

"Konformationsänderung des Guanylatzyklase-aktivierenden
Proteins 2 (GCAP-2) zur Aktivierung der
Sehstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase (ROS-GC1)"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Thomas Schröder

geb. am: 11. Juli 1980 in: Friedrichroda

Gutachter /in

1. PD Dr. habil. Hauke Lilie, Martin-Luther-Universität Halle
2. Prof. Dr. Daniel Huster, Universität Leipzig
3. Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

Verteidigt am 07. März 2011 in Halle (Saale)

in vitro veritas

Zusammenfassung

Das Guanylatzyklase-aktivierende Protein 2 (GCAP-2), ein Ca^{2+} -Bindeprotein aus der Familie der Neuronalen Calciumsensoren (NCS), kontrolliert die Aktivität der Sehstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase (ROS-GC). Diese Regulation spielt eine Schlüsselrolle bei der Wiederherstellung des Dunkelzustands nach Belichtung in Photorezeptorzellen und damit bei der Feedbackregulation der Lichtsignaltransduktion. Wie alle NCS ist auch GCAP-2 an seinem N-Terminus myristoyliert.

Der molekulare Mechanismus der Regulation der ROS-GC durch GCAP-2 ist dabei genauso wenig verstanden wie die Rolle der Myristoylierung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Membranbindung von GCAP-2 näher charakterisiert werden. Des Weiteren konnte die thermodynamische Stabilität, abhängig von der Anwesenheit der Liganden Mg^{2+} und Ca^{2+} bestimmt werden. Dabei wurde vor allem die von Ca^{2+} hervorgerufene Konformationsänderung charakterisiert. Ein besonderes Augenmerk bei diesen Untersuchungen wurde auf die Rolle der N-terminalen Lipidmodifikation gelegt. Diese Lipidmodifikation, die die Bindung an Membranen nicht erhöht, bewirkte eine thermodynamische Stabilisierung und eine Erhöhung der Kooperativität der Faltung/Entfaltung in Anwesenheit von Ca^{2+} . In Abwesenheit von Ca^{2+} wurden die thermodynamische Stabilität und die Kooperativität der Faltung/Entfaltung nicht durch die Myristoylgruppe verändert. Dennoch schien die Fettsäuremodifikation, sowohl im Ca^{2+} -gebundenem als auch im Ca^{2+} -freien Zustand, lösungsmittelzugänglich zu sein. Dies konnte anhand der Zugänglichkeit der SH-Gruppe eines mit 12-Mercaptododecansäure modifizierten GCAP-2 gezeigt werden. Analog dazu gelang es, isopenmarkierte Myristinsäure an den N-Terminus zu knüpfen. Dies ermöglichte die Lokalisation der Fettsäure sowohl in der Membran als auch frei beweglich in Lösung.

Ein Peptid, das die Myristoylgruppe und die ersten 19 Aminosäuren von GCAP-2 trägt, ist ausreichend, um die ROS-GC1 voll zu aktivieren. Gleichzeitig wirkt dieses Peptid auch als Kompetitor der ROS-GC1-Aktivierung durch Ca^{2+} -freies GCAP-2.

Anhand dieser Erkenntnisse konnte ein Modell der Aktivierung der ROS-GC1 durch GCAP-2 entworfen werden.

ZUSAMMENFASSUNG..... III

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... VIII

1. EINLEITUNG 1

1.1 EF-HAND PROTEINE..... 1

1.1.1 NEURONALE Ca^{2+} -SENSOREN 3

1.1.1.1 Ca^{2+} -Myristoyl-switch 3

1.1.1.2 Membranbindung 4

1.2 PHOTOTRANSDUKTION..... 5

1.3 MEMBRANSTÄNDIGE GUANYLATZYKLASEN 7

1.3.1 DURCH EXTRAZELLULÄRE PEPTID-LIGANDEN REGULIERTE GCS 8

1.3.2 DURCH Ca^{2+} -BINDEPROTEINE REGULIERTE GC 9

1.3.2.1 ROS-GC1 und 2 als Ca^{2+} -abhängig Schlüsselenzyme der Phototransduktion 9

1.3.2.2 Regulation der ROS-GC1 außerhalb des Sechstäbchenaußensegments 10

1.3.2.3 Bindestellen verschiedener Ca^{2+} -Bindepoteine an die ROS-GC1 11

1.3.2.4 Regulation der ROS-GC1 durch GCAP 12

1.4 ZIELSTELLUNG..... 18

2. MATERIAL UND METHODEN 19

2.1 MATERIAL 19

2.1.1 CHEMIKALIEN..... 19

2.1.2 PROTEINE UND STANDARDS 22

2.1.3 KITS 22

2.1.4 PLASMIDE 22

2.1.5 *E. COLI* STÄMME & ZELLINIEN 22

2.1.6 SOFTWARE..... 23

2.1.7 SONSTIGE MATERIALIEN 23

2.1.8 GERÄTE UND ZUBEHÖR 24

2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 27

2.2.1.1 Plasmidpräparation..... 27

2.2.1.2 Analyse des Plasmids 27

2.2.1.3 Herstellung chemokompetenter Zellen 27

2.2.1.4 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock 27

2.2.1.5	Kultivierung von <i>E. coli</i>	28
2.2.2	PROTEINEXPRESSION	28
2.2.2.1	Heterologe Expression von GCAP-2 in <i>E. coli</i> im Erlenmeyerkolben	28
2.2.2.2	Koexpression von GCAP-2 mit pBB131 im Bioreaktor.....	29
2.2.3	ZELLAUFSCHLUSS, PRÄPARATION VON <i>INCLUSION BODIES</i> UND RENATURIERUNG	29
2.2.3.1	Präparation von <i>inclusion bodies</i>	29
2.2.3.2	Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	30
2.2.3.3	Renaturierung von GCAP-2 aus solubilisierten <i>inclusion bodies</i>	31
2.2.4	CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG DER GCAPS.....	31
2.2.4.1	Ionenaustauschchromatographie.....	31
2.2.4.2	Präparative Größenausschlusschromatographie	31
2.2.4.3	analytische Größenausschlusschromatographie.....	32
2.2.4.4	<i>reversed phase</i> Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	32
2.2.4.5	Chromatographie mit einer Fluoroapatit-Säule.....	32
2.2.5	METHODEN ZUR ANALYSE UND IDENTIFIKATION VON PROTEINEN	33
2.2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford	33
2.2.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz	34
2.2.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorptionsmessung	34
2.2.5.5	Analytische rpHPLC.....	35
2.2.5.6	Entsalzen mittels ZipTip	35
2.2.6	NACHWEIS DER AKTIVITÄT VON GCAP-2.....	35
2.2.6.1	Kultivierung von HEK293 Zellen.....	35
2.2.6.2	Etablierung der transienten Expression in HEK293 Zellen	35
2.2.6.3	Transiente Expression im größeren Maßstab.....	36
2.2.6.4	Präparation der Zellmembran	36
2.2.6.5	Bestimmung der Aktivität der ROS-GC1 und Modulation dieser.....	37
2.2.7	LIPIDBINDUNG.....	38
2.2.7.1	Präparation von unilamellaren Lipidvesikeln	38
2.2.7.2	Probenvorbereitung.....	39
2.2.7.3	Liposomenbindungsassay	39
2.2.7.4	² H-Festkörper-NMR-Spektroskopie	39
2.2.8	BESTIMMUNG DER THERMODYNAMISCHEN STABILITÄT & CHARAKTERISIERUNG DER HYDROPHOBEN OBERFLÄCHE	39
2.2.8.1	Probenvorbereitung.....	39
2.2.8.2	Chemisch induzierte Faltung/Entfaltung	40
2.2.8.3	Thermisch & chemisch induzierte Faltung/Entfaltung	41

2.2.9	BESTIMMUNG DER HYDROPHOBEN OBERFLÄCHE MIT ANS	42
2.2.10	BESTIMMUNG ZUGÄNGLICHER THIOL-GRUPPEN VON GCAP-2.....	43
2.2.10.1	Bestimmung zugänglicher Thiol-Gruppen mittels DTNB	43
2.2.10.2	Bestimmung zugänglicher Thiol-Gruppen durch Modifikation und massenspektrometrischer Analyse.....	43
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	44
3.1	PROTEINEXPRESSION, ISOLIERUNG VON <i>INCLUSION BODIES</i> UND RÜCKFALTUNG	44
3.2	PROTEINREINIGUNG	44
3.3	CHARAKTERISIERUNG VON GCAP-2	46
3.3.1	SPEKTROSKOPISCHE EIGENSCHAFTEN	46
3.3.2	OLIGOMERISIERUNGSZUSTAND.....	47
3.3.3	AKTIVITÄTSTEST	48
3.4	MEMBRANBINDUNG VON GCAP-2	49
3.4.1	BINDUNG AN LUVS	49
3.4.2	BINDUNG AN LUVS MIT VERSCHIEDENEN ANTEILEN AN POPS	50
3.4.3	FESTKÖRPER-NMR	51
3.5	EINFLUSS DER MYRISTOYLGRUPPE AUF DIE STABILITÄT	57
3.5.1	CHEMISCH INDUZIERTER FALTUNG/ENTFALTUNG.....	57
3.5.2	THERMISCH UND CHEMISCH INDUZIERTER FALTUNG/ENTFALTUNG	61
3.6	KONFORMATIONSÄNDERUNGEN DURCH Ca^{2+}-BINDUNG	64
3.6.1	TITRATION DER HYDROPHOBEN OBERFLÄCHE	64
3.6.2	ZUGÄNGLICHKEIT VON SH-GRUPPEN.....	67
3.6.2.1	Einführung einer zusätzlichen Thiolgruppe an die ω -Position der Fettsäuremodifikation	68
3.6.2.2	Charakterisierung von thio-GCAP-2.....	69
3.6.2.3	Reaktion mit DTNB	71
3.6.2.4	Zuordnung der Thiolgruppen bezüglich ihrer Reaktivität.....	74
3.6.3	BEDEUTUNG DES N-TERMINUS FÜR DIE REGULATION DER ROS-GC.....	76
4.	<u>DISKUSSION</u>	79
4.1	EIGENSCHAFTEN DER GCAP-2-VARIANTEN	79
4.1.1	EINFLUSS DER LIGANDEN Ca^{2+} UND Mg^{2+}	81
4.1.2	EINFLUSS DER MYRISTOYLGRUPPE.....	82
4.2	KONFORMATIONSÄNDERUNG NACH Ca^{2+}-DISSOZIATION	83
4.3	MECHANISMUS DER MEMBRANBINDUNG	87
4.4	REGULATION DER ROS-GC1 DURCH GCAP-2	89

4.5	AUSBLICK.....	92
5.	<u>REFERENZEN.....</u>	93
6.	<u>ANHANG.....</u>	105
	<u>DANKSAGUNG.....</u>	IX
	<u>ERKLÄRUNG.....</u>	X
	<u>LEBENS LAUF.....</u>	XI

Abkürzungsverzeichnis

^2H	...Deuterium
Ca^{2+}	...Calciumion
CaM	...Calmodulin
CCD	...katalytische Domäne der GC
CD	...Circulardichroismus
EC_{50}	...Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung
ER	...endoplasmatisches Retikulum
GC	...Guanylatzyklase
IC_{50}	...Konzentration bei halbmaximaler Inhibierung
KHD	...Kinasehomologiedomäne der GC
Mg^{2+}	...Magnesiumion
myr- d_{27} -GCAP-2	...mit deuterierter Myristinsäure modifiziertes Guanylatzyklase-aktivierendes Protein 2
myr-GCAP-2	...myristoyliertes Guanylatzyklase-aktivierendes Protein 2
myr-NT	...myristoylierter N-Terminus von GCAP-2 bestehend aus den ersten 19 Aminosäuren von GCAP-2
NCS	...neuronale Calciumsensoren
NCS-1	...Neuronaler Calciumsensor 1
NMT1	...N-myristoyl-transferase
non-myr-GCAP-2	...nicht-myristoyliertes Guanylatzyklase-aktivierendes Protein 2
PDB	...Proteindatenbank
PDE6	...Phosphodiesterase 6
ROS-GC	...Sehstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase
ROS-GC1	...Sehstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase 1
thio-GCAP-2	...mit ω -Mercaptododecansäure modifiziertes Guanylatzyklase-aktivierendes Protein 2
ΔASA	...Änderung der hydrophoben exponierten Oberfläche zwischen dem entfalteten und nativen Zustand

1. Einleitung

Calciumionen (Ca^{2+}) dienen als universelle, intrazelluläre Botenstoffe, die zahlreiche zelluläre Prozesse regulieren. Dazu zählen langfristige Prozesse, wie z. B. die Kontrolle von Transkription, Zellteilung und Apoptose, als auch kurzfristige Ereignisse wie z. B. der Umbau des Cytoskeletts oder die Sekretion von Botenstoffen u. ä. [1-3].

Dabei kontrollieren Eukaryonten den Zu- und Abfluss von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), sowie den Austausch mit extrazellulären Quellen [4]. Bei der Kontrolle des Ca^{2+} -Haushalts spielen Kanäle, Pumpen und Transporter eine Rolle. Die freie Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle liegt bei etwa 200 nM, in vielen Zelltypen sogar darunter [5]. Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bzw. die Konzentration in Zellkompartimenten, wie dem ER oder den Mitochondrien, liegt 1.000-10.000-mal höher. Für die Funktionalität der Zelle ist es essentiell, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration niedrig zu halten. Eine langfristiger Anstieg der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration würde zu Apoptose- bzw. Nekroseprozessen führen [6;7].

Gleichzeitig birgt der steile Ca^{2+} -Gradient vom Cytosol zum extrazellulären Raum bzw. zu den Zellkompartimenten ein großes Potential, um durch eine kurzzeitige Änderung der Ca^{2+} -Konzentration ein Signal auszulösen.

Proteine, die den Ca^{2+} -Zu- und Abfluss vermitteln, werden von Ca^{2+} -Sensoren durch komplexe Rückkopplungsmechanismen reguliert. Diese Sensoren können eine temporäre oder räumliche Änderung der Ca^{2+} -Konzentration messen und ein Signal auf diverse Zielproteine weiterleiten. Als Zielproteine dienen, neben den Proteinen die den Ca^{2+} -Haushalt direkt regulieren, auch nachgeschaltete Faktoren wie Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren oder Proteine des Cytoskeletts. Ob und welche Signalkaskade ausgelöst wird, hängt von der jeweiligen Affinität des Ca^{2+} -Sensors, seiner Lokalisation und der Wechselwirkung mit anderen Proteinen ab [8].

Andere Ca^{2+} -Bindeproteine puffern die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration [3].

1.1 EF-Hand Proteine

Ein Ca^{2+} -Bindemotiv haben viele Ca^{2+} -Bindeprotein gemein. Es ist gut charakterisiert und wird als EF-Hand bezeichnet [9]. Das EF-Hand-Motiv besteht aus einer Helix-loop-Helix Supersekundärstruktur und tritt häufig gepaart auf (Abbildung 1.1 A). Beide EF-Hände werden durch Wasserstoffbrücken stabilisiert und bilden einen gemeinsamen hydrophoben Kern aus [10]. Darüber hinaus erlauben diese Wechselwirkungen eine Kooperativität bei der Ca^{2+} -Bindung. Einzelne EF-Hände, ob Ca^{2+} -gebunden oder Ca^{2+} -frei, sind weniger stabil [11].

Die *loop*-region ist dabei 12 bis 14 Aminosäuren lang. Ca^{2+} wird durch Carbonylsauerstoffe der Seitenkette von *loop*-Aminosäure 1, 3 und 5 über den Carbonylsauerstoff des Peptidrückgrats der Aminosäure in Position 7 und von zwei Sauerstoffatomen der Aminosäure 12 im *loop*, meist Glutamat, seltener Aspartat, koordiniert. Über Aminosäure 9 ist meist noch ein Wassermolekül gebunden, welches als Brücke dient und damit die siebte Koordinationsstelle des Ca^{2+} bildet [12;13]. Eine solche Koordination wird in Abbildung 1.1 B gezeigt.

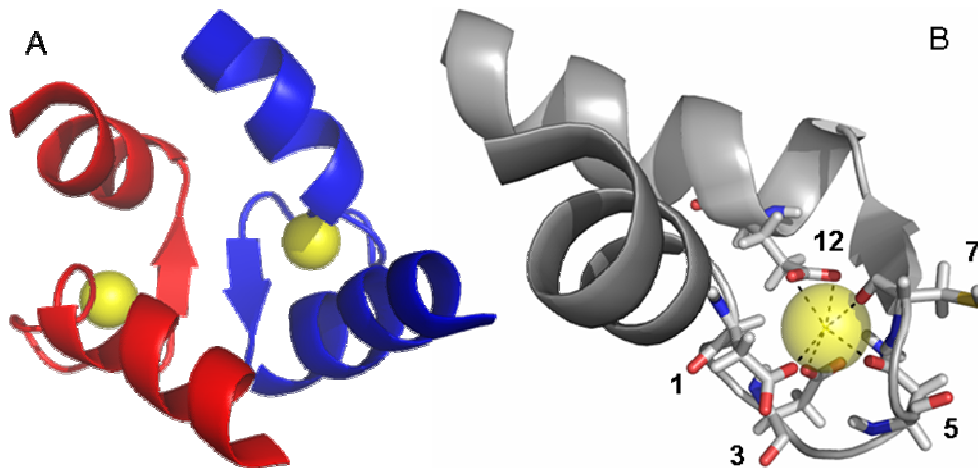


Abbildung 1.1: Ca^{2+} -Koordination im Ca^{2+} -Bindepotein GCAP-2 (PDB: 1JBA) [14]. (A) zeigt die Supersekundärstruktur eines EF-Hand-Paares. Dargestellt ist die 3. (blau) und 4. (rot) EF-Hand von GCAP-2. Ca^{2+} (gelb) wird in der *loop*-Region gebunden. Die *loop*-Region wird von Helices flankiert. Zwischen den beiden EF-Händen wird ein antiparalleles β -Faltblatt ausgebildet. (B) In EF-Hand 3 wird Ca^{2+} (gelb-transparent) dabei von Sauerstoffatomen (rot) der 1., 3., 5., 7. und 12. Aminosäure des *loops* koordiniert (gestrichelt).

