of hydroxylamine. *J Phys Chem B* 114, 9039-9046.

Kaushal S., Ridge K.D. and Khorana H.G. (1994) Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4024-4028.

Kefalov V.J., Crouch R.K. and Cornwall M.C. (2001) Role of noncovalent binding of 11-cis-retinal to opsin in dark adaptation of rod and cone photoreceptors. *Neuron* 29, 749-755.

Khorana H.G. (1993) Two light-transducing membrane proteins: bacteriorhodopsin and the mammalian rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1166-1171.

Knierim B., Hofmann K.P., Ernst O.P. and Hubbell W.L. (2007) Sequence of late molecular events in the activation of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20290-20295.

Knierim B., Hofmann K.P., Gartner W., Hubbell W.L. and Ernst O.P. (2008) Rhodopsin and 9-demethyl-retinal analog: effect of a partial agonist on displacement of transmembrane helix 6 in class A G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 283, 4967-4974.

Kochendoerfer G.G., Verdegem P.J., van der Hoef I., Lugtenburg J. and Mathies R.A. (1996) Retinal analog study of the role of steric interactions in the excited state isomerization dynamics of rhodopsin. *Biochemistry* 35, 16230-16240.

Kolesnikov A.V., Golobokova E.Y. and Govardovskii V.I. (2003) The identity of metarhodopsin III. *Vis Neurosci* 20, 249-265.

Kono M., Goletz P.W. and Crouch R.K. (2008) 11-cis- and all-trans-retinols can activate rod opsin: rational design of the visual cycle. *Biochemistry* 47, 7567-7571.

Kühn H. (1982) Light-regulated binding of proteins to photoreceptor membranes and its use for the purification of several rod cell proteins. *Methods Enzymol* 81, 556-564.

Kühn H., Bennett N., Michel-Villaz M. and Chabre M. (1981) Interactions between photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein: kinetic and stoichiometric analyses from light-scattering changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6873-6877.

Kuwayama S., Imai H., Hirano T., Terakita A. and Shichida Y. (2002) Conserved proline residue at position 189 in cone visual pigments as a determinant of molecular properties different from rhodopsins. *Biochemistry* 41, 15245-15252.

Lamb T.D. and Pugh E.N., Jr. (2004) Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res* 23, 307-380.

- Lamb T.D. and Pugh E.N., Jr. (2006) Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 5137-5152.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., . . . Chen Y.J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Leibrock C.S. and Lamb T.D. (1997) Effect of hydroxylamine on photon-like events during dark adaptation in toad rod photoreceptors. *J Physiol* 501 (Pt 1), 97-109.
- Lewis J.W. and Kliger D.S. (1992) Photointermediates of visual pigments. *J Bioenerg Biomembr* 24, 201-210.
- Li J., Edwards P.C., Burghammer M., Villa C. and Schertler G.F. (2004) Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J Mol Biol* 343, 1409-1438.
- Liou G.I., Geng L. and Baehr W. (1991) Interphotoreceptor retinoid-binding protein: biochemistry and molecular biology. *Prog Clin Biol Res* 362, 115-137.
- Liu J., Liu M.Y., Fu L., Zhu G.A. and Yan E.C. (2011a) Chemical kinetic analysis of thermal decay of rhodopsin reveals unusual energetics of thermal isomerization and hydrolysis of Schiff base. *J Biol Chem* 286, 38408-38416.
- Liu J., Liu M.Y., Nguyen J.B., Bhagat A., Mooney V. and Yan E.C. (2011b) Thermal properties of rhodopsin: insight into the molecular mechanism of dim-light vision. *J Biol Chem* 286, 27622-27629.
- Lüdeke S., Beck M., Yan E.C., Sakmar T.P., Siebert F. and Vogel R. (2005) The role of Glu181 in the photoactivation of rhodopsin. *J Mol Biol* 353, 345-356.
- Mantina M., Chamberlin A.C., Valero R., Cramer C.J. and Truhlar D.G. (2009) Consistent van der Waals radii for the whole main group. *J Phys Chem A* 113, 5806-5812.
- Matsumoto H. and Yoshizawa T. (1975) Existence of a beta-ionone ring-binding site in the rhodopsin molecule. *Nature* 258, 523-526.
- Matsumoto H. and Yoshizawa T. (2008) Rhodopsin regeneration is accelerated via noncovalent 11-cis retinal-opsin complex--a role of retinal binding pocket of opsin. *Photochem Photobiol* 84, 985-989.
- Matsuyama T., Yamashita T., Imai H. and Shichida Y. (2010) Covalent bond between ligand and receptor required for efficient activation in rhodopsin. *J Biol Chem* 285, 8114-8121.
- Matthews R.G., Hubbard R., Brown P.K. and Wald G. (1963) Tautomeric Forms of Metarhodopsin. *J Gen Physiol* 47, 215-240.
- Meyer C.K., Böhme M., Ockenfels A., Gärtner W., Hofmann K.P. and Ernst O.P. (2000) Signaling states of rhodopsin. Retinal provides a scaffold for activating proton transfer switches. *J Biol Chem* 275, 19713-19718.
- Moiseyev G., Chen Y., Takahashi Y., Wu B.X. and Ma J.X. (2005) RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12413-12418.