Die Ca^{2+} -Affinität von EF-Hand-Proteinen liegt meist im hohen nanomolaren Bereich. Die Bindung von Ca^{2+} erfolgt häufig kooperativ und wird z. B. auch durch die freie Konzentration an Magnesiumionen (Mg^{2+}) beeinflusst. Mg^{2+} kann selbst auch in EF-Händen binden. Durch den kleineren Ionenradius ist die 12. Aminosäure des *loops* meist zu weit weg, um Mg^{2+} zu koordinieren. Häufig findet man stattdessen Wasser. Dies führt zu einer geringeren Affinität für Mg^{2+} . Dennoch werden die EF-Hände unter physiologischen Bedingungen durch das abundante Mg^{2+} okkupiert, wenn die Ca^{2+} -Konzentration gering ist (zusammengefasst in [15]).

Calmodulin (CaM), der Prototyp einer ubiquitären Familie von Ca^{2+} -Sensoren, besitzt zwei EF-Hand-Paare. Diese sind durch eine zentrale Helix voneinander getrennt [16]. CaM interagiert mit zahlreichen verschiedenen Zielproteinen und ist an der Regulation diverser zellulärer Prozesse beteiligt. Häufig interagiert CaM über seine zentralen Helix mit seinen

Zielproteinen und kann eine durch Ca^{2+} -Bindung hervorgerufene Konformationsänderung übertragen [17]. Dabei wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die abhängig vom regulierten Zielprotein variieren [18].

1.1.1 Neuronale Ca^{2+} -Sensoren

Eine Unterfamilie der CaM-Superfamilie ist die Familie der Neuronalen Ca^{2+} -Sensoren (NCS). In Säugern wurden 14 verschiedene NCS gefunden. Diese werden in den Zellen des Nervensystems exprimiert – zum Teil nur in bestimmten Zelltypen [19].

Die Rolle, die verschiedene NCS in den jeweiligen Zelltypen einnehmen ist so divers, wie die der durch sie regulierten Zielproteine (zusammengefasst in [20;21]).

Wie CaM besitzen alle NCS zwei EF-Hand-Paare. Allerdings ist bei allen NCS die EF-Hand 1 nicht funktional. Die meisten NCS sind daher bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen mit drei Ca^{2+} beladen. Dennoch wurden auch NCS gefunden die nur zwei Ca^{2+} binden können. Beispiele dafür sind Recoverin [22] und KChIP1[23;24].

Alle NCS, außer KChIP2 bis 4, tragen an ihrem N-Terminus eine Lipidmodifikation, wobei es sich am häufigsten um eine Myristoylgruppe handelt. In einem kotranslationalen Prozess wird Myristinsäure oder eine verwandte Fettsäure kovalent mit einem N-terminalen Glycinrest verestert [25-27]. Für diese Modifikation ist die Myristoyl-CoA:Protein N-Myristoyltransferase verantwortlich [28-30]. Besonders in der Retina werden auch ungesättigte Fettsäuren transferiert [31].

1.1.1.1 Ca^{2+} -Myristoyl-switch

In einigen Fällen ist die N-terminale Acylierung essentiell für die Funktionalität des jeweiligen NCS. In diesen Fällen dient sie der Verankerung der NCS in der Membran. Diese Membranlokalisation ist permanent im Falle von NCS-1 [32;33] und KChIP1 [34;35] bzw. transient für die Proteine Recoverin [36], Neurocalcin δ [37], VILIP-1 [38] und Hippocalcin [39].

Die transiente Ca^{2+} -abhängige Membranlokalisation, die durch einen als Ca^{2+} -Myristoyl-switch bezeichneten Mechanismus ausgelöst wird, ist am besten für Recoverin, einen Ca^{2+} -abhängigen Inhibitor der Rhodopsinkinase, der an der Lichtadaptation während des Sehprozesses beteiligt ist, untersucht (Abbildung 1.2). Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen ist die Myristoylgruppe im Inneren des globulären Proteins verborgen [22;40]. Dann ist Recoverin im Cytosol lokalisiert. Nach Ca^{2+} -Bindung liegt die Acylkette exponiert vor

[22;41;42]. Dies führt zu einer Bindung von Recoverin an die Membran. Dort findet es sein Zielprotein, die Rhodopsinkinase und inhibiert diese.

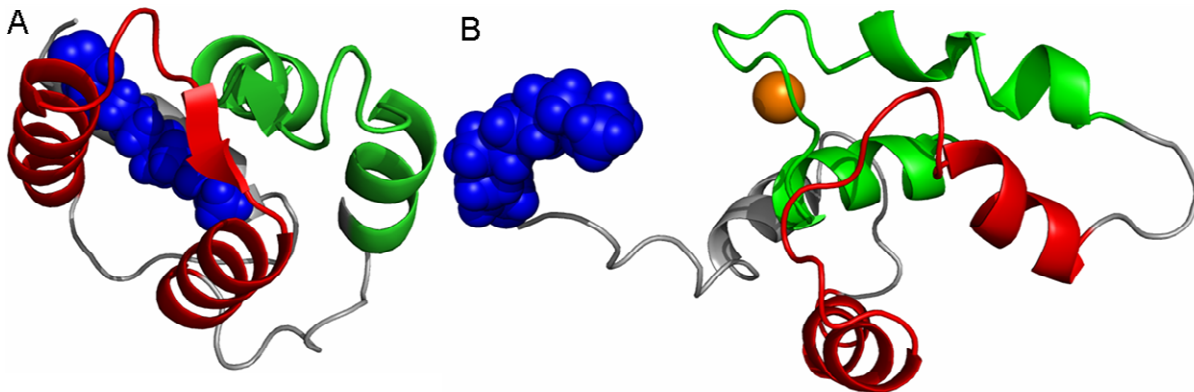


Abbildung 1.2: N-terminales EF-Hand-Paar von Recoverin. (A) Im Ca²⁺-freien Zustand ist die N-terminale Myristoylgruppe (blau) zwischen den beiden EF-Händen (rot und grün) verborgen. (B) Bindung von Ca²⁺ (orange) induziert einen Ca²⁺-Myristoyl-switch. Durch Rotation um Glycin 42 in EF-Hand 1 (rot) wird die Myristoylkette exponiert [22].

1.1.1.2 Membranbindung

Eine Myristoylgruppe allein gilt als nicht ausreichend, um ein Protein permanent in der Membran zu verankern [43]. Häufig weisen myristoylierte Proteine noch ein zweites Membranbindungsmotiv auf. So sind auch bei Recoverin zahlreiche positiv geladene Reste an der Membranbindung beteiligt. Diese bilden Salzbrücken zu den negativ geladenen Kopfgruppen einzelner Membranlipide aus [44]. Detaillierte Untersuchungen zu einem solchen hybriden Mechanismus sind von MARCKS, dem Myristoylierten, Alanin-Reichen Protein-Kinase-C-Substrat, bekannt. Sowohl die Myristoylgruppe als auch Bereiche mit mehreren benachbarten, positiv geladenen Seitenketten, auch basisches Cluster genannt, tragen hier zur Interaktion mit Membranen bei [45;46].

Es sind auch Proteine bekannt, die nur über ein basisches Cluster an negativ geladene Kopfgruppen von Membranen binden. So ist beispielsweise für Annexin V beschrieben, dass eine solche Bindung in Abhängigkeit von Ca²⁺ geschieht [47].

Die Kombination von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen mit Membranen erlauben, die Membranbindung zu regulieren. Palmitoylierungen dagegen führen zu einer permanenten Verankerung des derartig modifizierten Proteins in der Membran (zusammengefasst in [48]).

Weitere Lipidmodifikationen von Proteinen sind neben den beschriebenen Acylierungen auch Isoprenylierungen. Auch sie dienen hauptsächlich der Membranbindung. Eine Farnesylierung allein ist nicht ausreichend, um ein Protein permanent an eine Membran zu binden. Eine

permanente Membranlokalisation wird erst durch die Kombination mit einem weiteren membranbindenden Motiv erreicht. Geranyl-Geranylierungen dagegen sind, auch als alleinige Membrananker, für eine nahezu vollständige Membranbindung ausreichend (zusammengefasst in [49]).

Bei den hier beschriebenen Palmitoylierungen und Isoprenylierungen werden spezifische Cysteinreste mit dem jeweiligen Lipid modifiziert. Um extrazelluläre Proteine in der Membran zu verankern, wird ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI) –Anker an den C-Terminus angehängen (zusammengefasst in [50]).

Welcher Mechanismus bei der Regulation eines Zielproteins durch ein NCS auch immer eine Rolle spielt, die meisten bekannten Zielproteine der NCS sind Membranproteine. Damit müssen die jeweiligen NCS, zumindest temporär, an der Membran lokalisiert sein.

1.2 Phototransduktion

Eine der am besten verstandenen Signaltransduktionskaskaden, an der, neben der bereits vorgestellten Regulation der Rhodopsinkinase durch Recoverin, auch noch andere NCS beteiligt sind, ist die Licht-Signaltransduktion oder Phototransduktion. Die Synthese von zyklischem Guanosin-3':5'-monophosphat (cGMP), dem Botenstoff der Phototransduktion, wird über die Ca^{2+} -Konzentration in einem Rückkopplungssignal reguliert. Die Verschaltung und wechselseitige Kontrolle dieser beiden Botenstoffe ermöglicht zusammen mit anderen Prozessen, die Lichtwahrnehmung und die Adaptation an Lichtintensitäten über zehn Größenordnungen.

Im Grundzustand ist eine hohe Konzentration von cGMP in den Photorezeptorzellen präsent. Dieses Molekül bindet an cGMP-gesteuerte Kanäle (CNG) der Plasmamembran. Solange cGMP gebunden ist, bleiben die Kanäle geöffnet. Darüber einströmende Ca^{2+} und Natriumionen (Na^+) werden über ATP-verbrauchende Prozesse wieder nach außen transportiert. Die Ca^{2+} -Konzentration in Photorezeptorzellen liegt bei ca. 500 nM und ist damit höher als in anderen Zellen [51-53]. Ein Ausschnitt eines Sehstäbchenaußensegments im Dunkelzustand ist schematisch in Abbildung 1.3 A dargestellt.

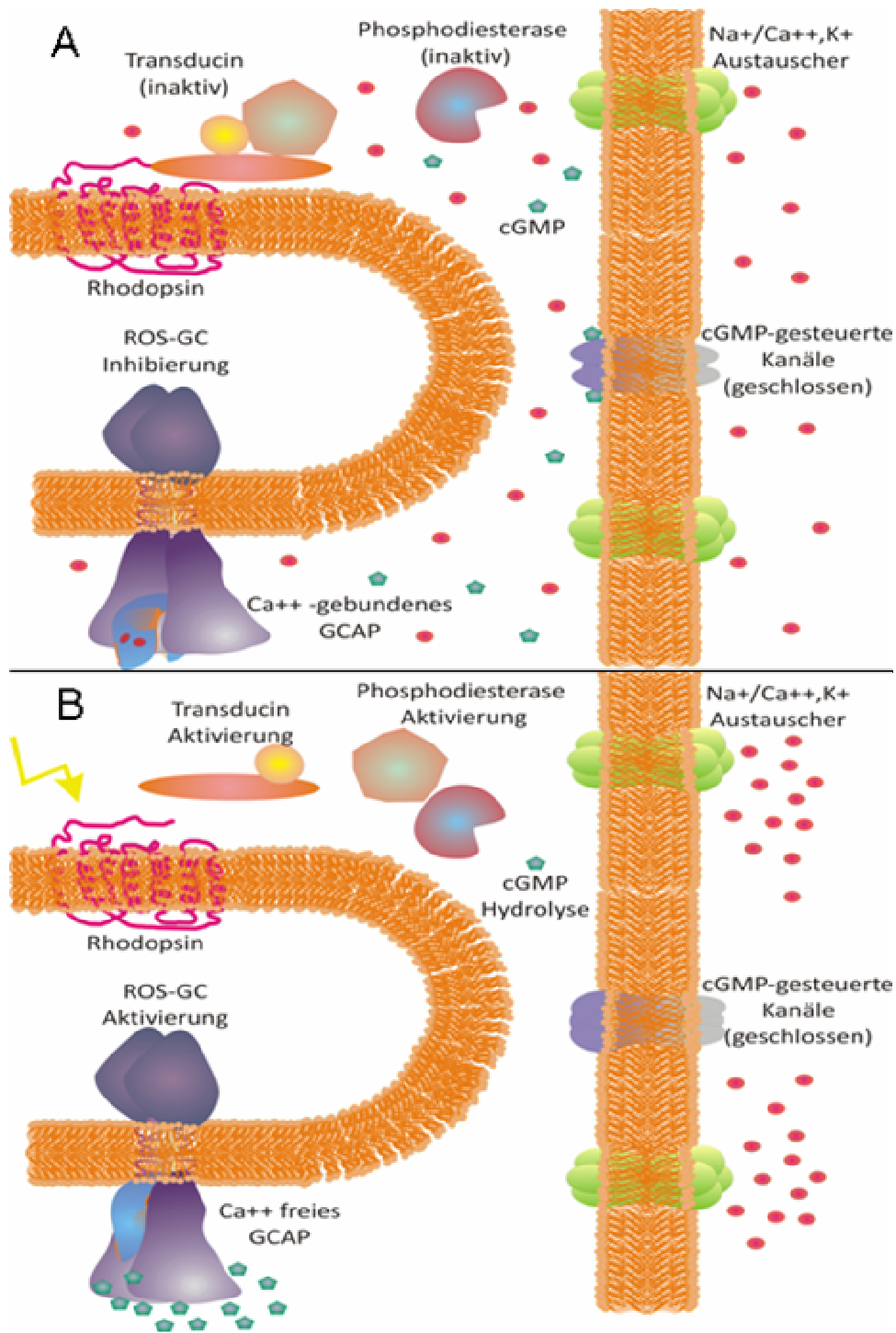


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Ausschnitts eines Sehstäbchenaußensegments im (A) Dunkelzustand und (B) nach initiiertem Phototransduktion. (A) Ca^{2+} und Na^+ strömen durch cGMP-gesteuerte Kanäle ein, solange cGMP gebunden ist. (B) Absorption eines Lichtquants (Blitz) initiiert eine Kaskade, die zur cGMP-Hydrolyse führt. Die cGMP-gesteuerten Kanäle schließen daraufhin. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}, \text{K}^+$ -Austauscher schleusen Na^+ und Ca^{2+} nach Außen. Die Ca^{2+} Konzentration sinkt und die Zelle hyperpolarisiert. Die Ca^{2+} freien GCAP aktivieren die Sehstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase (ROS-GC), woraufhin cGMP neu gebildet wird.

Wird ein Lichtquant von Rhodopsin absorbiert, isomerisiert die prosthetische Gruppe 11-*cis*-Retinal zum *all-trans*-Retinal. Eine daraus resultierende Konformationsänderung beim G-Protein-gekoppelten-Rezeptor Rhodopsin bewirkt einen GDP/GTP-Austausch im Trimeren G-Protein Transducin. Die α -Untereinheit von Transducin wird freigesetzt und bindet an die inhibitorische Untereinheit der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase (PDE6). Die dadurch aktivierte PDE6 hydrolysiert cGMP. Die Verringerung des cGMP-Spiegels der Zelle bewirkt ein Schließen der cGMP-gesteuerten Kanäle. Ca^{2+} und Na^{+} strömen nicht länger in die Zelle ein, werden aber durch die weiterhin aktiven Pumpen aus der Zelle geschleust (Abbildung 1.3 B). Dies führt zu einem Absinken der Spannung an der Plasmamembran auf -70 mV. Diese Hyperpolarisation führt zu einer verringerten Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat an der Synapse der Photorezeptorzelle. Die Veränderung der Neurotransmitterkonzentration im postsynaptischen Spalt wird von den nachgeschalteten Nervenzellen wahrgenommen und löst dort ein Aktionspotential aus. Dieses Signal wird zum zentralen Nervensystem weitergeleitet und verarbeitet [54].

Alle Schlüsselenzyme dieser Kaskade sind in Form von membrangebundenen Proteinkomplexen organisiert (zusammengefasst in [55]). Die kurzen Diffusionswege ermöglichen eine schnelle Signalübertragung zu den jeweiligen nachgeschalteten Faktoren. Außerdem besitzen die beteiligten Enzyme bei der Weiterleitung des Signals eine hohe katalytische Effizienz. So liegt z. B. die katalytische Effizienz der PDE6 nahe des diffusionskontrollierten Limits [56-58]. Beide Faktoren ermöglichen eine schnelle Reaktion auf einen Lichtreiz. So gelingt es der Photorezeptorzelle, innerhalb von weniger als 0,1 ms ein Lichtsignal in ein elektrisches Signal umzuwandeln.

Der mit der Hyperpolarisation einhergehende Abfall der Ca^{2+} -Konzentration dient zusammen mit anderen Prozessen als Rückkopplungsmechanismus, um den Dunkelzustand wieder herzustellen und die Zelle an verschiedene Lichtintensitäten zu adaptieren. So bewirkt die niedrige Ca^{2+} -Konzentration von 30-50 nM [52;53] unter anderem die Aktivierung der Sehstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase (ROS-GC), wodurch der Dunkelzustand wieder hergestellt wird (zusammengefasst in [54]).

1.3 Membranständige Guanylatzyklasen

Die ROS-GC gehört zur Familie der membranständigen Guanylatzyklasen (GC). Sieben dieser GCs sind bisher im Säuger genom identifiziert worden und wurden in der Reihenfolge

ihrer Entdeckung mit GC-A bis GC-G benannt. Ihre Domänenarchitektur wird schematisch in Abbildung 1.4 gezeigt.

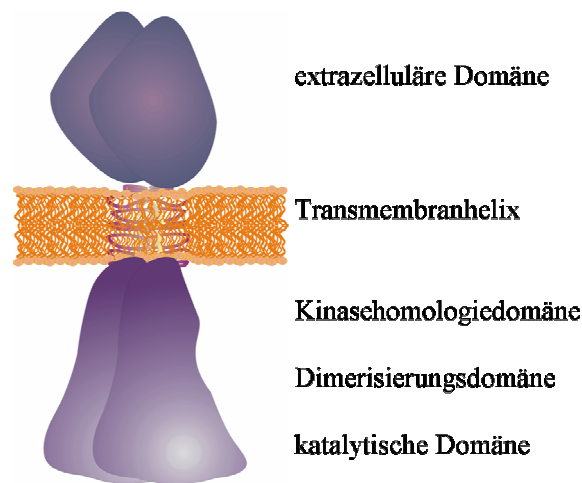


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Domänenarchitektur membranständiger Guanylatzyklen. Die Domänen sind hier vom N- zum C-Terminus angeordnet.

Alle membranständigen GCs sind Typ-I-Transmembranproteine. Die einzelne Transmembranhelix trennt die N-terminale extrazelluläre Domäne vom intrazellulären Bereich. Der intrazelluläre Bereich beginnt mit einer Region, die eine starke Sequenzhomologie zu Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aufweist und wird deshalb als Kinasehomologiedomäne (KHD) bezeichnet. ATP kann zwar gebunden werden, aufgrund von ausgetauschten essentiellen Resten im aktiven Zentrum wird aber eine Kinaseaktivität ausgeschlossen [59;60].

Eine als *coiled-coil* vorhergesagte Dimerisierungsdomäne scheint für die Dimerisierung der GC verantwortlich zu sein [59].

In der katalytischen Domäne (CCD) befindet sich das katalytische Zentrum, in dem cGMP aus GTP gebildet wird. Es wird von jeweils zwei gleichen Untereinheiten geformt [59;61].

1.3.1 Durch extrazelluläre Peptid-Liganden regulierte GCs

Die Aktivität der GC-A, B und C wird durch Peptide reguliert, die an den extrazellulären Bereich binden. Die Bindung bewirkt vermutlich eine Reorientierung der beiden Untereinheiten gegeneinander, die über den Transmembranbereich auf den cytosolischen Teil der GC übertragen wird. Dies resultiert in einer funktionalen Ausrichtung der aktiven Zentren und ermöglicht die cGMP-Synthese [62].

Liganden, die an den extrazellulären Teil der GC-D [63] und G [64] sowie der beiden ROS-GC [65] binden, sind nicht bekannt, werden aber diskutiert.

1.3.2 Durch Ca^{2+} -Bindeproteine regulierte GC

Die Aktivität der GC-D und der beiden ROS-GC wird durch intrazelluläre Ca^{2+} -Bindeproteine reguliert.

Die GC-D wurde im Riechepithel von Nagern identifiziert. Dort wird sie durch den NCS Neurocalcin δ reguliert. Neurocalcin δ aktiviert die GC-D im Ca^{2+} -gebundenen Zustand. Keine Aktivität konnte dagegen in Abwesenheit von Ca^{2+} gemessen werden [66]. Auch wurde in diesem Zelltyp eine Regulation durch das Guanylatzyklase-aktivierende Protein 1 (GCAP-1) vermutet, das die GC-D ebenfalls in Anwesenheit von Ca^{2+} aktiviert [67]. Im Laufe der Evolution ist die GC-D bei Primaten degeneriert und wurde zum Pseudogen [68].

Die GC-D wird auch im Hippocampus exprimiert. Eine stärkere Aktivierung durch Ca^{2+} -gebundenes NCS-1 [69] und Hippocalcin [70] als durch die Ca^{2+} -freien NCS konnte hier gezeigt werden. Die physiologische Relevanz dieser Regulationen ist bisher unklar.

1.3.2.1 ROS-GC1 und 2 als Ca^{2+} -abhängig Schlüsselenzyme der Phototransduktion

Am besten ist die Regulation der Sechstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase 1 (ROS-GC1), oder GC-E, untersucht. Sie wurde aus dem Außensegment von Stäbchen und Zapfen isoliert [71], kloniert [72] bzw. mittels Antikörpern identifiziert [73;74].

Dort wird sie durch GCAP-1 [75-77] und dessen Isoform GCAP-2 [78] bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert. Für GCAP-2 konnte gezeigt werden, dass es die ROS-GC1 bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen inhibiert [79]. Für GCAP-1 ist dies nicht endgültig geklärt.

Die Sechstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase 2 (ROS-GC2), oder GC-F, wurde in Sechstäbchen und Zapfen nachgewiesen [80]. Sie wird vermutlich durch GCAP-1 und 2 reguliert [81], obwohl in anderen Arbeiten nur die Regulation durch GCAP-2 allein gezeigt werden konnte [82;83].

Sinkt die Ca^{2+} -Konzentration mit der Hyperpolarisation der Photorezeptorzelle, aktivieren die GCAP die ROS-GC1 und 2 und bewirken die erhöhte Produktion von cGMP. Durch Bindung von cGMP an die cGMP-gesteuerten Kanäle werden diese geöffnet und der Dunkelzustand wird wieder hergestellt. Die GCAP binden das einströmende Ca^{2+} und werden vom Aktivator der ROS-GC1 und ROS-GC2 zu deren Inhibitor.

Die Regulation der ROS-GC1 und ROS-GC2 durch GCAP-1 und GCAP-2 ist der physiologisch relevante Prozess der Ca^{2+} -abhängigen Kontrolle der cGMP-Konzentration und damit ein Schlüsselprozess der Phototransduktion.

Darüber hinaus wurden noch weitere Wechselwirkungen der ROS-GC1 mit Ca^{2+} -Bindeproteinen in Photorezeptorzellen beschrieben. So konnte in Menschen und Zebrafischen eine dritte Isoform der GCAP, GCAP-3, nachgewiesen werden, das die ROS-GC1 bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert [82], jedoch lediglich in Zapfen gefunden wurde [74]. In Fischen konnten weitere GCAP Isoformen nachgewiesen werden [84]. Weiterhin wurden weitere GCAP-homologe Proteine im Leopardenfrosch nachgewiesen, die die ROS-GCs zwar bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen inhibieren, aber nicht aktivieren können [85].

Die ROS-GC1 kann auch durch S100-Proteine reguliert werden [86]. S100-Proteine gehören, im Gegensatz zu den bisher erwähnten Regulatorproteinen der GC, nicht zur Familie der NCS. Die ubiquitären S100 Proteine besitzen nur ein EF-Hand-Paar. Diese Proteine liegen vermutlich ausschließlich als Dimere vor (zusammengefasst in [87]). S100B und S100A1 werden in Photorezeptorzellen exprimiert [88] und können die ROS-GC1 in Anwesenheit von Ca^{2+} aktivieren [89].

1.3.2.2 Regulation der ROS-GC1 außerhalb des Sechstäbchenaußensegments

Die ROS-GC1 wurde, neben der Lokalisation im Sechstäbchenaußensegment, auch an den bipolaren Synapsen der Photorezeptorzellen gefunden. Dort scheint sie durch GCAP-1 [90], S100B [91] oder Neurocalcin δ [92] reguliert zu werden.

Auch in den Geschmackszellen der Zunge wurde die ROS-GC1 nachgewiesen. Dort wird ein Komplex von ROS-GC1 mit S100B postuliert [93].

Außergewöhnlich scheint die Regulation der in der Zirbeldrüse exprimierten ROS-GC1. Sie wird entweder mit GCAP-1 oder S100B koexprimiert. Im Falle der Koexpression mit GCAP-1 wird die ROS-GC1 bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert. Im Gegensatz dazu wird sie bei Koexpression mit S100B bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert. Koexpression von GCAP-1 und S100B in ein und derselben Zelle konnte nicht gezeigt werden [94].

Die physiologische Relevanz dieser Wechselwirkungen ist nicht ganz klar. Diese Beispiele zeigen, dass die GC-D, ROS-GC1 und 2, je nach Zelltyp, in dem sie exprimiert werden, durch verschiedene Ca^{2+} -Bindeproteine reguliert werden. Durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration können diese eine Steigerung der GC-Aktivität bewirken, wie im Falle von S100, Neurocalcin δ , NCS-1, Hippocalcin oder GCAP-1 (wenn mit es mit der GC-D koexprimiert wird), oder aber die Aktivität herabsetzen, wie bei GCAP-1 und GCAP-2. Dagegen wird die Aktivität der ROS-GC1 und 2 durch die Ca^{2+} -freien GCAP-1-3 gesteigert.

Zum Teil werden zwei reziproke operierende Effektoren im selben Zelltyp exprimiert [94]. Vermutlich erlaubt die Regulation durch die Ca^{2+} -Bindepoteine mit so verschiedenen Eigenschaften eine sehr genaue Kontrolle der Ca^{2+} - und cGMP-Konzentration.

Diese Beispiele zeigen, wie facettenreich verschiedene Ca^{2+} -Bindepoteine die cGMP-Konzentration regulieren und wie durch das Zusammenspiel dieser beiden Botenstoffe hoch spezifische Signale kreiert werden, von denen nur die wenigsten im Detail verstanden sind.

1.3.2.3 Bindestellen verschiedener Ca^{2+} -Bindepoteine an die ROS-GC1

Einige Bereiche der ROS-GC1 konnten den verschiedenen Ca^{2+} -Bindepoteinen als Bindemotive zugeordnet werden. Die Positionen der identifizierten Bereiche werden in Abbildung 1.5 dargestellt.

So bindet GCAP-1 vermutlich an ein Motiv in der KHD. Zwei Sequenzbereiche (1#, 2#) wurden hierzu vorgeschlagen [95]. Sie befinden sich in dem Bereich, der als KHD vorgestellt wurde. Diese, der Transmembrandomäne benachbarte, Region weist allerdings keine Homologie zu Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auf. Zwei weitere Bereiche (3#, 4#) wurden über Quervernetzung von GCAP-1 mit der ROS-GC1 ermittelt [96].

Interessanterweise wird für die GCAP-1-Regulation der GC-D eine Ca^{2+} -unabhängige Bindung in der CCD vorhergesagt (D#) [67].

Von GCAP-2 wird vermutet, dass es in der CCD bindet. So konnten zwei Sequenzbereiche (5#, 6#) dort als mögliche Bindemotive identifiziert werden.

Der Kernbereich der CCD (N#) wurde für die Bindung von Neurocalcin vorgeschlagen [92], wogegen für S100B unter anderem gezeigt werden konnte, dass es die ROS-GC1 nicht mehr aktivierte, wenn die letzten 90 Aminosäuren deletiert wurden (S#) [91].

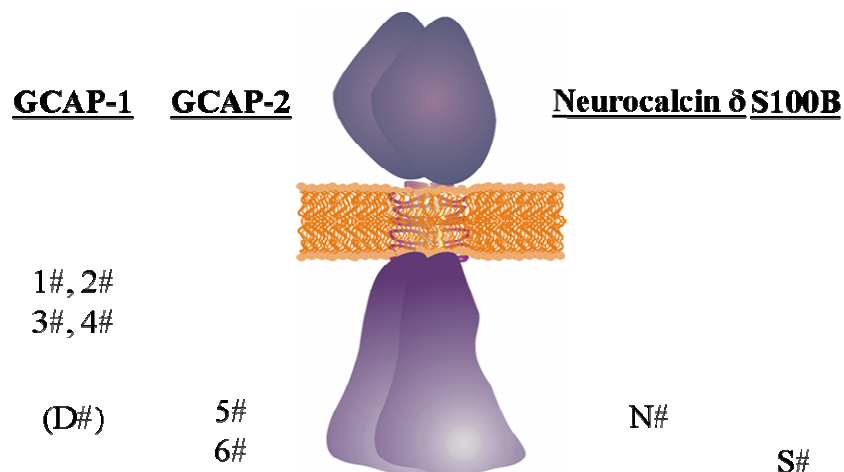


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der putativen Bindestellen der jeweiligen Ca^{2+} -Bindepoteine an die ROS-GC1.

Alle diese Erkenntnisse basieren auf Funktionsuntersuchungen von ROS-GC1-Mutanten, sowie auf Kompetitionsstudien mit Peptiden bzw. direkten Wechselwirkungen mit Peptiden. Direkte Wechselwirkungsstudien der gereinigten ROS-GC1 mit den verschiedenen Ca^{2+} -Bindeproteinen oder gar Kristallstrukturen der Komplexe stehen nicht zur Verfügung.

1.3.2.4 Regulation der ROS-GC1 durch GCAP

Die am besten charakterisierte Regulation der ROS-GC1 ist die durch GCAP-1 und 2. Die beiden Proteine weisen eine Sequenzhomologie von 56 % und eine Sequenzidentität von 40 % auf. Bei neutralem pH sind GCAP-1 und 2 negativ geladen.

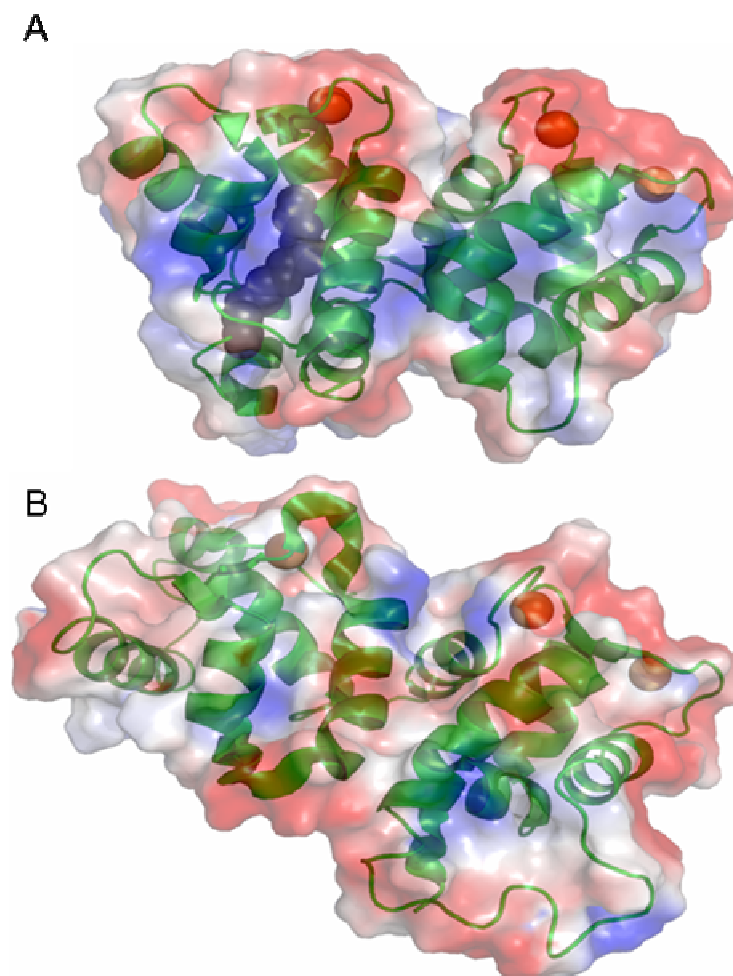


Abbildung 1.6: Strukturen von GCAP-1 & 2 in Anwesenheit von Ca^{2+} (orange Kugeln). Die Sekundärstruktur (grün) ist bei beiden Proteinen α -Helix-dominiert. Die theoretische Ladungsverteilung auf der Oberfläche ist dargestellt. Beide Proteine sind stark negativ geladen (rot). Dennoch akkumulieren einige positiv (blau) geladene Reste. Ungeladene oder hydrophobe Bereiche sind grau dargestellt. (A) Die Kristallstruktur (2R2I) von myr-GCAP-1 zeigt die Myristoylgruppe (schwarz) im Inneren des Proteins verborgen [97]. (B) Die NMR-Struktur von non-myr-GCAP-2 (1JBA) ist in der gleichen Orientierung dargestellt [14].

Von nicht-myristoyliertem GCAP-2 (non-myristoyl-GCAP-2) [14] und vom myristoylierten GCAP-1 (myristoyl-GCAP-1) [97] wurde im Ca^{2+} -gebundenen Zustand eine NMR- bzw. Kristallstruktur gelöst. Diese sind in Abbildung 1.6 gezeigt. Beide Strukturen zeigen die Bindung von Ca^{2+} in den EF-Händen 2 bis 4. Zahlreiche unpolare Reste befinden sich auf der Oberfläche, wie für GCAP-2 gezeigt. Die Myristoylgruppe ist im Ca^{2+} -gebundenen Zustand im Inneren von GCAP-1 verborgen. Die Sekundärstruktur von GCAP-1 und 2 wird von α -Helix-Anteilen dominiert. Eine Struktur des Ca^{2+} -freien Zustands ist nicht bekannt.

Nach Ca^{2+} -Dissoziation ist das CD-Spektrum von GCAP-2 weiterhin α -Helix-dominiert. Eine durch Ca^{2+} hervorgerufene Konformationsänderung wurde auch für GCAP-2 gezeigt. In Abhängigkeit von der freien Ca^{2+} -Konzentration wird es von der Protease V8 in unterschiedlich große Fragmente geschnitten [98]. Anhand der Ca^{2+} -abhängigen Änderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz wurde ebenfalls auf eine Konformationsänderung geschlossen [77;99].

Die EC_{50} -Werte der Ca^{2+} -Konzentration der ROS-GC1 Aktivierung für GCAP-1 und 2 konnten bestimmt werden. Demnach aktiviert GCAP-2 die ROS-GC1 erst, wenn die Ca^{2+} -Konzentration auf weniger als 50 nM sinkt. GCAP-1 dagegen wirkt bereits bei weniger als 600 nM aktivierend [100]. Vermutlich tragen beide GCAP Isoformen zur Regulation der ROS-GC1 bei. Die verschiedenen EC_{50} -Werte erlauben eine Aktivierung durch GCAP-1, wenn die Ca^{2+} -Konzentration in den Photorezeptorzellen nur leicht gefallen ist, wogegen beide GCAP die ROS-GC1 aktivieren, wenn die Ca^{2+} -Konzentration stark gefallen ist [100]. Diese IC_{50} -Werte hängen stark von der freien Mg^{2+} -Konzentration ab. Je höher die Mg^{2+} -Konzentration, desto geringer ist die Affinität für Ca^{2+} . Unter physiologischen Bedingungen wird erwartet, dass die EF-Hände von Mg^{2+} okkupiert sind. Das bedeutet, dass der eigentliche Aktivator der ROS-GC1 und 2 nicht das Apoprotein ist, sondern die Mg^{2+} -gebundenen GCAP [101;102]. Wird die Bindung von Mg^{2+} durch Mutation der EF-Hände unterbunden, wird die ROS-GC1 nicht mehr durch GCAP-1 aktiviert. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass durch Mg^{2+} -Bindung in den EF-Händen 2 und 3 die Affinität zur ROS-GC1 und deren maximale Aktivierbarkeit gesteigert wird. Mg^{2+} -Bindung in EF-Hand 4 bewirkt keine Veränderung der Regulierbarkeit. Dagegen führt eine Mutation in EF-Hand 4, die keine Ca^{2+} -Bindung mehr erlaubt, zu einer permanenten Aktivierung der ROS-GC [103]. Weiter konnte gezeigt werden, dass sich Trp 94 durch Verdrängung von Mg^{2+} durch Ca^{2+} in EF-Hand 4 von

einer unpolaren Umgebung in eine polare Umgebung verlagert. Durch Austausch von Ca^{2+} zu Mg^{2+} wird auch Trp 21 lösungsmittlexponiert [104].