Molday R.S. and MacKenzie D. (1983) Monoclonal antibodies to rhodopsin: characterization, cross-reactivity, and application as structural probes. *Biochemistry* 22, 653-660.

Müller F. and Kaupp U.B. (1998) Signal transduction in photoreceptor cells. *Naturwissenschaften* 85, 49-61.

Nakamichi H. and Okada T. (2006a) Crystallographic analysis of primary visual photochemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 4270-4273.

Nakamichi H. and Okada T. (2006b) Local peptide movement in the photoreaction intermediate of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12729-12734.

Nakayama T.A. and Khorana H.G. (1991) Mapping of the amino acids in membrane-embedded helices that interact with the retinal chromophore in bovine rhodopsin. *J Biol Chem* 266, 4269-4275.

Nelson D.C., M. (2001) Lehninger Biochemie, *Springer-Verlag*, Berlin-Heidelberg, 3-540-41813-X.

Neuhaus E.M., Mashukova A., Zhang W., Barbour J. and Hatt H. (2006) A specific heat shock protein enhances the expression of mammalian olfactory receptor proteins. *Chem Senses* 31, 445-452.

Nygaard R., Frimurer T.M., Holst B., Rosenkilde M.M. and Schwartz T.W. (2009) Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* 30, 249-259.

Ohguro H., Rudnicka-Nawrot M., Buczylo J., Zhao X., Taylor J.A., Walsh K.A. and Palczewski K. (1996) Structural and enzymatic aspects of rhodopsin phosphorylation. *J Biol Chem* 271, 5215-5224.

Okada T., Ernst O.P., Palczewski K. and Hofmann K.P. (2001) Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem Sci* 26, 318-324.

Okada T., Fujiyoshi Y., Silow M., Navarro J., Landau E.M. and Shichida Y. (2002) Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5982-5987.

Okada T., Sugihara M., Bondar A.N., Elstner M., Entel P. and 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, 571-583.

Oprian D.D., Molday R.S., Kaufman R.J. and Khorana H.G. (1987) Expression of a synthetic bovine rhodopsin gene in monkey kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8874-8878.

Palczewski K. (2006) G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* 75, 743-767.

Palczewski K., Hargrave P.A., McDowell J.H. and Ingebritsen T.S. (1989) The catalytic subunit of phosphatase 2A dephosphorylates phosphoopsin. *Biochemistry* 28, 415-419.

- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., . . . Miyano M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- Papermaster D.S. (1982) Preparation of retinal rod outer segments. *Methods Enzymol* 81, 48-52.
- Park J.H., Scheerer P., Hofmann K.P., Choe H.W. and Ernst O.P. (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454, 183-187.
- Parkes J.H. and 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, 5054-5061.
- Perez D.M. (2003) The evolutionarily triumphant G-protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol* 63, 1202-1205.
- Philp N.J., Chang W. and Long K. (1987) Light-stimulated protein movement in rod photoreceptor cells of the rat retina. *FEBS Lett* 225, 127-132.
- Piechnick R., Heck M. and Sommer M.E. (2011) Alkylated hydroxylamine derivatives eliminate peripheral retinylidene Schiff bases but cannot enter the retinal binding pocket of light-activated rhodopsin. *Biochemistry* 50, 7168-7176.
- Podleski T., Changeux J.P., Blumenthal R. and Kasai M. (1970) Conformational transitions in the course of membrane excitation. In: Molecular properties of drug receptors. *Ciba Found Symp*, 197-228.
- Poincelot R.P., Millar P.G., Kimbel R.L., Jr. and Abrahamson E.W. (1969) Lipid to protein chromophore transfer in the photolysis of visual pigments. *Nature* 221, 256-257.
- Pugh E.N., Jr., Nikonov S. and Lamb T.D. (1999) Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation. *Curr Opin Neurobiol* 9, 410-418.
- Ramon E., del Valle L.J. and Garriga P. (2003) Unusual thermal and conformational properties of the rhodopsin congenital night blindness mutant Thr-94 --> Ile. *J Biol Chem* 278, 6427-6432.
- Rasmussen S.G., Choi H.J., Rosenbaum D.M., Kobilka T.S., Thian F.S., Edwards P.C., . . . Kobilka B.K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.
- Rath P., DeGrip W.J. and Rothschild K.J. (1998) Photoactivation of rhodopsin causes an increased hydrogen-deuterium exchange of buried peptide groups. *Biophys J* 74, 192-198.
- Ratner V.L., Bagirov I.G. and Fesenko E.E. (1981) Metarhodopsin I can react with hydroxylamine. *Vision Res* 21, 251-253.
- Rattner A., Smallwood P.M. and Nathans J. (2000) Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *J Biol Chem* 275, 11034-11043.