Der N-Terminus von GCAP und die EF-Hand 1 gelten als Bereiche, die die Regulation mit der ROS-GC1 vermitteln. Zum einen lässt sich die Aktivierung der ROS-GC1 durch GCAP-1 durch Zugabe des N-terminalen Peptids kompetieren [77], zum anderen führen Mutationen bei GCAP-2, die zwischen EF-Hand 1 und 2 eingeführt werden, zu einer geringeren Aktivierung der ROS-GC1 [105].

Auch andere Bereiche sind möglicherweise an der Regulation der ROS-GC1 beteiligt. So konnte durch chemische Modifikation von GCAP-1 ein Cysteinrest identifiziert werden, der nach Ca^{2+} -Dissoziation schneller mit DTNB umgesetzt wird. Er befindet sich in EF-Hand 3 [106].

Weiterhin sind zahlreiche Mutationen bekannt, die die dominant vererbte Stäbchen-Zapfen-Dystrophie, eine Krankheit, bei der Photorezeptorzellen absterben und die zur Erblindung führt, bedingen. Zum Beispiel führt eine Mutation der 99. Aminosäure beim GCAP-1 (Y99C) zu dieser Krankheit [107]. Der Austausch liegt unmittelbar in der EF-Hand 3 und bewirkt eine Aktivierung der ROS-GC1 auch noch bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Aktivierung der ROS-GC1 durch GCAP-1 Y99C lässt sich auch nicht durch Konkurrenz mit dem Wildtyp von GCAP-1 unterdrücken [108;109]. In transgenen Mäusen, die GCAP-1 Y99C trugen, konnte ein erhöhter Dunkelstrom in den Photorezeptorzellen und eine damit einhergehende Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden. Diese führte zu einem Absterben der Photorezeptorzellen [110].

Ein ähnlicher Phänotyp wird für GCAP-1 E155G beobachtet. Auch dieses Protein aktiviert die ROS-GC1 noch bei erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen [111].

Über welchen Mechanismus GCAP-1 und 2 ihr Zielprotein aktivieren, ist nicht genau bekannt. Zwei Modelle werden hierzu diskutiert.

Für die Aktivität von Guanylatzyklasen ist, analog zu Adenylatzyklasen, die funktionale Ausrichtung des aktiven Zentrums essentiell. In Abwesenheit von Ca^{2+} liegt GCAP-2 zu einem größeren Anteil als Dimer vor, als in Anwesenheit von Ca^{2+} [112]. Außerdem ist eine GCAP-2-Variante, die die ROS-GC1 konstitutiv aktiviert, ebenfalls hauptsächlich ein Dimer. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass GCAP-2 durch seine Dimerisierung die Dimerisierung der ROS-GC1 vermittelt [113]. Zuvor konnte durch chemische Quervernetzung und anschließende Immunodetektion gezeigt werden, dass in

Abwesenheit von Ca^{2+} ein größerer Anteil der ROS-GC1 und der GCAP-2 als Dimere vorliegt. GCAP-2 schien dabei nicht mit der ROS-GC1 quervernetzt zu werden [114].

Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass GCAP-1 und ROS-GC1 Ca^{2+} -unabhängig aneinander gekoppelt werden können. Bei diesen Experimenten wurde auch eine Bande oberhalb von 220 kDa detektiert, die sowohl von einem Anti-GCAP-1 Antikörper als auch von einem Anti-ROS-GC1 Antikörper erkannt wurde [115].

Auch können Chimären von CaM und GCAP-1, die permanent Dimere ausbilden, die ROS-GC1 nicht aktivieren [116].

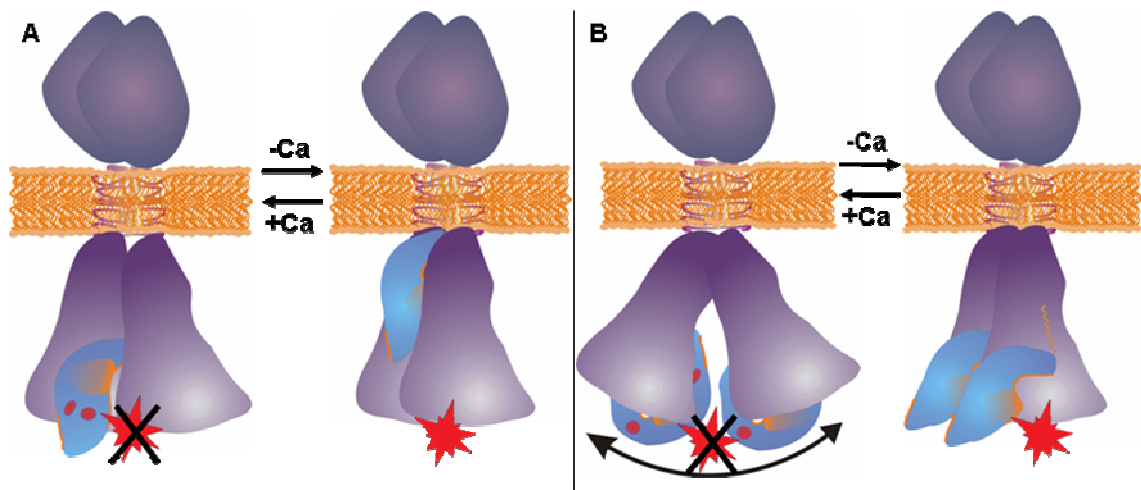


Abbildung 1.7: Postulierte Modelle zur Regulation der ROS-GC1 durch GCAP. (A) GCAP bindet in Anwesenheit von Ca^{2+} an die ROS-GC und verhindert dadurch eine funktionale Ausrichtung des aktiven Zentrums. Wenig cGMP wird gebildet. Im Ca^{2+} -freien Zustand bewirkt eine Konformationsänderung von GCAP eine Umorientierung der beiden ROS-GC Untereinheiten. Die funktionale Ausrichtung des aktiven Zentrums führt zu einer verstärkten cGMP-Produktion. (B) Zwei GCAP, die jeweils an eine Untereinheit der ROS-GC gebunden sind, verhindern eine funktionale Ausrichtung des aktiven Zentrums. Wenig cGMP wird gebildet. Im Ca^{2+} -freien Zustand dimerisieren die GCAP und führen die beiden ROS-GC Untereinheiten zusammen. Die funktionale Ausrichtung des aktiven Zentrums führt zu einer verstärkten cGMP-Produktion.

Anhand von quantitativen Western Blots konnte die Konzentration von ROS-GC1, GCAP-1 und GCAP-2 im Sehstäbchenaußensegment abgeschätzt werden. Sie beträgt $3,3 \mu\text{M}$ für GCAP-1 und $2,7 \mu\text{M}$ für GCAP-2. Die Konzentration des ROS-GC1-Dimers wurde mit $5,8 \mu\text{M}$ angegeben [100]. Obwohl die geringere Konzentration an GCAP gegen einen Dimer-induzierten Aktivierungsmechanismus spricht, kann dieser nicht ausgeschlossen werden.

Alternativ könnte eine Konformationsänderung innerhalb der GCAP genauso zu einer Umorientierung der beiden ROS-GC1-Untereinheiten führen. So kann Ca^{2+} -gebundenes

GCAP so an die ROS-GC binden, dass weniger cGMP gebildet wird. Durch Dissoziation von Ca^{2+} könnte sich die GCAP-Konformation derartig ändern, dass sich die ROS-GC-Untereinheiten neu ausrichten und ein funktionales aktives Zentrum ausbilden.

Da die GCAPs die ROS-GC1 bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen aktivieren und bei hohen Ca^{2+} -Konzentration inhibieren, müssen sie in beiden Zuständen mit der ROS-GC1 interagieren. Ein Mechanismus, wie für Recoverin beschrieben, der Ca^{2+} -abhängig eine Bindung an die Membran vermittelt und so den Effektor an sein Zielprotein koordiniert, ist daher weniger wahrscheinlich.

Da die Myristoylierung für die Funktionalität von GCAP-2 nicht essentiell ist, wurde der N-terminalen Lipidmodifikation lediglich eine untergeordnete Rolle zugeschrieben. So konnte bisher nur ein minimaler Einfluss der Acylierung auf die Membranbindung gemessen werden [117]. Da GCAP-2 in Abwesenheit von Ca^{2+} sogar stärker an Membranen bindet als in Anwesenheit von Ca^{2+} , wurde ein Ca^{2+} -Myristoyl-Switch für GCAP-2 ausgeschlossen. Allerdings ist myristoyliertes GCAP-2 ein deutlich effektiverer Aktivator der ROS-GC, als das unmyristoylierte Protein [117;118]. Die Rolle der Myristoylgruppe bei der Regulation der ROS-GC bleibt aber unverstanden.

Die Isoform GCAP-1 zeigte in ihrer Kristallstruktur die Myristoylkette im Inneren des Proteins verborgen, wenn Ca^{2+} gebunden war. In Wasserstoff-Deuterium- (H/D-) Austauschexperimenten konnte gezeigt werden, dass GCAP-1 durch die Myristoylierung stabilisiert wird. In Abwesenheit von Ca^{2+} scheint die Myristoylgruppe allerdings zu einem schnelleren H/D-Austausch zu führen [119].

Durch Modifikation mit 16-Palmitoyl-7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol anstelle von Myristinsäure konnte gezeigt werden, dass sich die Polarität der Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffs durch An- und Abwesenheit von Ca^{2+} nicht änderte [97]. Obwohl nicht gezeigt wurde, ob das derartig modifizierte Protein funktional ist, wird seitdem für GCAP-1 vermutet, dass die Myristoylgruppe immer und Ca^{2+} -unabhängig im Inneren des Proteins verborgen vorliegt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich die chemische Verschiebung einer mit ^{13}C markierten Myristoylgruppe nicht durch Zugabe von Ca^{2+} oder Mg^{2+} ändert. Denaturierung allerdings bewirkte eine Veränderung der chemischen Verschiebung im ^1H - ^{13}C HMQC für die 12. und 14. Kohlenstoffposition der Fettsäure. Die Autoren schlussfolgern, dass die Myristoylgruppe unabhängig von Ca^{2+} und Mg^{2+} im Inneren des Proteins verborgen liegt und nach Denaturierung lösungsmittel exponiert ist [102].

Dass die Myristoylierung von GCAP-1 nicht der Membranbindung dient, sondern lediglich strukturelle Funktionen erfüllt, ist durchaus denkbar. Eine derartige Funktion der

Myristoylierung ist auch für VP4 des Poliovirus [120] und für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A [121] beschrieben.

Vergleiche der $^1\text{H-NMR}$ Spektren der Myristoylgruppe von GCAP-2 und Recoverin lassen allerdings vermuten, dass die Myristoylgruppe, ähnlich dem Ca^{2+} -gebundenen Recoverin, lösungsmittlexponiert vorliegt, unabhängig von Ca^{2+} . So ähnelt das Spektrum der Myristoylgruppe von GCAP-2, unabhängig von der Anwesenheit von Ca^{2+} , dem der Myristoylgruppe von Recoverin im Ca^{2+} -gebundenen Zustand [98].

Molekulare Details der Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung der GCAP und der dadurch ausgelöste Mechanismus der GC-Regulation sind bisher unbekannt. Welche Rolle dabei die N-terminale Fettsäuremodifikation spielt, ist bisher ebenfalls nicht verstanden.

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die durch Ca^{2+} ausgelöste Konformationsänderung des bovinen GCAP-2 näher untersucht werden. Im Mittelpunkt sollte dabei die Rolle der N-terminalen Lipidmodifikation stehen.

Da GCAP-2 ein Membranprotein reguliert, sollte die Triebkraft der Membranbindung von GCAP-2 in den beiden physiologisch relevanten Zuständen, Ca^{2+} -gebunden und Ca^{2+} -frei, untersucht werden. Der Beitrag, den dabei die Myristoylgruppe leistet, sollte genauso geprüft werden, wie die Lokalisation der Myristoylgruppe von an Membranen gebundenem GCAP-2. Zur Klärung dieser Fragen sollten Inkubationsexperimente mit Liposomen und Festkörper-Deuterium-NMR durchgeführt werden.

Bislang ist für GCAP-2 nicht geklärt, ob der Myristoylgruppe eine strukturelle Bedeutung zukommt oder ob sie lösungsmittel exponiert vorliegt. Um diese Frage zu beantworten, sollte die thermodynamische Stabilität abhängig von den physiologisch relevanten Effektoren Ca^{2+} und Mg^{2+} und der Myristoylgruppe bestimmt werden. Zur Einschätzung der durch die Myristoylierung ausgelösten Veränderung der hydrophoben Oberfläche sollte eine Quantifizierung dieser vorgenommen werden.

Durch Vergleich der Reaktivität einer künstlich eingeführten Thiolgruppe an der Fettsäuremodifikation sollte deren Ca^{2+} -abhängige Lösungsmittelzugänglichkeit charakterisiert werden. Gleichzeitig sollten so Cysteine, die an der Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung beteiligt sind, identifiziert werden.

Aufbauend auf diesen Experimenten sollte die physiologische Relevanz der Konformationsänderung verifiziert werden.

Basierend auf einem detaillierten Verständnis der durch Ca^{2+} verursachten Konformationsänderung, soll, mit Hilfe der bekannten Strukturen des Ca^{2+} -gebundenen Zustands der GCAP, die Beschaffenheit des Ca^{2+} -freien Zustands charakterisiert werden. Die Vorhersage struktureller Änderungen, die durch Dissoziation von Ca^{2+} ausgelöst werden, ermöglichen eventuell den bisher schlecht verstandenen Mechanismus der Regulation der ROS-GC besser zu verstehen.

GCAP und ROS-GC stellen eine Schaltstelle zweier intrazellulärer Botenstoffe dar. Die molekulare Charakterisierung einer durch Ca^{2+} ausgelösten Konformationsänderung und deren Übertragung an einer solchen Schaltstelle, würde zu einem besseren Verständnis von molekularen Mechanismen bei Signaltransduktionen beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Folgende aufgeführte Chemikalien, Enzyme, Standards, Plasmide, Stämme, Kits, Software, sonstige Materialien und Geräte wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendet.

Zur Herstellung von wässrigen Lösungen wurde hochreines Wasser verwendet.

Alle nachfolgend aufgeführten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p.A., sofern nicht anders gekennzeichnet.

2.1.1 Chemikalien

1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl-cholin, DMPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al (USA)
12-Mercapto-1-dodecansäure	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl-cholin, POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al (USA)
1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl-ethanolamin, POPE	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al (USA)
1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidyl-serin, POPS	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al (USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, HEPES	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridiniumbromid, Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat, CHAPS	Roth GmbH, Karlsruhe
30% Acrylamid/0.8% N,N'-Methylenbisacrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe
3-Isobutyl-1-methylxanthin, IBMX	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
3-Morpholinopropansulfonsäure, MOPS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), DTNB	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
8-Anilino-1-Naphthalensulfonsäure, ANS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Acetonitril, AcN	Roth GmbH, Karlsruhe

Agar-Agar	Roth GmbH, Karlsruhe
Amidoschwarz 10B	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Riedel-de-Haen, Seelze
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Biorad Protein Assay (Bradford-Reagenz)	BioRad, München
Bromphenolblau	Roth GmbH, Karlsruhe
Cacodylsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid Dihydrat	Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Cholesterin	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al (USA)
Coomassie Brilliant Blau G250	Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol, DTT	MP Biomedicals, Eschwege
Dulbecco's PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose, DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure (96%)	Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol (96%)	KMF Laborchemie GmbH, Lohmar
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	MP Biomedicals, Eschwege
Ethylen-glycol-bis(2-aminoethyl)tetraacetat, EGTA	Roth GmbH, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Roth GmbH, Karlsruhe
GlutaMAX-I-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidiniumhydrochlorid, GuHCl	Nigu Chemie GmbH, Waldkraiburg MP Biomedicals, Eschwege
Guanosin-3':5'-monophosphat, cGMP	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Guanosintriphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Hefeextrakt	Roth GmbH, Karlsruhe
Iodacetamid, IAA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	KMF Laborchemie GmbH, Lohmar

Isopropyl- β -D-galaktopyranosid, IPTG	AppliChem, Darmstadt
KCl	Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
L-Arginin	Ajinomoto C. Inc., Tokyo; Japan
Lauryldimethylaminoxid, LDAO	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Lipofectamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Manganchlorid Tetrahydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Myristinsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Myristinsäure, deuteriert	Aldrich Chem. Co., Milwaukee US
N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin, TEMED	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Natriumchlorid	Riedel-de-Haen, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylphosphat, SDS	Merck, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Roth GmbH, Karlsruhe
Pepton aus Casein oder Soja	Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphorsäure (85%)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (37%)	KMF Laborchemie GmbH, Lohmar
Silbernitrat	Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure, TCA	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure, TFA	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
<i>Tris</i> (2-Carboxyethylphospin), TCEP	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Tris	MP Biomedicals, Eschwege
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

2.1.2 Proteine und Standards

<i>Proteine und Standards</i>	<i>Bezugsquelle</i>
1-kb-DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M
Benzonase, >250 units/ μ l	Merck, Darmstadt
LMW-Protein-Molekulargewichts-Standard	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym aus Hühnereiweiß	Merck, Darmstadt

2.1.3 Kits

<i>Kits</i>	<i>Bezugsquelle</i>
PeqLab Miniprep Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Qiagen Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4 Plasmide

<i>Plasmide</i>	<i>Bezugsquelle</i>
GCAP-2/pET11a	Hwang <i>et al.</i> [118]
pBB131	Duronio <i>et al.</i> [122]
pcDNA3.1 ROS-GC1	Lange <i>et al.</i> [123]

2.1.5 *E. coli* Stämme & Zelllinien

<i>E. coli</i> Stämme & Zelllinien	<i>Genotyp</i>	<i>Bezugsquelle</i>
BL21 (DE3)	B ⁻ F ⁻ omp ^T gal hsd _S _B (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm (DE3)	Novagen, Bad Soden
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' ⁺ proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, La Jolla, US

HEK 293	Amelogenin: X; CSF1PO: 11,12; D13S317: 12,14; D16S539: 9,13; D5S818: 8,9; D7S820: 11,12; THO1: 7,9.3; TPOX: 11; vWA: 16,19	ATCC, Manassas, VA (USA)
---------	--	--------------------------

2.1.6 Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
Phoretix 1D	Nonlinear Dynamics, Newcastle; England
Aida 1D	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt

2.1.7 Sonstige Materialien

<i>Sonstige Materialien</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Sterilfilter Isopore	Millipore, Schwalbach
Rotilabo Spritzenfilter	Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalspritzen 10 ml und 50 ml BD Plastipak	Becton-Dickinson, Heidelberg
VivaFlow 200	Sartorius, Göttingen
Amicon	Millipore GmbH, Schwalbach
pH-Indikatorstäbchen	Merck, Darmstadt
Dialyseschläuche und Klemmen	Spectrapor, Rancho Dominguez, US
ZipTips C18	Millipore GmbH, Schwalbach
Vivaspin	Sartorius, Göttingen
BioTrace Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	Pall-Gelman, Dreieich
Accu Jet Pipettierhelfer	Brand GmbH, Wertheim
Zellschaber	Laborbedarf Ilona Schubert, Leipzig
serologische Pipetten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten (6-Well)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.8 Geräte und Zubehör

<i>Geräte und Zubehör</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Absorptionsspektroskopie</i>	
Ultraspec 4000 UV/VIS Spektrometer	GE Healthcare, München
10 mm QS-Halbmikroküvetten	Hellma GmbH & Co. KG, Jena
NanoPhotometer	Implen GmbH, München
<i>Autoklaven</i>	
Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
<i>Circulardichroismus</i>	
J-810	Jasco, Groß-Umstadt
PTC-423S	Jasco, Groß-Umstadt
0,1; 0,5 mm & 1 mm QS-Küvetten	Hellma GmbH & Co. KG, Jena
<i>Chromatographie-Anlagen</i>	
Äkta purifier	GE Healthcare, München
Fraktionssammler Frac-900	GE Healthcare, München
<i>Chromatographiesäulen</i>	
HiTrap Q HP, 5 ml	GE Healthcare, München
Superdex 75 prep grade HiLoad 16/60	GE Healthcare, München
Superdex 200 prep grade HiLoad 16/60	GE Healthcare, München
HiTrap Phenyl HP, 5 ml	GE Healthcare, München
CFT keramisches Fluoroapatit	BioRad, München
Tricorn 10/50	GE Healthcare, München
<i>Elektroporationseinheit</i>	
Gene Pulser II	BioRad, München
Elektroporationsküvetten, 2 mm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>Evaporatoren</i>	
Rotationsverdampfer	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Jouan RC 10.10	Jouan Inc., Winchester; USA

<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	
Fluoromax III und IV	HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhachingen
10 mm QS-Halbmikroküvetten	Hellma GmbH & Co. KG, Jena
<i>Fermentation</i>	
Bioreaktor Biostat ED, 10 l	Sartorius, Göttingen
Digitales Mess- und Regelsystem C-DCU	
Prozeßleitsystem MCF5win	
<i>Gelelektrophorese</i>	
EPS 200	GE Healthcare, München
EPS 600	GE Healthcare, München
SE 250	Hoefer Inc., Holliston, USA
<i>Heizblöcke und Thermostate</i>	
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
K21 und W10	MedingLab, Freital
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
<i>Homogenisatoren</i>	
Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 60	APV, Lübeck
Gaulin-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40	APV, Lübeck
Ultra-Turrax T25	Janke&Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
<i>HPLC-Anlagen</i>	
P-460 HPLC-Pumpe	Dionex GmbH, Idstein
Gina 50 Autosampler	Dionex GmbH, Idstein
170S UV-Detektor	Dionex GmbH, Idstein
<i>HPLC-Säulen</i>	
Jupiter 250-4.6 300 Å (5µ) C18	Phenomenex, Aschaffenburg
Lichrospher 250-4 100 Å (5µ) C18	Merck, Darmstadt
Nucleosil 250-10 300 Å (5µ) C18	Macherey und Nagel, Düren
Nucleosil 250-16 300 Å (5µ) C18	Macherey und Nagel, Düren
Security Guard Vorsäulensysteme	Phenomenex, Aschaffenburg

<i>Inkubatoren</i>	
Certomat BS-T	Sartorius, Göttingen
CO ₂ Inkubator HERAcell	Heraeus, Hanau
<i>Laminarflowbox</i>	
Hera Safe	Heraeus, Hanau
<i>Mikroskop</i>	
TELAVAL 3	Carl Zeiss, Jena
<i>pH-Messgerät</i>	
pH-Meter	WTW, Weilheim
<i>Pumpen</i>	
Schlauchquetschpumpe 313U	Watson Marlow, Rommerskirchen
P1 Peristaltikpumpe	GE Healthcare, München
<i>Rotoren</i>	
JA 30.50	Beckmann, München
JA 25.50	Beckmann, München
JA 20	Beckmann, München
JLA 16.250	Beckmann, München
JLA 8.1000	Beckmann, München
<i>Waagen</i>	
BP 4100S	Sartorius, Göttingen
MC1	Sartorius, Göttingen
<i>Zentrifugen</i>	
Avanti J-20	Beckmann, München
Avanti J-25	Beckmann, München
Avanti J-30	Beckmann, München
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Küvettenschleuder	ITS, Hattersheim
Ultrazentrifuge optima TLX	Beckmann, München
Universal 32R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.2 Methoden

Zur Anfertigung dieser Arbeit wurde auf nachfolgende Methoden zurückgegriffen.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmiden mit dem Kit von PEQLAB Biotechnologie GmbH basiert auf dem Protokoll der alkalischen Lyse der *E. coli*-Zellen, gefolgt von der Adsorption der DNA an eine Silikat-Matrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Ausgehend von einer 2 ml Übernachtkultur erfolgte die Anwendung gemäß der mitgelieferten Beschreibung. Eluiert wurde das Plasmid in 50 µl Wasser.

Alternativ wurden 500 ml Übernachtkultur mittels des Qiagen Plasmid Mega Kits gemäß Anleitung extrahiert und in 1,5 ml Wasser aufgenommen.

2.2.1.2 Analyse des Plasmids

Die DNA-Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt. Ggf. wurde die Identität des isolierten Plasmids über einen Verdau und Analyse durch Agarosegelelektrophorese überprüft und zur genauen Bestimmung der DNA-Sequenz zur Sequenzierung zu Eurofins MWG Operon, Martinsried, eingeschickt.

2.2.1.3 Herstellung chemokompetenter Zellen

Eine 100 ml Vorkultur wurde mit 1 ml einer Glycerinkulture angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Inkubation abgebrochen, und die Zellen für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem CK1-Puffer aufgenommen und für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien wie oben abzentrifugiert, in 4 ml eiskaltem CK2-Puffer resuspendiert, in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Puffer und Lösungen

CK1-Puffer (0,1 M CaCl₂)

CK2-Puffer (0,1 M CaCl₂; 25% (v/v) Glycerin)

2.2.1.4 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Ein Aliquot (100 µl) chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit ca. 80 ng Plasmid-DNA versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch

einen Hitzeimpuls von 42°C für 60 sek im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen weitere 5 min auf Eis inkubiert und dann mit 800 µl LB-Medium versetzt und 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Auf LB-Agarplatten mit plasmidspezifischem Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin, 70 µg/ml Kanamycin) wurden 50 und 200 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und über Nacht (14 – 16 h) bei 37°C inkubiert.

Puffer und Lösungen

LB-Medium (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl)

LB-Agar (5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 5 g/l NaCl; 15 g/l Agar-Agar)

2.2.1.5 Kultivierung von *E. coli*

Für Übernachtskulturen wurden 2,5 ml (Plasmidpräparation-Mini) bzw. 200 ml LB-Medium (Vorkultur für Proteinexpression) bzw. 500 ml (Plasmidpräparation-Mega) mit Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie bzw. einer Glycerinkultur angeimpft und bei 37°C für 15-18 Stunden bei 150 rpm kultiviert

2.2.2 Proteinexpression

2.2.2.1 Heterologe Expression von GCAP-2 in *E. coli* im Erlenmeyerkolben

Die rekombinante Genexpression wurde in vier 5-l-Erlenmeyerkolben mit je 1,2 l LB-Medium durchgeführt, das mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt war. Pro Kolben wurden 10 ml einer Übernachtskultur zum Kulturmedium hinzugefügt und unter Schütteln bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Das Zellwachstum wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) in Abständen von 30-60 min verfolgt. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600} von 0,7-0,9 durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 mM. Anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden bei 37°C und 150 rpm weiter inkubiert. Die OD_{600} wurde vor Abbruch der Expression noch einmal kontrolliert und lag zwischen 1,4 und 2,4. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Kultur für 20 min bei 6500 rpm und 4°C.

Alternativ zur Expression von GCAP-2 als Koexpression mit pBB131

Die Expression von myristoyliertem GCAP-2 erfordert die Anwesenheit des Plasmids pBB131. Dieses kodiert für die N-Myristoyltransferase I aus *S.cerevisiae* [122] und eine Kanamycinresistenz. Daher erfolgte die Koexpression wie oben beschrieben mit zusätzlich 70 µg/ml Kanamycin im Medium. Zusätzlich wurde ca. 20 min vor Induktion (bei einer OD_{600}

von 0,4-0,6) 50 µg/ml Myristinsäure zugesetzt, um ausreichend Substrat für die N-Myristoyltransferase I zur Verfügung zu stellen. Alternativ wurde deuterierte Myristinsäure bzw. 12-Mercapto-1-dodecansäure verwendet. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,9 wurde dann induziert.

2.2.2.2 Koexpression von GCAP-2 mit pBB131 im Bioreaktor

Die Zellen aus einer 200-ml-Vorkultur wurden bei 5000 rpm abzentrifugiert und in 200 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Damit wurden die 6 l Startvolumen Hefeextraktmedium inokuliert. Die Temperatur während der Fermentation betrug 37°C, ein pH von 7,0 wurde durch automatisch reguliertes Zupumpen von Natronlauge bzw. Phosphorsäure konstant gehalten. Das Hefeextraktmedium enthielt 200 µg/ml Ampicillin und 140 µg/ml Kanamycin. Das System wurde durch Variation der Rührerdrehzahl und der Belüftungsrate so reguliert, dass der Sauerstoffpartialdruck konstant bei 30% blieb. Bei einer OD₆₀₀ von 11,4 wurde die Zufütterung mit ca. 8-10 ml/min *feeding*-Lösung gestartet. Bei einer OD von 32,5 wurde das Medium mit 12 ml Myristinsäure aus einer 50-mg/ml-Stammlösung versetzt. 15 min später wurde bei einer OD von 37,5 mit 1 mM IPTG induziert. Ca. 1,5 Stunden nach Induktion wurden ein weiteres Mal 12 ml Myristinsäure aus einer 50-mg/ml-Stammlösung zum Medium zugefügt, um zu gewährleisten, dass weiterhin ausreichend Substrat für die N-Myristoyltransferase I zur Verfügung stand. Die Expression wurde 3,5 Stunden nach Induktion abgebrochen und die Zellsuspension für 20 min bei 6500 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

Puffer und Lösungen

Hefeextraktmedium (50 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NH₄Cl; 5 g/l Glucose; 0,68 g/l MgSO₄; 11 g/l K₂HPO₄)

Feedinglösung (300 g/l Glucose, 25% (v/v) Glycerin)

10% NaOH

10% H₃PO₄

2.2.3 Zellaufschluss, Präparation von *inclusion bodies* und Renaturierung

2.2.3.1 Präparation von *inclusion bodies*

12-20 g Biofeuchtmasse wurden in 70 ml IB1-Puffer resuspendiert, mit 15 mg Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde mittels eines Dispergiergerätes (Ultra-Turrax G25) homogenisiert und dann 3-mal durch den Gaulin-

Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 passiert. Dem Homogenisat wurden 210 µl MgCl₂ und 10 µl Benzonase zugefügt. Nach Inkubation von 45 min bei Raumtemperatur wurden dem Homogenisat 35 ml IB2a-Puffer bzw. 35 ml IB2b-Puffer zugesetzt und 10 min bei 4°C gerührt. Die unlöslichen *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation für 25 min bei 20000 rpm vom löslich exprimierten Anteil separiert. Vom löslichen Zellextrakt wurde eine Probe entnommen. Durch dreimaliges Resuspendieren in IB3-Puffer und anschließendes Abzentrifugieren für 25 min bei 20000 g wurde das Pellet gewaschen.

Alternativ wurde mit großen Mengen Biomasse wie folgt verfahren:

110 g Biofeuchtmasse wurden in 600 ml IB1-Puffer resuspendiert, mit 100 mg Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde mittels Ultra-Turrax homogenisiert und dann in drei Passagen mittels Gaulin-Hochdruckhomogenisator Lab 60 aufgeschlossen. Dem Homogenisat wurden 1,8 ml MgCl₂ und 50 µl Benzonase zugefügt. Nach Inkubation von 45 min bei Raumtemperatur, wurden dem Homogenisat 300 ml IB2-Puffer zugesetzt und 10 min bei 4°C gerührt. Die folgenden Arbeitsschritte sind mit denen für die *inclusion body*-Präparation für geringe Mengen Biomasse identisch.

Puffer und Lösungen

IB1-Puffer (100 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0)

MgCl₂ (1 M MgCl₂)

Benzonase (2500 U)

IB2a-Puffer (6 % Triton X-100; 1,5 M NaCl; 60 mM EDTA; pH 7,0)

IB2b-Puffer (1,5 % LDAO; 1,5 M NaCl; 60 mM EDTA; pH 7,0)

IB3-Puffer (100 mM Tris/HCl; 20 mM EDTA; pH 8,0)

2.2.3.2 Solubilisierung von *inclusion bodies*

Mittels eines Dispergiergerätes (Ultra-Turrax G25) wurden 1-3,5 g *inclusion bodies* in 10-35 ml SL-Puffer resuspendiert und 2 Stunden geschwenkt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 25000 rpm abgetrennt und verworfen.

Puffer und Lösungen

SL-Puffer (6 M GuaHCl; 100 mM Tris/HCl; 100 mM DTT; pH 8,0)

2.2.3.3 Renaturierung von GCAP-2 aus solubilisierten *inclusion bodies*

Über eine Kanüle wurden 10-35 ml der solubilisierten *inclusion bodies* mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min zu 0.6-2 l des mit 800-1000 rpm gerührten Renaturierungspuffers zugetropft. Der Renaturierungsansatz wurde für weitere 6-16 Stunden bei 4°C gerührt. Danach wurden die Aggregate für 45 min bei 16000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C mittels einer Crossflow-Membran VivaFlow 200 auf 100-200 ml eingengt. Alternativ wurde das rückgefaltete GCAP-2 direkt für eine hydrophobe Interaktionschromatographie eingesetzt.

Puffer und Lösungen

Renaturierungspuffer (100 mM Tris/HCl; 500 mM Na₂SO₄; 1 mM DTT; 0,1 mM CaCl₂; pH 8,5)

2.2.4 Chromatographische Reinigung der GCAPs

2.2.4.1 Ionenaustauschchromatographie

Zur Vorbereitung der Ionenaustauschchromatographie wurde der eingengte Renaturierungsansatz über Nacht zwei mal 1:20 gegen IX1-Puffer dialysiert. Pro Lauf wurden ca. 45-80 mg Protein auf eine 5 ml Q-Sepharose HP Säule aufgetragen. Zur Elution wurde der IX2-Puffer in einem linearen Gradienten über 15 Säulenvolumen bis 60% durch IX3-Puffer ersetzt und die Elution in 1,9 ml Fraktionen gesammelt.

Puffer und Lösungen

IX1-Puffer (20 mM Tris/HCl; 1 mM CaCl₂; pH 8,0)

IX2-Puffer (20 mM Tris/HCl; 50 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 1 mM DTT; pH 8,0)

IX3-Puffer (20 mM Tris/HCl; 1 M NaCl; 1 mM CaCl₂; 1 mM DTT; pH 8,0)

2.2.4.2 Präparative Größenausschlusschromatographie

Die vereinigten Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie wurden mittels Amicon Zentrifugalkonzentratoren auf 10-15 mg/ml aufkonzentriert. Davon wurden dann 2,5-3 ml auf eine Superdex 200-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 1 ml/min mit SX1-Puffer gespült. Nach 38 ml wurde die Fraktionierung von 1,9 ml Fraktionen gestartet. Nach 110-120 ml wurde die Fraktionierung beendet.

Puffer und Lösungen

SX1-Puffer (20 mM NaH₂PO₄/NaOH; pH 7,0)

2.2.4.3 analytische Größenausschlusschromatographie

Auf eine Superdex 75 5/150 GL (GE Healthcare) wurden 15 µl gereinigtes GCAP-2 in einer Konzentration von 20 µM aufgetragen. Alternative wurden 15 µl myristoyliertes in einer Konzentration von 10 µM N-terminales Peptid von GCAP-2 (myr-NT) appliziert. Zur Untersuchung der Koelution wurden 15 µl mit 20µM gereinigtes GCAP-2 und 10µl myr-NT auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,3 ml/min KoL-Puffer gespült.

Puffer und Lösungen

KoL-Puffer (100 mM MOPS/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; pH 7,0)

2.2.4.4 reversed phase Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die vereinigten Fraktionen des myr-GCAP-2 aus der Ionenaustauschchromatographie wurden zur Trennung der myristoylierten und nicht-myristoylierten Spezies von GCAP-2 auf eine präparative bzw. semi-präparative rpHPLC-Säule bei einer Flussrate von 3,5 ml/min (semi-präparativ) bzw. 8,75 ml/min (präparativ) 5 min bei 99 % RP1 und 1 % RP2 aufgetragen. In einem linearen Gradienten wurde nun innerhalb von 35 min auf 61.4 % RP2 erhöht. Ab Minute 33 eluierte nicht-myristoyliertes GCAP-2, ca. eine Minute später das myristoylierte bzw. 12-Mercaptododecansäure-modifizierte GCAP-2. Beide Peaks wurden manuell aufgefangen. Die Identität der Proteine wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt. Das Lösungsmittel wurde in einer Speedvac eingedampft und das myristoylierte GCAP-2 anschließend in 2-10 ml SL-Puffer aufgenommen. Das Protein wurde erneut in 80-400 ml Renaturierungspuffer zurückgefaltet und mittels Crossflow-Membran VivaFlow 200 bzw. Amicons aufkonzentriert. Das aufkonzentrierte Protein wurde gegen SX1-Puffer dialysiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Puffer und Lösungen

RP1-Puffer (0,1% TFA)

RP2-Puffer (0,1% TFA in Acetonitril)

2.2.4.5 Chromatographie mit einer Fluoroapatit-Säule

Von Dr. Christian Lange (MLU) wurde eine mit keramischem Fluoroapatit gepackte 5 ml - Säule zur Verfügung gestellt. Auf diese, mit FA1-Puffer äquilibrierte, Säule wurden ca. 10 mg Protein aus den vereinigten Fraktionen der Gelfiltration bzw. der hydrophoben Interaktionschromatographie bei einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Der Durchlauf,

welcher das GCAP-2 enthielt, wurde aufgefangen. Gebundene Verunreinigungen wurden mit 0,1 M Kaliumhydroxid eluiert und nicht fraktioniert.