Redmond T.M., Poliakov E., Yu S., Tsai J.Y., Lu Z. and Gentleman S. (2005) Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13658-13663.

Ripps H. and Pepperberg D.R. (1987) Photoreceptor processes in visual adaptation. *Neurosci Res Suppl* 6, S87-105.

Ritter E., Elgeti M. and Bartl F.J. (2008) Activity switches of rhodopsin. *Photochem Photobiol* 84, 911-920.

Ritter E., Elgeti M., Hofmann K.P. and Bartl F.J. (2007) Deactivation and proton transfer in light-induced metarhodopsin II/metarhodopsin III conversion: a time-resolved fourier transform infrared spectroscopic study. *J Biol Chem* 282, 10720-10730.

Ritter E., Zimmermann K., Heck M., Hofmann K.P. and 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, 48102-48111.

Robinson P.R., Cohen G.B., Zhukovsky E.A. and Oprian D.D. (1992) Constitutively active mutants of rhodopsin. *Neuron* 9, 719-725.

Rodieck R.W. (1998) *The First Steps in Seeing.*, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, 0-87893-757-9.

Ruiz A., Winston A., Lim Y.H., Gilbert B.A., Rando R.R. and Bok D. (1999) Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem* 274, 3834-3841.

Ruprecht J.J., Mielke T., Vogel R., Villa C. and Schertler G.F. (2004) Electron crystallography reveals the structure of metarhodopsin I. *Embo J* 23, 3609-3620.

Saari J.C. (2000) Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 337-348.

Sakuragawa M. and Kuwabara T. (1976) The pigment epithelium of the monkey. Topographic study by scanning and transmission electron microscopy. *Arch Ophthalmol* 94, 285-292.

Schädel S.A., Heck M., Maretzki D., Filipek S., Teller D.C., Palczewski K. and 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, 24896-24903.

Scheerer P., Park J.H., Hildebrand P.W., Kim Y.J., Krauss N., Choe H.W., . . . Ernst O.P. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455, 497-502.

Schenborn E.T. and Goiffon V. (2000) DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Methods Mol Biol* 130, 147-153.

Schoenlein R.W., Peteanu L.A., Mathies R.A. and Shank C.V. (1991) The first step in vision: femtosecond isomerization of rhodopsin. *Science* 254, 412-415.

- Schreiber M., Sugihara M., Okada T. and Buss V. (2006) Quantum mechanical studies on the crystallographic model of bathorhodopsin. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 4274-4277.
- Sekharan S. and Morokuma K. (2011) Why 11-*cis*-Retinal? Why Not 7-*cis*-, 9-*cis*-, or 13-*cis*-Retinal in the Eye? *J Am Chem Soc* 133, 19052-19055.
- Shi L., Liapakis G., Xu R., Guarnieri F., Ballesteros J.A. and Javitch J.A. (2002) Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J Biol Chem* 277, 40989-40996.
- Shichi H., Adams A.J. and Kobata A. (1980) The oligosaccharide moiety of rhodopsin-its structure and cellular location. *Neurochem Int* 1C, 245-253.
- Smith S.O. (2010) Structure and activation of the visual pigment rhodopsin. *Annu Rev Biophys* 39, 309-328.
- Sokolov M., Lyubarsky A.L., Strissel K.J., Savchenko A.B., Govardovskii V.I., Pugh E.N., Jr. and Arshavsky V.Y. (2002) Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. *Neuron* 34, 95-106.
- Sommer M.E., Smith W.C. and Farrens D.L. (2005) Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: arrestin and retinal release are directly linked events. *J Biol Chem* 280, 6861-6871.
- Sommer M.E., Smith W.C. and Farrens D.L. (2006) Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: acidic phospholipids enable binding of arrestin to purified rhodopsin in detergent. *J Biol Chem* 281, 9407-9417.
- Sparrow J.R., Fishkin N., Zhou J., Cai B., Jang Y.P., Krane S., . . . Nakanishi K. (2003) A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res* 43, 2983-2990.
- Standfuss J., Edwards P.C., D'Antona A., Fransen M., Xie G., Oprian D.D. and Schertler G.F. (2011) The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature* 471, 656-660.
- Standfuss J., Xie G., Edwards P.C., Burghammer M., Oprian D.D. and Schertler G.F. (2007) Crystal structure of a thermally stable rhodopsin mutant. *J Mol Biol* 372, 1179-1188.
- Standfuss J., Zaitseva E., Mahalingam M. and Vogel R. (2008) Structural impact of the E113Q counterion mutation on the activation and deactivation pathways of the G protein-coupled receptor rhodopsin. *J Mol Biol* 380, 145-157.
- Stavenga D.G. (1996) Insect retinal pigments: spectral characteristics and physiological functions. *Prog Retin Eye Res* 15, 231-259.
- Steinberg G., Ottolenghi M. and Sheves M. (1993) pKa of the protonated Schiff base of bovine rhodopsin. A study with artificial pigments. *Biophys J* 64, 1499-1502.
- Strissel K.J., Lishko P.V., Trieu L.H., Kennedy M.J., Hurley J.B. and Arshavsky V.Y. (2005) Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors. *J Biol Chem* 280, 29250-29255.