Puffer und Lösungen

FA1-Puffer (20 mM NaH₂PO₄/NaOH; 1 mM DTT; pH 7,0)

2.2.5 Methoden zur Analyse und Identifikation von Proteinen

2.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die reduzierende SDS-PAGE ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht. Dazu wird das Protein denaturiert und bekommt gleichzeitig eine negative Nettoladung.

Für die SDS-PAGE nach Laemmli [124] wurden Gele bestehend aus Sammel- (6 % (w/v) Acrylamid) und Trenngel (15% (w/v) Acrylamid) eingesetzt. Proteinproben wurden 5-10 min bei 95°C in Probenpuffer inkubiert und kurz bei 13000 rpm zentrifugiert bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als Größenstandard diente der LMW-Marker mit Proteinen von 14,4 bis 116 kDa Größe.

Die Gele wurden mit der Methode nach Fairbanks *et al.* [125] gefärbt. Alternativ wurde eine Silbernitratfärbung nach Nesterenko *et al.* [126] oder eine modifizierte Kolloidalfärbung nach Kang *et al.* [127] verwendet. Die Gele wurden in Entfärbelösung entfärbt.

Puffer und Lösungen

30% Acrylamid/ 0,8% Bisacryl-amid

5x SDS Laufpuffer (15,1 g/l Tris; 5 g/l SDS; 94 g/l Glycin)

4x SDS Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl; 0,8% (w/v) SDS; pH 6,8)

4x SDS Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl; 0,8% (w/v) SDS; pH 8,0)

5x SDS-Probenpuffer (250 mM Tris/HCl; 5% (w/v) SDS; 0,005% (w/v) Bromphenolblau;

50% (v/v) Glycerol; 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol; pH 8,0)

Entfärbelösung (10% Essigsäure)

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration von Proteingemischen wurde nach der Methode nach Bradford [128] durchgeführt. Dazu wurden 200 µl Biorad-Protein-Assay-Lösung mit 1-20 µg Protein versetzt und in einer reduzierten Küvette mit Wasser auf 1 ml Volumen aufgefüllt. Die Absorption bei 595 nm wurde bestimmt, mit Messwerten einer Eichreihe (BSA) verglichen und so die Proteinkonzentration abgeschätzt.

2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Proben, die Lipide enthielten, wurde nach Schaffner und Weissmann [129] durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellmembranen mit Wasser auf ein Endvolumen von 270 μl aufgefüllt, 30 μl SW1 wurden zugesetzt und der Ansatz gemischt. Nach Zugabe von 60 μl SW2 und wiederholtem Mischen wurde die gesamte Lösung auf eine mit Wasser befeuchtete Nitrocellulosemembran pipettiert und das Lösungsmittel mittels Vakuumpumpe durch die Membran abgezogen. Das Probengefäß wurde mit 300 μl SW3 gespült und diese 300 μl wurden ebenfalls auf die Blotmembran pipettiert. Anschließend wurde die Blotmembran zweimal mit 2 ml SW3 gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Inkubation der Blotmembran für 3 min in 30 ml SW4 und anschließendes Waschen für 30 s mit Wasser, zweimal 1 min mit SW5 und 2 min mit Wasser. Die gefärbten Proteinflecken wurden ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml SW6 und Inkubation für 2 h unter regelmäßigem Vortexen wurde das Protein von der Membran eluiert. Spektroskopisch konnte dann die Absorption bei 630 nm bestimmt werden. Zusätzlich zu den Proben wurde bei jeder Messung eine Eichreihe bestehend aus 6 Punkten mit 0-20 μg BSA erstellt, wobei auf die gleiche Weise verfahren wurde.

Puffer und Lösungen

SW1 (1 M Tris pH 7,5; 10 % (w/v) SDS)

SW2 (60 % (w/v) TCA)

SW3 (6 % (w/v) TCA)

SW4 (0,1 % (w/v) Amidoschwarz; 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure)

SW5 (90 % (v/v) Methanol; 2 % (v/v) Essigsäure)

SW6 (25 mM NaOH; 0,05 mM EDTA; 50 % (v/v) Ethanol)

2.2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorptionsmessung

Zur Bestimmung der Konzentration von gereinigtem Protein wurde ein Spektrum von 240-340 nm gegen eine Referenz aus dem jeweiligen Puffer aufgenommen. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ des nativen GCAP-2 beträgt $\epsilon_{\text{GCAP-2}}(280 \text{ nm})$ gleich $37512 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Koch (Universität Oldenburg)). Daraus ergibt sich ein spezifischer Extinktionskoeffizient für 1 mg/ml von $\epsilon_{\text{GCAP-2}, 280\text{nm}, 1\text{mg/ml}} = 1,58 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$.

2.2.5.5 Analytische rpHPLC

Auf eine Jupiter 250-4.6 300 Å (5µ) C18-Säule wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min 20-100 µg des zuvor mit 1 % AcN, 0,1 % TFA versetzten Proteins aufgetragen. Für fünf Minuten blieb der Anteil an RP1 bei 99 %, der von RP2 bei 1 %, dann wurde mittels eines linearen Gradienten über 40 min auf 80 % RP2-Puffer erhöht. Bei Detektion eines Peaks wurde die Elution aufgefangen und an Frau Dr. Schierhorn zur massenspektrometrischen Analyse gegeben.

2.2.5.6 Entsalzen mittels ZipTip

Pipettenspitzen, die mit einem auf *reversed phase* basierenden Säulenmaterial versetzt waren (ZipTips), wurden genutzt um 10-20 µg Protein gemäß Anleitung zu entsalzen. Die Proben wurden an Frau Dr. Schierhorn zur massenspektrometrischen Analyse gegeben.

2.2.6 Nachweis der Aktivität von GCAP-2

2.2.6.1 Kultivierung von HEK293 Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden HEK293 erfolgte in Zellkulturflaschen oder Zellkulturtestplatten. Als Medium wurde ZK-Medium verwendet, wovon 0,2 ml/cm² eingesetzt wurden. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator HERAcell bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ in einer gesättigten Wasserdampfathmosphäre. Bei 80-95 %iger Konfluenz wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit Dulbecco's PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und durch mehrfaches auf- und abpipettieren in neuem ZK-Medium gleichen Volumens suspendiert. ZK-Medium einer neuen Zellkulturflasche wurde mit 0,1-0,2 Volumen der suspendierten Zellen inokuliert.

Puffer und Lösungen

ZK-Medium (D-MEM; 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) GlutaMax-1; 0,5 % (v/v) Gentamycin)

2.2.6.2 Etablierung der transienten Expression in HEK293 Zellen

Zunächst wurden verschiedene Mengen Lipofectamin (0-20 µl) in 400 µl ZK-Medium gegeben. Nach ca. 10 min wurden dem Ansatz jeweils 2,5 µg pcDNA3.1 ROS GC1 zugefügt. Nach weiteren 30 min Inkubation wurde das Transfektionsgemisch auf die zu ca. 80 % konfluenten Zellen in einer 6-well-Platte (10 cm² pro Well) gegeben. Die Zellen wurden für 24 h im CO₂-Inkubator HERAcell inkubiert und anschließend geerntet.

Da ein Optimum in der produzierten Menge cGMP (siehe Kapitel 2.2.6.5) bei 4 µl Lipofectamin pro µg Plasmid-DNA bestimmt wurde, wurde im nächsten Schritt die optimale Menge Plasmid-DNA bei diesem konstanten Verhältnis zu Lipofectamin ermittelt. Dazu wurden 0-20 µl Lipofectamin mit 400 µl ZK-Medium gemischt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden Mengen pcDNA3.1 ROS GC1 zugegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation wurde das Transfektionsgemisch auf die zu ca. 80 % konfluenten Zellen in einer 6-well-Platte (10 cm² pro well) gegeben. Die Zellen wurden für 24 h im CO₂-Inkubator HERAcell bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂ in einer gesättigten Wasserdampfatosphäre inkubiert und anschließend geerntet.

Um den optimalen Zeitpunkt der Zellernte zu bestimmen, wurden 2,4 ml ZK-Medium mit 43,2 µl Lipofectamin gemischt. Nach 10 min wurden 10,8 µg pcDNA3.1 ROS GC1 zugegeben. Je 400 µl des Ansatzes wurden in ein well einer 6-well-Platte mit zu ca. 80 % konfluenten Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 24 h im CO₂-Inkubator HERAcell bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂ in einer gesättigten Wasserdampfatosphäre inkubiert und anschließend geerntet.

Nach 16 h und 24 h wurde Zellen aus jeweils einem well geerntet. Ebenfalls 24 h Stunden nach Beginn der Transfektion wurden zwei wells mit 7,5 mM Natriumbutyrat versehen. Je ein well mit und ohne Natriumbutyrat wurde 40,5 h nach Beginn der Transfektion geerntet, je ein weiteres well mit und ohne Natriumbutyrat 48 h nach Beginn der Transfektion.

2.2.6.3 Transiente Expression im größeren Maßstab

Als optimales Protokoll für die transiente Expression von ROS-GC1 in HEK293 Zellen ergaben sich folgende Arbeitsschritte. In 3 ml bzw. 6 ml ZK-Medium wurden 54 µl bzw. 108 µl Lipofectamin gegeben. Nach einer Inkubation von 10 min wurden 13,5 µg bzw. 27 µg pcDNA3.1 ROS GC1 zugefügt. Dieses Gemisch wurde nach 30 min auf Zellen mit ca. 80 % Konfluenz in einer 75 cm² bzw. 150 cm² Zellkulturflasche gegeben. Nach 18-24 h wurde das ZK-Medium abgesaugt und gegen neues ZK-Medium, das zusätzlich 7,5 mM Natriumbutyrat enthielt, ersetzt. Die Zellen wurden 48-60 h nach Beginn der Transfektion geerntet.

2.2.6.4 Präparation der Zellmembran

Die HEK293 Zellen wurden mittels eines Zellschabers abgeschabt und anschließend durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden für 5 min bei 200 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 5 ml PBS gewaschen und erneut für 5 min bei 200 g pelletiert. Die Zellen wurden in 40 µl pro cm² (Kulturschale) MP1-Puffer

aufgenommen und zu 400 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden entweder direkt zur Präparation der Zellmembran verwendet oder in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschall. Dazu wurden 5 Pulse für 0,5 s und mit einer Amplitude von 50 % appliziert. Anschließend wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen in einer Zentrifuge bei 400 g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde für 20 min bei 125000 g zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet, das die Zellmembranen enthielt, wurde in 200 µl MP2-Puffer aufgenommen und gründlich resuspendiert. Jeweils 10 µl der Membransuspension wurde für einen Aktivitätstest eingesetzt.

Puffer und Lösungen

MP1-Puffer (10 mM HEPES/KOH; 1 mM DTT; pH 7,5)

MP2-Puffer (10 mM HEPES/KOH; 250 mM KCl; 10 mM NaCl; 1 mM DTT; pH 7,5)

2.2.6.5 Bestimmung der Aktivität der ROS-GC1 und Modulation dieser

Die Aktivität der ROS-GC1 wurde nach der Methode von Koch [71] bestimmt. Zur Bestimmung der Basalaktivität wurden 10 µl suspendierte Zellmembranen zu einem Gesamtvolumen von 50 µl in Mn-GC-Puffer bzw. Mg-GC-Puffer aufgefüllt.

Zur Bestimmung der Regulierbarkeit durch GCAP-2 wurden 10 µl suspendierte Zellmembran mit verschiedenen Konzentrationen GCAP-2 versetzt und zu einem Gesamtvolumen von 50 µl in Mg-GC-Puffer aufgefüllt. Dabei waren entweder 1 mM CaCl₂ oder 1 mM EGTA im Ansatz enthalten.

Zur Bestimmung des Einflusses des N-terminalen GCAP-2 Peptides auf die Aktivität der ROS-GC-1 wurden 10 µl suspendierte Zellmembranen mit verschiedenen Konzentrationen des N-terminalen GCAP-2 Peptides versetzt.

Zur Bestimmung des Einflusses des N-terminalen GCAP-2 Peptides auf die Regulierbarkeit der ROS-GC-1 durch GCAP-2 wurden 10 µl suspendierte Zellmembranen mit 10 µM GCAP-2 versetzt. Verschiedene Konzentrationen des N-terminalen GCAP-2 Peptides wurden in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ bzw. 1 mM EGTA dem Gemisch zugesetzt.

Die Proben wurden nach Zugabe des 5-fach konzentrierten Mn-GC-Puffers bzw. Mg-GC-Puffers, der auch das Substrat enthielt, bei 30 °C für 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 0,5 M EDTA; pH 7,5 wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden 10 min bei 96 °C inkubiert. Das aggregierte Protein wurde anschließend durch 10 min Zentrifugation bei

13000 g pelletiert und der Überstand zur Analyse auf eine rpHPLC (Lichrospher 250-4 100 Å (5µ) C18) appliziert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Elutionsmittel wurde Methanol/5 mM Kaliumdihydrogenphosphat verwendet. Zur Auswertung wurde die Extinktion bei 259 nm verfolgt. Nach 3-minütigem Einspülen mit 5 mM KH₂PO₄ wurde in einem linearen Gradienten von 0 % auf 70 % Methanol in weiteren 12 min das Gemisch aufgetrennt. Dabei eluierte das gebildete cGMP bei einer Retentionszeit von 9,4 -10,1 min. Die Peakfläche wurde integriert und die Menge des produzierten cGMPs durch den Vergleich mit einer Standard-Eichgeraden bestimmt.

Puffer und Lösungen

Mn-GC-Puffer (40 mM MOPS/KOH; 56 mM KCl; 8 mM NaCl; 2 mM MnCl₂; 2 mM GTP; 0,4 mM IBMX; pH 7,1)

Mg-GC-Puffer (40 mM MOPS/KOH; 56 mM KCl; 8 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM GTP; 0,4 mM IBMX; pH 7,1)

2.2.7 Lipidbindung

2.2.7.1 Präparation von unilamellaren Lipidvesikeln

Für die Präparation von Liposomen wurden die jeweiligen Lipide eingewogen und in Chloroform gelöst, so dass eine Konzentration von 10 mM erreicht wurde. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurde ein entsprechendes Lipidgemisch hergestellt. In einem Rundkolben wurde das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers abgedampft, wobei ein gleichmäßiger Film aus den Lipiden im Kolben zurückblieb. Dieser Lipidfilm wurde mit der entsprechenden Menge MOPS+Mg+Ca-Messpuffer bzw. MOPS+Mg-Ca-Messpuffer versetzt, so dass eine Konzentration von 20 mg/ml Lipid erreicht wurde. Durch intensives Schütteln für 10 min wurde der Lipidfilm gelöst. Die Emulsion wurde 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Emulsion in ein Kryoröhrchen überführt. Die Emulsion wurde mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und im Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde 10-mal wiederholt. Anschließend wurde die Lösung 10-mal durch einen Extruder mit einer Filtermembran (100 nm Porengröße) passiert, wobei vorrangig unilamellare Liposomen mit einer definierten Größe entstanden.

Puffer und Lösungen

MOPS+Mg+Ca-Messpuffer (100 mM MOPS/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; pH 7,0)

MOPS+Mg-Ca-Messpuffer (100 mM MOPS/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; pH 7,0)

2.2.7.2 Probenvorbereitung

Vor dem Experiment wurden Aliquots von myr- bzw. non-myr-GCAP-2 gegen MOPS+Mg+Ca-Messpuffer bzw. MOPS+Mg-Ca-Messpuffer dialysiert.

2.2.7.3 Liposomenbindungsassay

In einem Volumen von 50-200 µl wurden 5 mg/ml der jeweiligen Liposomen mit 0,5 mg/ml myristoyliertem bzw. unmyristoyliertem GCAP-2 in MOPS+Mg+Ca-Messpuffer oder MOPS+Mg-Ca-Messpuffer für 4 h bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Liposomen und daran gebundenes Lipid durch Ultrazentrifugation für 20 min bei 125000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit ¼ Volumen des 5x SDS-Probenpuffers versetzt. Entsprechend der Menge des Überstands wurde das Pellet im gleichen Endvolumen aufgenommen und resuspendiert. Zur Auswertung wurden vom Überstand und resuspendierten Pellet gleiche Volumina auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach einer SDS-PAGE wurden die Gele nach Fairbanks gefärbt und gescannt. Durch densitometrische Analyse der Gelbanden mittels der Software Phoretix 1D konnte der Anteil von gebundenem und ungebundenem Protein ermittelt werden.

2.2.7.4 ²H-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Probenvorbereitung und Aufnahme der ²H-Festkörper-NMR-Spektren wurde von Dr. Alexander Vogel (MLU) durchgeführt und erfolgte wie in Vogel *et al.* [130] beschrieben.

2.2.8 Bestimmung der thermodynamischen Stabilität & Charakterisierung der hydrophoben Oberfläche

2.2.8.1 Probenvorbereitung

1-5 ml des gereinigten Proteins mit einer Konzentration von 0,5-1,3 mg/ml wurden zweimal für 6-12 Stunden gegen jeweils 20 Volumina des CAC+Mg+Ca-Messpuffer, CAC+Mg-Ca-Messpuffer, CAC-Mg+Ca-Messpuffer oder CAC-Mg-Ca-Messpuffer dialysiert. Um GCAP-2 zu denaturieren, wurde gegen CAC+Mg+Ca-Gua-Dialysepuffer, CAC+Mg-Ca-Gua-Dialysepuffer, CAC-Mg+Ca-Gua-Dialysepuffer, CAC-Mg-Ca-Gua-Dialysepuffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde das denaturierte Protein mit 1 mM DTT versetzt.

Puffer und Lösungen

CAC+Mg+Ca-Messpuffer (100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; pH 7,0)

CAC+Mg-Ca-Messpuffer (100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; pH 7,0)

CAC-Mg+Ca-Messpuffer (100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 1 mM CaCl₂; pH 7,0)

CAC-Mg-Ca-Messpuffer (100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 1 mM EGTA; pH 7,0)

CAC+Mg+Ca-Gua-Dialysepuffer (6 M GuHCl; 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; pH 7,0)

CAC+Mg-Ca-Gua-Dialysepuffer (6 M GuHCl; 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; pH 7,0)

CAC-Mg+Ca-Gua-Dialysepuffer (6 M GuHCl; 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 1 mM CaCl₂; pH 7,0)

CAC-Mg-Ca-Gua-Dialysepuffer (6 M GuHCl; 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 1 mM EGTA; pH 7,0)

2.2.8.2 Chemisch induzierte Faltung/Entfaltung

Alle Messungen wurden in 0,1 M Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; pH 7,0 durchgeführt. Zum Teil enthielt der Puffer noch 10 mM MgCl₂. Puffer mit Calcium enthielt 1 mM Calcium, Puffer ohne Calcium stattdessen 1 mM EGTA.

Das native bzw. denaturierte myr-GCAP-2 bzw. non-myr-GCAP-2 wurde auf eine Endkonzentration von 0,11 mg/ml mit den angegebenen Endkonzentrationen zwischen 0 M und 7,76 M GuHCl verdünnt. Für Messungen der Tryptophanfluoreszenz wurde auf eine Proteinendkonzentration von 16 µg/ml verdünnt. Nach Mischung wurden die Proben 30 min inkubiert und anschließend vermessen.

Übergangskurven wurden ausgehend von nativem GCAP-2 mittels Fluoreszenz vermessen. Übergangskurven ausgehend von nativem und denaturiertem GCAP-2 wurden mittels fern-UV Circular dichroismus (CD) vermessen.

Fern-UV CD-Messungen wurden am Jasco J-810 mit Peltierelement PTC-423S bei 25 °C durchgeführt. Dazu wurde das Signal der Elliptizität bei 222 nm in einer 1 mm Küvette für 40 s aufgenommen. Das Signal der letzten 20 s wurde gemittelt und als Messpunkt verwendet. Tryptophanfluoreszenz-Messungen wurden an einem Fluoromax III oder IV bei 25 °C durchgeführt. Die Probe in einer Halbmikroküvette wurde dazu bei 295 nm angeregt. Ein

Fluoreszenzemissionsspektrum zwischen 310 nm und 400 nm wurde aufgenommen und dreimal akkumuliert. Das Fluoreszenzemissionssignal von 349-351 nm wurde gemittelt.

Die Messdaten aus den GuHCl-induzierten Übergängen, gemessen mit Tryptophanfluoreszenz, und die Daten aus den Übergängen, gemessen mit Fern-UV CD, wurden zwischen 0 und 1 normiert und anschließend global nach einem Zwei-Zustands-Modell gefittet. Dabei wurde das CD-Signal des nativen und denaturierten Zustands als konstant angenommen. Für das Fluoreszenzsignal des nativen und denaturierten Zustands wurde ein linearer Zusammenhang zur GuHCl Konzentration angenommen.

Puffer und Lösungen

CAC+Mg+Ca-Gua-Messpuffer (ca. 8 M GuHCl, 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; pH 7,0)

CAC+Mg-Ca-Gua-Messpuffer (ca. 8 M GuHCl, 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; pH 7,0)

CAC-Mg+Ca-Gua-Messpuffer (ca. 8 M GuHCl, 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 1 mM CaCl₂; pH 7,0)

CAC-Mg-Ca-Gua-Messpuffer (ca. 8 M GuHCl, 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 1 mM EGTA; pH 7,0)

Die exakte Konzentration an GuHCl der Puffer wurde refraktrometrisch unmittelbar vor der Messung bestimmt.

2.2.8.3 Thermisch & chemisch induzierte Faltung/Entfaltung

Temperaturübergänge wurden mittels fern-UV CD bei 222 nm in einer 0,5 mm Küvette verfolgt. Dazu wurde 0,1 mg/ml GCAP-2 in den gleichen Puffern wie in Abschnitt 2.2.8.2 gelöst. Zusätzlich enthielt die Probe verschiedene Mengen GuHCl (0, 2, 3, 4, 5 und 7 M). Diese Proben wurden mit einer konstanten Temperaturrampe von 1 K/min von 1 °C – bis 80 °C geheizt. Diese Temperaturübergänge waren reversibel in Anwesenheit von Ca²⁺. In Abwesenheit von Ca²⁺ waren die Übergangskurven nur bei GuHCl Konzentration von 3 M oder mehr reversibel. Bei 2 M wurde eine Reversibilität bis 70 °C festgestellt. In Abwesenheit von Ca²⁺ und GuHCl waren die Messkurven für GCAP-2 nur bis 50 °C reversibel.

Zur Auswertung der Daten wurde das Messsignal in molare Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet.

Die gemessenen Kurven wurden global über alle GuHCl Konzentrationen nach einem Zwei-Zustands-Modell gefittet. Dazu wurde angenommen, dass die Änderung der Wärmekapazität

$\Delta C_{p,U}$ zwischen nativem und denaturiertem Zustand unabhängig von der Temperatur ist. Die Änderung des intrinsischen fern-UV CD-Signals des nativen und denaturierten Zustands wurde als lineare Funktion der Temperatur angenommen. Die Änderung der Enthalpie der Faltung/Entfaltung, ΔH_U , die Änderung der Entropie der Faltung/Entfaltung, ΔS_U und die Änderung von $\Delta C_{p,U}$ wurden als lineare Funktion der GuHCl Konzentration angenommen [131].

Die vollständige Gleichung, sowie die verwendeten Startparameter sind im Anhang zu finden.

2.2.9 Bestimmung der hydrophoben Oberfläche mit ANS

Zunächst wurde eine Titration von ANS bei einer konstanten GCAP-2 Konzentration vorgenommen, um die benötigte Menge an ANS zur Sättigung der hydrophoben Oberfläche des Proteins zu ermitteln. Dazu wurden 2,14 myr-GCAP-2 bzw. non-myr-GCAP-2 in ANS-Mg-Ca-Puffer mit 0-200 μM ANS versetzt. Die Anwesenheit von 1 M GuHCl war erforderlich, um zu gewährleisten, dass GCAP-2 unter allen Bedingungen als Monomer vorliegt. In einer Halbmikroküvette wurde die jeweilige Probe bei 350 nm angeregt und das Fluoreszenzemissionsspektrum von 400-550 nm aufgenommen und 2-mal akkumuliert. Das Signal bei 479 nm wurde zur Auswertung verwendet.

Zum Vergleich der hydrophoben Oberfläche zwischen myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 unter verschiedenen Bedingungen wurden 2,14 μM GCAP-2 mit 173 μM ANS in ANS+Mg+Ca-Puffer, ANS+Mg-Ca-Puffer, ANS-Mg+Ca-Puffer und ANS-Mg-Ca-Puffer inkubiert. In einer Halbmikroküvette wurde die jeweilige Probe bei 350 nm angeregt und das Fluoreszenzemissionsspektrum von 400-550 nm aufgenommen und 2-mal akkumuliert. Die gemessenen Signale bei 479 nm aus Dreifachbestimmungen wurden gemittelt. Diese Werte wurden für die Auswertung verwendet.

Puffer und Lösungen

ANS+Mg+Ca-Puffer (1 M GuHCl; 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM CaCl_2 ; pH 7,0)

ANS+Mg-Ca-Puffer (1 M GuHCl; 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM EGTA; pH 7,0)

ANS-Mg+Ca-Puffer (1 M GuHCl; 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 1 mM CaCl_2 ; pH 7,0)

ANS-Mg-Ca-Puffer (1 M GuHCl; 100 mM Cacodylat/KOH; 40 mM KCl; 1 mM EGTA; pH 7,0)

2.2.10 Bestimmung zugänglicher Thiol-Gruppen von GCAP-2

2.2.10.1 Bestimmung zugänglicher Thiol-Gruppen mittels DTNB

Myr-GCAP-2 und thio-GCAP-2 wurden gegen 100 mM MOPS; 40 mM KCl; pH 7,0 dialysiert. Das Protein wurde auf 10,2 μ M in Thiol-Mg-Ca-Puffer, Thiol-Mg+Ca-Puffer, Thiol+Mg-Ca-Puffer oder Thiol+Mg+Ca-Puffer verdünnt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μ M DTNB aus einer 12,5 mM Stammlösung gestartet. Dadurch befanden sich 10 μ M GCAP-2 im Ansatz. Die Umsatzkinetik wurde bei 412 nm in einer rührbaren 10 mm Küvette verfolgt. Nach ca. 2-3 min, bzw. 25 min wurde der Ansatz im Thiol-Mg-Ca-Puffer bzw. Thiol+Mg-Ca-Puffer mit 2 mM CaCl_2 aus einer 100 mM Stammlösung versetzt. Alternativ wurde der Ansatz im Thiol-Mg+Ca-Puffer bzw. Thiol+Mg+Ca-Puffer mit 2 mM EGTA aus einer 100 mM Stammlösung versetzt. Die Kinetik wurde mindestens 2 min weiter verfolgt.

Puffer und Lösungen

Thiol-Mg-Ca-Puffer (100 mM MOPS; 40 mM KCl; 125 μ M EGTA; pH 7,0)

Thiol-Mg+Ca-Puffer (100 mM MOPS; 40 mM KCl; 125 μ M CaCl_2 ; pH 7,0)

Thiol+Mg-Ca-Puffer (100 mM MOPS; 40 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 125 μ M EGTA; pH 7,0)

Thiol+Mg+Ca-Puffer (100 mM MOPS; 40 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 125 μ M CaCl_2 ; pH 7,0)

2.2.10.2 Bestimmung zugänglicher Thiol-Gruppen durch Modifikation und massenspektrometrischer Analyse

In Thiol+Mg-Ca-Puffer bzw. Thiol+Mg+Ca-Puffer wurden 10 μ M myr-GCAP-2 bzw. thio-GCAP-2 mit 4 mM IAA inkubiert. Sofort nach Beginn der Reaktion wurden 20 μ l Probe entnommen und mit 0,4 % (v/v) TFA abgestoppt. Nach 3, 6 und 9 min wurden ebenfalls 20 μ l Probe entnommen und mit 0,4 % (v/v) TFA abgestoppt. Dann wurde die Hälfte des Ansatzes mit 2 mM EGTA aus einer 100 mM Stammlösung versetzt. Aus dem nun aufgeteilten Ansatz wurden nach weiteren 3, 6 und 9 min jeweils 20 μ l Probe entnommen und mit 0,4 % (v/v) TFA abgestoppt. Die Proben wurden mit 30 μ l Pepsinlösung (10 μ g/ml) versetzt und für 30 min bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde mit einem Überschuss an Pepstatin abgestoppt. Die verdauten Proben wurden per LC-MS analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Proteinexpression, Isolierung von *inclusion bodies* und Rückfaltung

Für die geplanten Untersuchungen war es erforderlich, GCAP-2 in Milligramm-Mengen herzustellen. Dazu wurde GCAP-2 heterolog in *E. coli* exprimiert. Eine solche Expression resultierte in nicht-myristoyliertem GCAP-2 (non-myr-GCAP-2). Die Myristoylierung von GCAP-2 wurde durch Koexpression mit N-Myristoyltransferase 1 (NMT1) aus *S. cerevisiae* erzielt [122]. Die NMT1 bezieht ihr Substrat aus dem Myristoyl-CoA-Vorrat der Zelle. Dieser Vorrat konnte durch externe Zugabe von Myristinsäure vergrößert werden. Alternativ wurde das Kulturmedium mit deuterierter Myristinsäure versetzt, um deren Einbau zu bewirken. So konnte mit deuterierter Myristinsäure modifiziertes GCAP-2 exprimiert werden (myr-*d*₂₇-GCAP-2). NMT1 besitzt eine gewisse Flexibilität bezüglich ihres Fettsäuresubstrats [28]. Dies ermöglichte die Expression von mit ω -Mercaptododecansäure modifiziertem GCAP-2 (thio-GCAP). Die Expression von myristoyliertem GCAP-2 (myr-GCAP-2) war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erforderlich, da hier noch genügend Biomasse aus der Diplomarbeit [132] vorhanden war. Für alle anderen Varianten sind die Ausbeuten in Tabelle 3.1 angegeben.

Da GCAP-2 unlöslich exprimiert wurde, wurde eine *inclusion-body*-Präparation durchgeführt. Die aus der Biomasse erhaltene Menge an *inclusion bodies* sind in Tabelle 3.1 angegeben. Die *inclusion bodies* wurden solubilisiert und zurückgefaltet. Dabei wurden Rückfaltungsausbeuten von 40 bis 60 % Gesamtprotein erzielt.

Tabelle 3.1: Ausbeuten an Biomasse und die erhaltene Menge an *inclusion bodies* der Expression im Schüttelkolben. Der Erfolg der Koexpression ist durch Angabe der per Massenspektrometrie bestimmten Masse dokumentiert.

<i>Exprimiertes Protein</i>	<i>Ausbeute Biomasse (g/l)</i>	<i>Ausbeute inclusion bodies (g/l)</i>
non-myr-GCAP-2	2,4-3,6 g	0,32-0,48
thio-GCAP-2	1,6-3,2 g	0,1-0,48
myr- <i>d</i> ₂₇ -GCAP-2	1,6-2,4 g	0,1-0,32

3.2 Proteinreinigung

Lösliches Protein nach Rückfaltung bestand zu ca. 75 % aus GCAP-2 (siehe [132]). Daher mussten die verbleibenden Verunreinigungen chromatographisch abgetrennt werden. Die

Reinigung von non-myr-GCAP-2 und myr-*d*₂₇-GCAP-2 erfolgte wie in der Diplomarbeit [132] beschrieben.

Auf diese Weise konnte der unmyristoylierte Anteil von GCAP-2 nicht abgereichert werden. Bei Expression im Schüttelkolben betrug der Anteil an non-myr-GCAP-2 ca. 10 % (nicht gezeigt), bei Verwendung der in einer Fermentation gewonnenen Biomasse betrug er ca. 20 % (Abbildung 3.1 A).

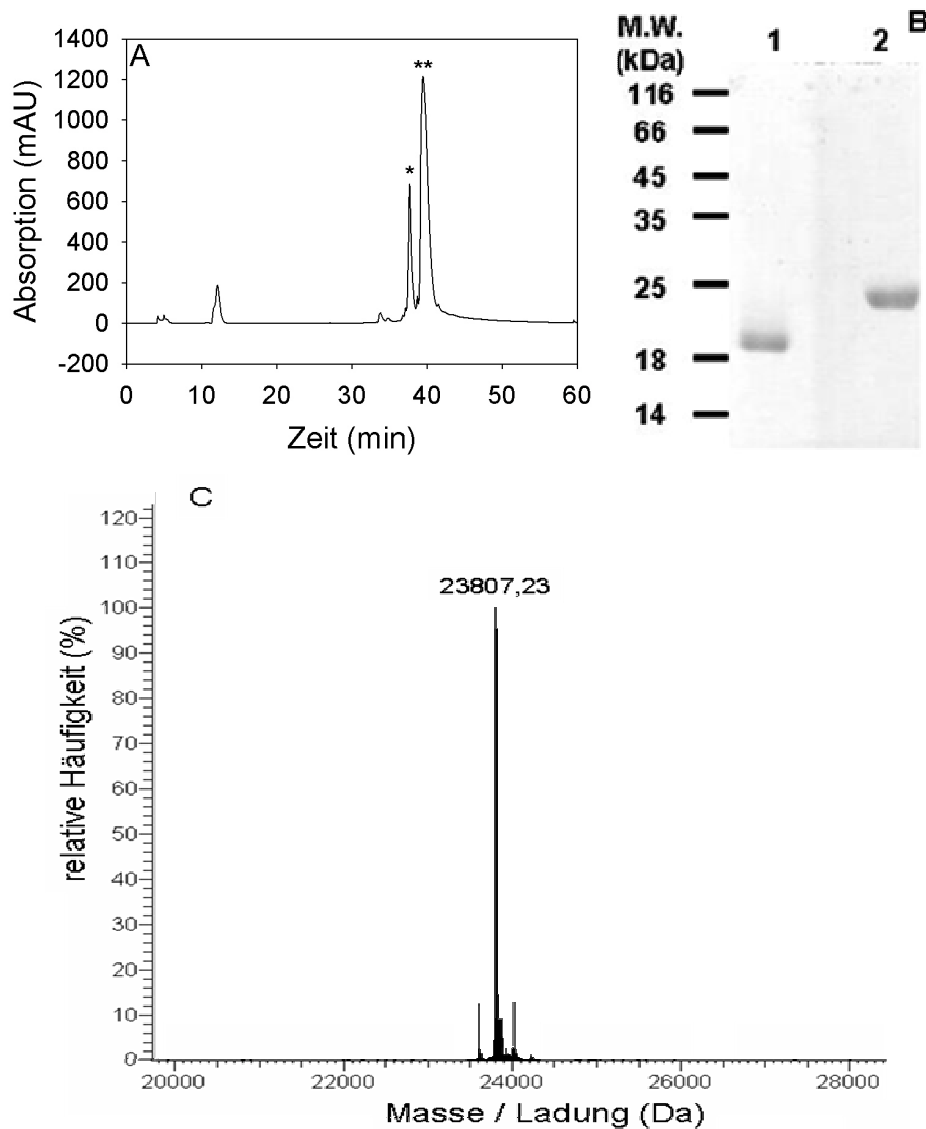


Abbildung 3.1: Ergebnis der Reinigung von myr-GCAP-2. (A) Myr-GCAP-2 wurde nach Ionenaustauschchromatographie auf eine *reversed phase* C18 Säule gebunden und in einem linearen Gradienten eluiert. Die Peaks wurden anhand ihrer Masse zugeordnet. Der Peak bei 37,6 min (*) entspricht non-myr-GCAP-2. Bei 39,4 min (**) eluierte myr-GCAP-2. (B) Gereinigtes und erneut zurückgefaltetes myr-GCAP-2 wurde in An- (1) und Abwesenheit (2) von Ca^{2+} einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel wurde mit Coomassie-Brillant-Blau G-250 gefärbt. (C) Massenspektrometrische Analyse des gereinigten myr-GCAP-2 mittels ESI-Orbitrap.