Strissel K.J., Sokolov M., Trieu L.H. and Arshavsky V.Y. (2006) Arrestin translocation is induced at a critical threshold of visual signaling and is superstoichiometric to bleached rhodopsin. *J Neurosci* 26, 1146-1153.

Struts A.V., Salgado G.F., Tanaka K., Krane S., Nakanishi K. and Brown M.F. (2007) Structural analysis and dynamics of retinal chromophore in dark and meta I states of rhodopsin from 2H NMR of aligned membranes. *J Mol Biol* 372, 50-66.

Sugihara M., Hufen J. and Buss V. (2006) Origin and consequences of steric strain in the rhodopsin binding pocket. *Biochemistry* 45, 801-810.

Sun H., Molday R.S. and Nathans J. (1999) Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem* 274, 8269-8281.

Surya A., Foster K.W. and Knox B.E. (1995) Transducin activation by the bovine opsin apoprotein. *J Biol Chem* 270, 5024-5031.

Tran T.P., Ellsworth E.L., Stier M.A., Domagala J.M., Hollis Showalter H.D., Gracheck S.J., . . . Singh R. (2004) Synthesis and structural-activity relationships of 3-hydroxyquinazoline-2,4-dione antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 4405-4409.

Ts'o M.O. and Friedman E. (1968) The retinal pigment epithelium. 3. Growth and development. *Arch Ophthalmol* 80, 214-216.

van Kuijk F.J., Handelman G.J. and Dratz E.A. (1985) Rapid analysis of the major classes of retinoids by step gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography using retinal (O-ethyl) oxime derivatives. *J Chromatogr* 348, 241-251.

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., . . . Zhu X. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Visiers I., Ballesteros J.A. and Weinstein H. (2002) Three-dimensional representations of G protein-coupled receptor structures and mechanisms. *Methods Enzymol* 343, 329-371.

Vogel R., Mahalingam M., Ludeke S., Huber T., Siebert F. and Sakmar T.P. (2008) Functional role of the "ionic lock" - an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors. *J Mol Biol* 380, 648-655.

Vogel R., Sakmar T.P., Sheves M. and Siebert F. (2007) Coupling of protonation switches during rhodopsin activation. *Photochem Photobiol* 83, 286-292.

Vogel R. and Siebert F. (2001) Conformations of the active and inactive states of opsin. *J Biol Chem* 276, 38487-38493.

Vogel R., Siebert F., Mathias G., Tavan P., Fan G. and Sheves M. (2003) Deactivation of rhodopsin in the transition from the signaling state meta II to meta III involves a thermal isomerization of the retinal chromophore C[double bond]D. *Biochemistry* 42, 9863-9874.

Vogel R., Siebert F., Zhang X.Y., Fan G. and Sheves M. (2004) Formation of Meta III during the decay of activated rhodopsin proceeds via Meta I and not via Meta II. *Biochemistry* 43, 9457-9466.

- Wald G. and Brown P.K. (1953) The molar extinction of rhodopsin. *J Gen Physiol* 37, 189-200.
- Wang T. and Duan Y. (2009) Ligand entry and exit pathways in the beta2-adrenergic receptor. *J Mol Biol* 392, 1102-1115.
- Wang T. and Duan Y. (2011) Retinal release from opsin in molecular dynamics simulations. *J Mol Recognit* 24, 350-358.
- Warne T., Serrano-Vega M.J., Baker J.G., Moukhametzianov R., Edwards P.C., Henderson R., . . . Schertler G.F. (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491.
- Warshel A. (1976) Bicycle-pedal model for the first step in the vision process. *Nature* 260, 679-683.
- Weiss J.M., Morgan P.H., Lutz M.W. and Kenakin T.P. (1996) The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol* 181, 381-397.
- Weng J., Mata N.L., Azarian S.M., Tzekov R.T., Birch D.G. and Travis G.H. (1999) Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 98, 13-23.
- Whelan J.P. and McGinnis J.F. (1988) Light-dependent subcellular movement of photoreceptor proteins. *J Neurosci Res* 20, 263-270.
- Wilden U., Hall S.W. and Kuhn H. (1986) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1174-1178.
- Xie G., Gross A.K. and Oprian D.D. (2003) An opsin mutant with increased thermal stability. *Biochemistry* 42, 1995-2001.
- Yan E.C., Kazmi M.A., Ganim Z., Hou J.M., Pan D., Chang B.S., . . . Mathies R.A. (2003) Retinal counterion switch in the photoactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9262-9267.
- Ye S., Zaitseva E., Caltabiano G., Schertler G.F., Sakmar T.P., Deupi X. and Vogel R. (2010) Tracking G-protein-coupled receptor activation using genetically encoded infrared probes. *Nature* 464, 1386-1389.
- Zaitseva E., Brown M.F. and Vogel R. (2010) Sequential rearrangement of interhelical networks upon rhodopsin activation in membranes: the Meta II(a) conformational substate. *J Am Chem Soc* 132, 4815-4821.
- Zhukovsky E.A., Robinson P.R. and Oprian D.D. (1991) Transducin activation by rhodopsin without a covalent bond to the 11-cis-retinal chromophore. *Science* 251, 558-560.
- Zimmermann K., Ritter E., Bartl F.J., Hofmann K.P. and Heck M. (2004) Interaction with transducin depletes metarhodopsin III: a regulated retinal storage in visual signal transduction? *J Biol Chem* 279, 48112-48119.

Literatur und Software aus dem Internet

<http://www.skidmore.edu/~hfoley/Perc3.htm>

<http://www.vetmed.vt.edu/education/curriculum/vm8054/eye/ROD.HTM>

<http://www.pymol.org>

Anlage

Oligonukleotide

Tabelle 5.1: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung der Rhodopsinmutanten. Die Reihenfolge der DNA-Basen Cytosin (C), Guanin (G), Adenin (A) und Thymin (T) ist in 5' zu 3'-Richtung dargestellt und sind komplementär zur Plasmid-DNA. (P) steht für die Verwendung phosphorylierter Oligonukleotide, da diese an der DpnI-Schnittstelle binden.

Mutation	Oligonukleotide (Primer) 5' → 3'
	D282C Forward: CACCCATCAGGGCTCTTGTTTTGGGCCCATCTTC D282C Reverse: GAAGATGGGCCAAAACAAGAGCCCTGATGGGTG
N2C/D282C	N2C Forward: P – ATTCCACCATGTGCGGTAC N2C Reverse: P – CGCACATGGTGG
M39W	Forward: CTGGCAGTTCTCCTGGCTGGCCGCCTAC Reverse: GTAGGCGGCCAGCCAGGAGAACTGCCAG
L40D	Forward: CTGGCAGTTCTCCATGGATGCCGCCTACATGTTC Reverse: GAACATGTAGGCGGCATCCATGGAGAACTGCCAG
L40F	Forward: CTGGCAGTTCTCCATGTTCCGCCCTACATGTTC Reverse: GAACATGTAGGCGGCAACATGGAGAACTGCCAG
Y43A	Forward: GTTCTCCATGCTGGCCGCCCATGTTCTGCTGATCATG Reverse: CATGATCAGCAGGAACATGGCGCGGCCAGCATGGAGAAC
Y43W	Forward: CTCCATGCTGGCCGCCTGGATGTTCTGCTGATCATG Reverse: CATGATCAGCAGGAACATCCAGGCGGCCAGCATGGAG
M44F	Forward: CATGCTGGCCGCCTACTTTTTCTGCTGATCATGC Reverse: GCATGATCAGCAGGAAAAAGTAGGCGGCCAGCATG
F293A	Forward: ATCTTCATGACCATCCCGGCTGCGTTTGCCAAGACGTCT Reverse: AGACGTCTGGCAAACGCAGCCGGGATGGTCATGAAGAT
F293L	Forward: P – CATCTTCATGACCATCCCGGCTTTGTTTGCCAAGACGT ³ Reverse: P – CTTGGCAAACAAAGCCGGGATGGTCATGAAGATGGGCC ³
T289A	Forward: GGGCCATCTTCATGGCCATCCCGGCTTTCTTTG Reverse: CAAAGAAAGCCGGGATGGCCATGAAGATGGGCC
T289D	Forward: GGCCCATCTTCATGGACATCCCGGCTTTC Reverse: GAAAGCCGGGATGTCCATGAAGATGGGCC

5 ANHANG

T289R	Forward: GGCCCATCTTCATGAGAATCCCGGCTTTCTTTG Reverse: CAAAGAAAGCCGGGATTCTCATGAAGATGGGCC
T289F	Forward: CCCATCTTCATGTTTATCCCGGCTTTCTTT Reverse: AAAGAAAGCCGGGATAAACATGAAGATGGG
T94A	Forward: GGCTTCACCACCGCCCTCTACACCTC Reverse: GAGGTGTAGAGGGCGGTGGTGAAGCC
T94I	Forward: GTGGCTTCACCACCATTCTCTACACCTCTCTC Reverse: GAGAGAGGTGTAGAGAATGGTGGTGAAGCCAC
F91L	Forward: P – GATCTCTTCATGGTCTTCGGTGGCTTG Reverse: P – ATGGAGAGAGGTGTAGAGGGTGGTGGT
A292L	Forward: CTCATGACCATCCCGTTGTTCTTTGCCAAGACGTC Reverse: GACGTCTTGGCAAAGAACAACGGGATGGTCATGAAG
A292V	Forward: CATGACCATCCCGGTCTTCTTTGCCAAGACG Reverse: CGTCTTGGCAAAGAAGACCGGGATGGTCATG
A292F	Forward: TTCATGACCATCCCGTTTTTCTTTGCCAAG Reverse: CTTGGCAAAGAAAACGGGATGGTCATGAA
E181Q	Forward: GGCTGCAACCTCGAGGGCTTCTTT Reverse: GTAGTAATCGATCCCGCACGAGCACTGCATGCCCTGCGGGA
S186A	Forward: GAGGGCATGCAGTGCGCGTGCGGGATCGATTAC Reverse: GTAATCGATCCCGCACGCGCACTGCATGCCCTC
Y268E	Forward: CTAATCTGCTGGCTGCCAGAAGCTGGTGTGGCGTTCTAC Reverse: GTAGAACGCCACACCAGCTTCTGGCAGCCAGCAGATTAG
Y268F	Forward: CTAATCTGCTGGCTGCCATTTGCTGGTGTGGCGTTCTAC Reverse: GTAGAACGCCACACCAGCAAATGGCAGCCAGCAGATTAG
M207A	Forward: GTCGTTTCGTCATCTACGCGTTTCGTGGTCCACTTC Reverse: GAAGTGGACCACGAACGCGTAGATGACGAACGAC
A272V	Forward: GCCATATGCTGGTGTGGTTTTCTACATCTTCACCC Reverse: GGGTGAAGATGTAGAAAACCACACCAGCATATGGC
A272I	Forward: CCATATGCTGGTGTGATCTTCTACATCTTCACC Reverse: GTGAAGATGTAGAAGATCACACCAGCATATGG

A272F	Forward: CTGCCATATGCTGGTGTGTTTTCTACATCTTCACCCATC Reverse: GATGGGTGAAGATGTAGAAAAACACACCAGCATATGGCAG
V204F	Forward: CAACAATGAGTCGTTCTTCATCTACATGTTTCGTG Reverse: CACGAACATGTAGATGAAGAACGACTCATTGTTG
I205Q	Forward: CAACAATGAGTCGTTTCGTCCAATACATGTTTCGTGGTCCAC Reverse: GTGGACCACGAACATGTATTGGACGAACGACTCATTGTTG
F208L	Forward: GTCATCTACATGTTGGTGGTCCACTTCATC Reverse: GATGAAGTGGACCACCAACATGTAGATGAC
F208Q	Forward: CGTTCGTCATCTACATGCAAGTGGTCCACTTCATCATC Reverse: GATGATGAAGTGGACCATTGCATGTAGATGACGAACG
F273L	Forward: CTGGTGTGGCGTTGTACATCTTCACCC Reverse: GGGTGAAGATGTACAACGCCACACCAG
F273Q	Forward: CATATGCTGGTGTGGCGCAATACATCTTCACCCATC Reverse: GATGGGTGAAGATGTATTGCGCCACACCAGCATATG
F276L	Forward: CGTTCTACATCTTGACCCATCAGGGCTC Reverse: GAGCCCTGATGGGTCAAGATGTAGAACG
F276Q	Forward: GTGGCGTTCTACATCCAAACCCATCAGGGCT Reverse: AGCCCTGATGGGTTTGGATGTAGAACGCCAC
K296G	Forward: CCGGCTTTCTTTGCCGGGACGTCTGCCGTCTAC Reverse: GTAGACGGCAGACGTCCCGGCAAAGAAAGCCGG

G_t-Proteinaktivierungsraten

Tabelle 5.2: Aufstellung der in dieser Arbeit bestimmten G_t-Proteinaktivierung der Rhodopsinmutanten. Für 15 ausgewählte Rhodopsinmutanten wurde die lichtinduzierte und basale G_t-Proteinaktivierung gemessen. Die dargestellten Daten präsentieren die Mittelwerte der auf die Endamplitude normierten Anfangssteigung aus neun (N2C/D282C-Kontrolle) bzw. drei (alle anderen Mutanten) Messungen mit der entsprechenden Standardabweichung (SD).

Mutante	Lichtinduzierte G _t - Proteinaktivierung	Basale G _t - Proteinaktivierung
	Anfangssteigung auf Amplitude normiert ± SD (s)	Anfangssteigung auf Amplitude normiert ± SD (s)
N2C/D282C-Kontrolle	$1,82 \times 10^{-2} \pm 0,27 \times 10^{-2}$	$0,82 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3}$
Y43A	$1,83 \times 10^{-2} \pm 0,03 \times 10^{-2}$	$0,43 \times 10^{-3} \pm 0,06 \times 10^{-3}$
M44F	$1,5 \times 10^{-2} \pm 0,16 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-3} \pm 0,29 \times 10^{-3}$
T289F	$2 \times 10^{-2} \pm 0,22 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-3} \pm 0,06 \times 10^{-3}$
T94I	$2,1 \times 10^{-2} \pm 0,18 \times 10^{-2}$	$0,21 \times 10^{-3} \pm 0,06 \times 10^{-3}$
A292F	$1,67 \times 10^{-2} \pm 0,03 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-3} \pm 0,7 \times 10^{-3}$
K296G	$0,93 \times 10^{-2} \pm 0,17 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-3} \pm 0,5 \times 10^{-3}$
E181Q	$1,67 \times 10^{-2} \pm 0,09 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-3} \pm 0,15 \times 10^{-3}$
S186A	$2 \times 10^{-2} \pm 0,06 \times 10^{-2}$	$0,6 \times 10^{-3} \pm 0,06 \times 10^{-3}$
Y268F	$1,46 \times 10^{-2} \pm 0,08 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3}$
M207A	$1,26 \times 10^{-2} \pm 0,09 \times 10^{-2}$	$1,64 \times 10^{-3} \pm 0,3 \times 10^{-3}$
A272I	$1,53 \times 10^{-2} \pm 0,09 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-3} \pm 0,3 \times 10^{-3}$
V204F	$1,6 \times 10^{-2} \pm 0,19 \times 10^{-2}$	$1,53 \times 10^{-3} \pm 0,06 \times 10^{-3}$
F208Q	$1,64 \times 10^{-2} \pm 0,13 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-3} \pm 0,3 \times 10^{-3}$
F273Q	$1,9 \times 10^{-2} \pm 0,07 \times 10^{-2}$	$0,82 \times 10^{-3} \pm 0,1 \times 10^{-3}$
F276Q	$1,83 \times 10^{-2} \pm 0,17 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-3} \pm 0,1 \times 10^{-3}$

Geschwindigkeiten der Retinalaufnahme und -abgabe

Tabelle 5.3: Aufstellung der in dieser Arbeit bestimmten Geschwindigkeiten der Retinalaufnahme und -abgabe durch die Rhodopsinmutanten. Für 35 ausgewählte Rhodopsinmutanten wurde die Regeneration mit 11-*cis*-Retinal sowie der Meta II-Zerfall in An- und Abwesenheit von Hydroxylaminen (HA und MHA) gemessen. Die dargestellten Daten präsentieren die Mittelwerte der Geschwindigkeit einer bimolekularen Reaktion (Regeneration) und einer monoexponentiellen Funktion (Meta II-Zerfall \pm HA) aus drei Messungen mit der entsprechenden Standardabweichung (SD).

Mutante	Regeneration $k \pm \text{SD}$ ($\mu\text{M}^*\text{s}$)	Meta II-Zerfall $k \pm \text{SD}$ (s)	Meta II-Zerfall	Meta II-Zerfall
			in Anwesenheit von HA $k \pm \text{SD}$ (s)	Anwesenheit von MHA $k \pm \text{SD}$ (s)
N2C/D282C- Kontrolle	$0,074 \pm 0,0136$	$0,83 \times 10^{-3} \pm 0,062 \times 10^{-3}$	$0,065 \pm 0,0207$	$0,22 \times 10^{-2}$
M39W	$0,053 \pm 0,0185$	$0,87 \times 10^{-3} \pm 0,064 \times 10^{-3}$	0,078	$0,38 \times 10^{-2}$
F293A	$0,075 \pm 0,0123$	$1,23 \times 10^{-3} \pm 0,048 \times 10^{-3}$	$0,24 \pm 0,17$	$0,26 \times 10^{-2}$
F293L	$0,077 \pm 0,0083$	$0,52 \times 10^{-3} \pm 0,028 \times 10^{-3}$	$0,041 \pm 0,0004$	$0,077 \times 10^{-2}$
Y43A	$0,005 \pm 0,003$	$1,4 \times 10^{-3} \pm 0,045 \times 10^{-3}$	$0,249 \pm 0,064$	$3,06 \times 10^{-2}$
Y43W	$0,041 \pm 0,0005$	$1,3 \times 10^{-3} \pm 0,051 \times 10^{-3}$	$0,103 \pm 0,034$	$0,79 \times 10^{-2}$
L40D	$0,1 \pm 0,034$	$1,5 \times 10^{-3} \pm 0,14 \times 10^{-3}$	$0,189 \pm 0,125$	$0,69 \times 10^{-2}$
L40F	$0,041 \pm 0,014$	$0,67 \times 10^{-3} \pm 0,06 \times 10^{-3}$	$0,064 \pm 0,019$	$0,22 \times 10^{-2}$
M44F	$0,052 \pm 0,0112$	$4,1 \times 10^{-3}$	$0,048 \pm 0,005$	$0,40 \times 10^{-2}$
T289A	$0,054 \pm 0,0036$	$0,64 \times 10^{-3} \pm 0,03 \times 10^{-3}$	$0,074 \pm 0,009$	$0,19 \times 10^{-2}$
T289D	$0,005 \pm 0,0015$	$2 \times 10^{-3} \pm 0,145 \times 10^{-3}$	$0,25 \pm 0,13$	$1,27 \times 10^{-2}$
T289R	$0,004 \pm 0,0008$	$1,6 \times 10^{-3} \pm 0,045 \times 10^{-3}$	$0,13 \pm 0,062$	$0,88 \times 10^{-2}$
T289F	$0,003 \pm 0,0013$	$0,55 \times 10^{-3} \pm 0,02 \times 10^{-3}$	$0,028 \pm 0,004$	$0,077 \times 10^{-2}$
T94A	$0,028 \pm 0,0135$	$2,4 \times 10^{-3} \pm 0,12 \times 10^{-3}$	$0,148 \pm 0,051$	$0,47 \times 10^{-2}$
T94I	$0,024 \pm 0,0064$	$0,17 \times 10^{-3} \pm 0,025 \times 10^{-3}$	$0,005 \pm 0,0027$	$0,032 \times 10^{-2}$
F91L	$0,119 \pm 0,0163$	$0,46 \times 10^{-3} \pm 0,05 \times 10^{-3}$	$0,037 \pm 0,0072$	$0,13 \times 10^{-2}$
A292L	$0,003 \pm 0,0019$	$0,17 \times 10^{-3} \pm 0,021 \times 10^{-3}$	$0,039 \pm 0,0139$	$0,12 \times 10^{-2}$
A292V	$0,0007 \pm 0,0001$	$0,24 \times 10^{-3} \pm 0,029 \times 10^{-3}$	$0,1 \pm 0,0137$	$0,4 \times 10^{-2}$
A292F	$0,0009 \pm 0,0002$	$0,49 \times 10^{-3} \pm 0,02 \times 10^{-3}$	$0,068 \pm 0,0131$	$0,58 \times 10^{-2}$
E181Q	$0,013 \pm 0,0052$	$1,7 \times 10^{-3} \pm 0,085 \times 10^{-3}$	$0,113 \pm 0,0082$	$0,44 \times 10^{-2}$
S186A	$0,04 \pm 0,0015$	$0,31 \times 10^{-3}$	$0,03 \pm 0,0017$	$0,36 \times 10^{-2}$
Y268E	$0,0005 \pm 0,0003$	$2,7 \times 10^{-3} \pm 0,23 \times 10^{-3}$	$0,234 \pm 0,059$	$4,66 \times 10^{-2}$
Y268F	$0,005 \pm 0,003$	$0,13 \times 10^{-3} \pm 0,1 \times 10^{-3}$	$0,288 \pm 0,094$	$4,88 \times 10^{-2}$

5 ANHANG

M207A	$0,01 \pm 0,0067$	$1,8 \times 10^{-3} \pm 0,061 \times 10^{-3}$	$0,303 \pm 0,088$	$0,94 \times 10^{-2}$
A272V	$0,041 \pm 0,0017$	$3,5 \times 10^{-3} \pm 0,379 \times 10^{-3}$	$0,42 \pm 0,35$	$6,28 \times 10^{-2}$
A272I	$0,012 \pm 0,0066$	$13 \times 10^{-3} \pm 1,3 \times 10^{-3}$	$0,367 \pm 0,047$	$8,75 \times 10^{-2}$
A272F	$0,011 \pm 0,0029$	$0,92 \times 10^{-3} \pm 0,035 \times 10^{-3}$	$0,155 \pm 0,057$	$1,35 \times 10^{-2}$
V204	$0,062 \pm 0,0056$	$1,37 \times 10^{-3} \pm 0,15 \times 10^{-3}$	$0,222 \pm 0,051$	$1,22 \times 10^{-2}$
I205	$0,028 \pm 0,0017$	$0,77 \times 10^{-3}$	$0,094$	$0,32 \times 10^{-2}$
F208L	$0,015 \pm 0,0059$	$0,94 \times 10^{-3} \pm 0,029 \times 10^{-3}$	$0,078 \pm 0,032$	$0,49 \times 10^{-2}$
F208Q	$0,003 \pm 0,0013$	$0,94 \times 10^{-3} \pm 0,056 \times 10^{-3}$	$0,081 \pm 0,021$	$0,28 \times 10^{-2}$
F273L	$0,074 \pm 0,0293$	$0,94 \times 10^{-3} \pm 0,046 \times 10^{-3}$	$0,094 \pm 0,074$	$0,59 \times 10^{-2}$
F273Q	$0,018 \pm 0,009$	$0,76 \times 10^{-3}$	$0,073$	$0,63 \times 10^{-2}$
F276L	$0,034 \pm 0,0061$	$1,2 \times 10^{-3} \pm 0,046 \times 10^{-3}$	$0,087 \pm 0,018$	$0,43 \times 10^{-2}$
F276Q	$0,02 \pm 0,0114$	$0,903 \times 10^{-3}$	$0,072$	$0,22 \times 10^{-2}$