Durch Modifikation eines Protokolls nach Hwang & Koch, die einen ähnlichen Anteil von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 beobachteten [118], wurde die Reinigung von myr-GCAP-2 etabliert. Das mittels Ionenaustauschchromatographie vorgereinigte GCAP-2, das sowohl myr-GCAP-2 als auch non-myr-GCAP-2 enthielt, wurde auf eine präparative *reversed phase* C18 Säule aufgetragen. In einem Gradienten von 1 % Acetonitril auf 61,4 % Acetonitril über 35 min konnten die beiden Spezies aufgetrennt (Abbildung 3.1 A) werden. Die zwei dominantesten Peaks wurden gesammelt. Anhand des Molekulargewichts des darin enthaltenen Proteins konnten non-myr-GCAP-2 und myr-GCAP-2 in den einzelnen Peaks identifiziert werden. Durch anschließendes Abdampfen des Lösungsmittels, Solubilisierung und erneute Rückfaltung, wurde zu >98 % homogenes myr-GCAP-2 erhalten. Der Erfolg der Reinigung wird in Abbildung 3.1 B gezeigt. Dabei migriert das Ca^{2+} -gebundene myr-GCAP-2 weiter im Gel als das Ca^{2+} freie myr-GCAP-2. Dies deutet auf eine funktionierende Ca^{2+} -Bindung und damit auf die korrekte Faltung von myr-GCAP-2.

Das korrekte Molekulargewicht wurde massenspektrometrisch bestimmt (Abbildung 3.1 C).

Auf diese Weise konnten 0,8-2,3 mg myr-GCAP-2 pro 1 g Biofeuchtmasse gewonnen werden.

3.3 Charakterisierung von GCAP-2

GCAP-2 wurde zu mehr als 95 % rein erhalten. Anschließend musste untersucht werden, ob das Protein auch korrekt gefaltet und in der Lage war, seine biologischen Funktion, die Regulation der ROS-GC, zu erfüllen.

3.3.1 Spektroskopische Eigenschaften

Um den Sekundärstrukturanteil abzuschätzen, wurden in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} fern-UV-CD-Spektren aufgenommen. Am Beispiel von myr-GCAP-2 sind solche Spektren in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} gezeigt. Durch Bindung von Ca^{2+} vergrößerte sich die Amplitude im Minimum bei 222 nm von -14700 auf -16200 $\text{deg cm}^2\text{dmol}^{-1}$. Diese Veränderung um ca. 9 % deutet auf eine Erhöhung des Anteils an α -Helix hin. Dennoch wurde auch in Abwesenheit von Ca^{2+} ein α -Helix dominiertes Spektrum gemessen.

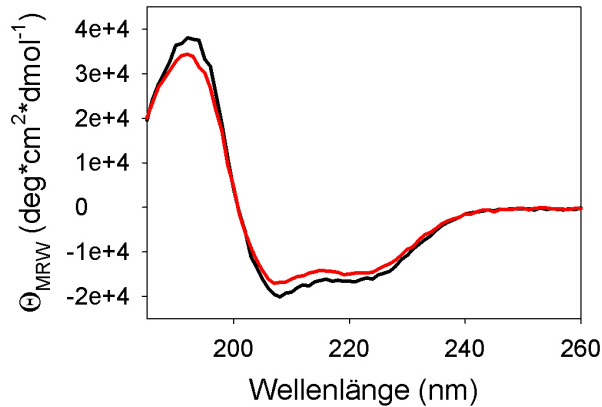


Abbildung 3.2: Typische fern-UV CD-Spektren von myr-GCAP-2 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} . Von 0,75 mg/ml myr-GCAP-2 in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 wurde ein CD-Spektrum aufgenommen und anschließend das Spektrum des Puffers korrigiert. Die Probe mit Ca^{2+} (schwarz) enthielt zusätzlich 1 mM CaCl_2 , die Probe ohne Ca^{2+} (rot) enthielt zusätzlich 1 mM EGTA.

Die Spektren wurden mittels CD-Pro und den drei darin implementierten Algorithmen (CONTINLL, SELCON3 und CDSSTR) [133] auf ihre Sekundärstrukturzusammensetzung untersucht. Dabei ergab sich ein α -Helix-Anteil von 58,4 % (CONTINLL), 61,6 % (SELCON3) bzw. 63,2 % (CDSSTR) in Anwesenheit von Ca^{2+} . In Abwesenheit von Ca^{2+} war dieser Anteil kleiner. Es wurden 53,9 % (CONTINLL), 55,4 % (SELCON3) und 56,9 % (CDSSTR) bestimmt.

3.3.2 Oligomerisierungszustand

Für die geplante Bestimmung der thermodynamischen Stabilität war es notwendig zu klären, ob das Protein oligomerisiert vorlag. In Anwesenheit von Ca^{2+} ist GCAP-2 als Monomer beschrieben. In Abwesenheit von Ca^{2+} allerdings wurden Oligomere beobachtet [105;113].

Dr. habil. Hauke Lilie führte mit myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 Gleichgewichts-Ultrazentrifugations-Experimente in Abwesenheit von Ca^{2+} durch. Die dabei bestimmten apparenten Molekulargewichte werden in Tabelle 3.2 dargestellt. In Abwesenheit von GuHCl wurde ein leicht vergrößertes apparentes Molekulargewicht bestimmt, das 2,7 bis 5,4 kDa größer war, als das für ein Monomer erwartete Molekulargewicht von 23,8 kDa. Dennoch war es deutlich kleiner, als für ein Dimer erwartet. Durch Zugabe von 1 M GuHCl wurde die Assoziation von GCAP-2 zu Oligomeren vollständig unterdrückt. Eine Ausnahme stellte non-myr-GCAP-2 in Anwesenheit von Mg^{2+} dar. In Abwesenheit von GuHCl wurde ein apparentes Molekulargewicht von 83 kDa bestimmt. Das entspricht der Größe eines Trimers bzw. Tetramers. Auch durch Zugabe von 1 M GuHCl konnten die Oligomere nicht

vollständig dissoziiert werden. Erst Zugabe von 1,25 M GuHCl führte zu einer vollständigen Dissoziation.

Tabelle 3.2: Apparentes Molekulargewicht aus den Gleichgewichts-Ultrazentrifugations-Experimenten in Abwesenheit von Ca^{2+}

[GuHCl] (M)	<i>non-myr-GCAP-2</i> - Mg^{2+} (kDa)	<i>myr-GCAP-2</i> - Mg^{2+} (kDa)	<i>non-myr-GCAP-2</i> + Mg^{2+} (kDa)	<i>myr-GCAP-2</i> + Mg^{2+} (kDa)
0	28,7	26,5	83	29,9
1	24,0	24,0	29,0	24,3
1,25	23,3	22,5	22,5	--

3.3.3 Aktivitätstest

Das hergestellte GCAP-2 war homogen und hatte biophysikalische Eigenschaften, wie sie bereits in der Literatur beschrieben sind [98;99]. Zur Kontrolle der Funktionalität von GCAP-2 wurde überprüft, ob es rekombinant hergestellte ROS-GC1 Ca^{2+} -abhängig zu modulieren vermochte. Die Etablierung der transienten Expression von ROS-GC1 in HEK293 wird im Kapitel 2.2.6.2 beschrieben.

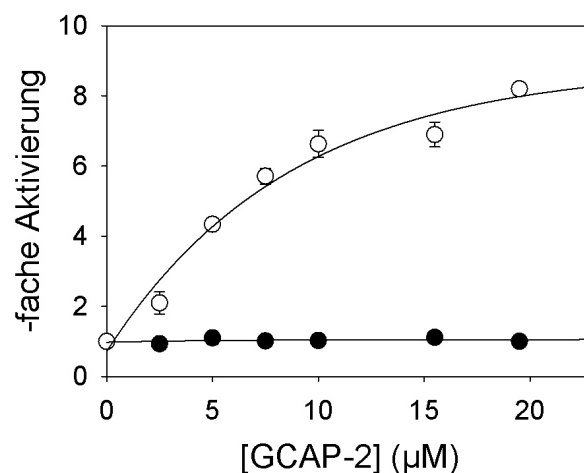


Abbildung 3.3: Aktivitätstest von myr-GCAP-2. In HEK293 exprimierte ROS-GC1 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von myr-GCAP-2 in An- (●) und Abwesenheit (○) von Ca^{2+} inkubiert. Die gebildete Menge cGMP wurde mittels rpHPLC quantifiziert und auf die Menge an gebildetem cGMP in Abwesenheit von myr-GCAP-2 normiert.

Unterschiedliche Mengen GCAP-2 wurden in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mit rekombinanter ROS-GC1 inkubiert und die produzierte Menge cGMP quantifiziert. In

Abwesenheit von Ca^{2+} wurde eine ca. 8-fache Steigerung der Basalaktivität gemessen, wenn GCAP-2 anwesend war. Dabei war bei einer Konzentration von ca. $5 \mu\text{M}$ GCAP-2 die halbmaximale Aktivierung erreicht. In Anwesenheit von Ca^{2+} wurde keine signifikante Modulation der Basalaktivität gemessen.

3.4 Membranbindung von GCAP-2

Da die häufigste Rolle der Lipidmodifikation von Proteinen die Vermittlung einer Membranbindung ist, wurde diese Möglichkeit ausführlicher untersucht. Dazu wurde sowohl myr-GCAP-2 als auch non-myr-GCAP-2 mit Lipidvesikeln inkubiert. Die verwendeten Lipide waren entweder DMPC oder ein physiologischeres Lipidgemisch, das der Membran der Retina ähneln sollte (Retina-Mix). Der Retina-Mix bestand zu 95 % aus Palmitoyl-Oleoyl-Lipiden (PO-Lipide) und 5 % Cholesterin. Die Kopfgruppen der PO-Lipide wurden entsprechend ihrer Häufigkeit in der Retina gewählt [134]. Der Anteil an Phosphatidylcholin (PC) im Retina-Mix betrug 40 %, der an Phosphatidylethanolamin (PE) 40 % und der an Phosphatidylserin (PS) 15 %.

3.4.1 Bindung an LUVs

Um den Einfluss der Myristoylierung auf die Membranbindung von GCAP-2 zu untersuchen, wurde die Bindung von myr-GCAP-2 bzw. non-myr-GCAP-2 an Modellmembranen untersucht. Als Modellmembranen dienten unilamellare Lipidvesikel (LUV). Diese LUVs hatten einen Durchmesser von 100 nm. Die LUVs bestanden entweder aus DMPC oder dem Retina-Mix. Das molare Verhältnis von Protein zu Lipiden war 1:300.

In Abbildung 3.4 wird der Anteil an gebundenem Protein gezeigt. In Abwesenheit von Ca^{2+} lagen ca. 38 % des non-myr-GCAP-2 an DMPC-LUVs gebunden vor. Myr-GCAP-2 band unter gleichen Bedingungen mit ca. 44 %. Bei Anwesenheit von Ca^{2+} war die Bindung signifikant kleiner. Nur noch 17 % des non-myr-GCAP-2 bzw. 20 % des myr-GCAP-2 waren an die DMPC-LUVs in Gegenwart von 1 mM CaCl_2 gebunden. Etwas geringere Bindungen wurden bei Inkubation mit dem Retina-Mix erhalten. Ca. 32 % des non-myr-GCAP-2 und 29 % des myr-GCAP-2 banden in Abwesenheit von Ca^{2+} an die LUVs. Bei Anwesenheit von Ca^{2+} reduzierte sich die Bindungsausbeute auf 10 % für non-myr-GCAP-2 und auf 9 % für myr-GCAP-2.

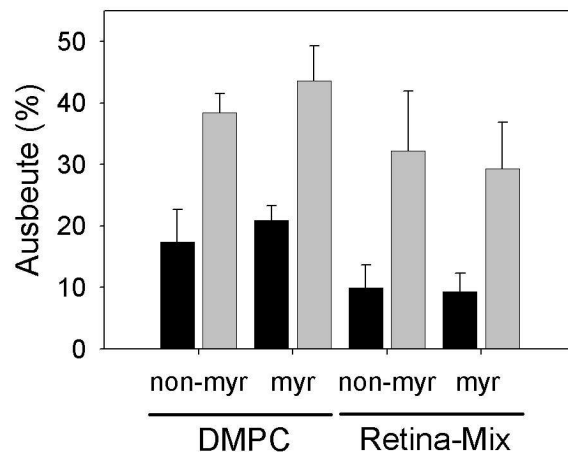


Abbildung 3.4: Bindungsausbeuten von GCAP-2 an DMPC- und Retina-Mix-LUVs. Myr-GCAP-2 (myr) bzw. non-myr-GCAP-2 (non-myr) wurde in An- (schwarze Balken) und Abwesenheit (graue Balken) von Ca^{2+} mit Liposomen bestehend aus DMPC oder POPC/POPE/POPS/Cholesterin im molaren Verhältnis von 40/40/15/5 (Retina-Mix) gemischt. GCAP-2 und die Liposomen wurden für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Bindungsausbeuten wurden per SDS-PAGE quantifiziert. Werte und Fehler wurden anhand von Mittelwerten zweier unabhängiger Experimente erstellt.

3.4.2 Bindung an LUVs mit verschiedenen Anteilen an POPS

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Myristoylgruppe keinen signifikanten Beitrag zur Membranbindung leistet, wurde untersucht, ob eventuell eine elektrostatische Bindung positiv geladener Bereiche auf der Proteinoberfläche an negativ geladene Kopfgruppen der Membran die Bindung von GCAP-2 an LUVs bewirkt.

Dazu wurden LUVs mit verschiedenen hohen Anteilen POPS, das netto negativ geladen ist, hergestellt. Die Konzentration an Cholesterin wurde konstant gehalten und der Anteil an POPC und POPE im gleichen Maße verändert.

Die Ausbeute an gebundenem GCAP-2 ließ sich durch Konzentrationserhöhung der negativ geladenen Kopfgruppen nicht erhöhen. Abgeschätzt ergab sich ein Anteil von ca. 40 % gebundenem GCAP-2 im Ca^{2+} -freien Zustand (siehe Abbildung 3.5). In Anwesenheit von Ca^{2+} veränderte sich die Bindung durch Erhöhung der POPS Konzentration ebenfalls nicht und blieb konstant bei ca. 10 %. Auch die Verwendung von myr-GCAP-2 bzw. non-myr-GCAP-2 beeinflusste die Bindung nicht. Die Bindungsausbeuten sind mit denen in Kapitel 3.4.1 vergleichbar. Ein elektrostatischer Bindungsmechanismus von GCAP-2 ist daher unwahrscheinlich.

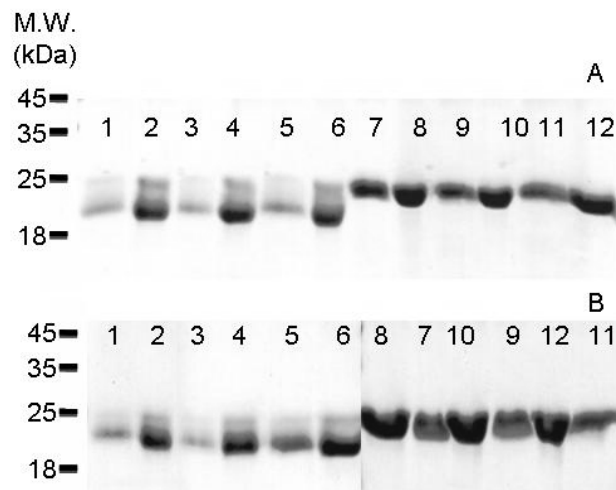


Abbildung 3.5: An LUVs gebundenes und ungebundenes GCAP-2. Coomassie-Brillant-Blau G-250 gefärbtes 15 %iges Acrylamidgel nach SDS-PAGE. Je 0,5 mg/ml (A) myr-GCAP-2 und (B) non-myr-GCAP-2 wurden mit 5 mg/ml LUVs 4 h bei 30 °C in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ (1-6) und Abwesenheit (7-12) von Ca²⁺ inkubiert. Die Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11 enthalten das Pellet nach 20-minütiger Zentrifugation bei 100000 g, die Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12 den Überstand. Die Zusammensetzung der LUVs aus POPC/POPE/POPS/Cholesterin war in den Spuren 1, 2, 7 und 8 jeweils 47,5:47,5:0:5, in den Spuren 3, 4, 9 und 10 jeweils 40:40:15:5 und in den Spuren 5, 6, 11 und 12 jeweils 32,5:32,5:30:5.

3.4.3 Festkörper-NMR

GCAP-2 bindet an Membranen, aber die Myristoylgruppe scheint zu dieser Bindung keinen Beitrag zu leisten. Dennoch wäre interessant zu erfahren, ob die Myristoylgruppe in der Membran vorliegt, wenn GCAP-2 an die LUVs gebunden ist. Dazu wurde myr-*d*₂₇-GCAP-2 mit LUVs inkubiert. Die Liposomen und daran gebundenes myr-*d*₂₇-GCAP-2 wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert. Ein Festkörper-²H Spektrum wurde aufgenommen. Sowohl die Bindung als auch die Messung wurden bei 30 °C durchgeführt. Die Membranlipide sollten dann in der flüssig ungeordneten Phase vorliegen (*L*_α). Ein solches Festkörper-²H Spektrum ist in Abbildung 3.6 A dargestellt. Lediglich die Myristoylgruppe von GCAP-2 trägt ²H. Damit repräsentieren alle Signale lediglich die Beweglichkeit der Myristoylgruppe. Ist die Myristoylgruppe im LUV verankert, bewegen sich die ²H langsam. Dadurch wird eine Quadrupolaufspaltung verursacht, die umso stärker ist, je weniger beweglich die Kohlenstoffposition mit den daran gebundenen ²H ist. Eine Quadrupolaufspaltung zwischen -15 und 15 kHz wurde für die ²H der Myristoylgruppe gemessen. Auch zeigt das Spektrum ein isotropes Signal bei 0 kHz. Aufgrund von schnellen Bewegungen der ²H mitteln sich die Signale aus. Deshalb wird für hoch flexible Kohlenstoffpositionen keine

Quadrupolaufspaltung für die daran gebundenen ^2H gemessen. Da sowohl ein isotropes Signal als auch eine Quadrupolaufspaltung beobachtet wurde, bedeutet das, dass sowohl frei bewegliche, nicht membrangebundenen Myristoylgruppen als auch in der Membran verankerte Myristoylgruppen vorliegen. Die Existenz von frei beweglichen Myristoylgruppen deutet darauf hin, dass nicht alle Myristoylgruppen von membrangebundenem GCAP-2 in den LUVs verankert sind.

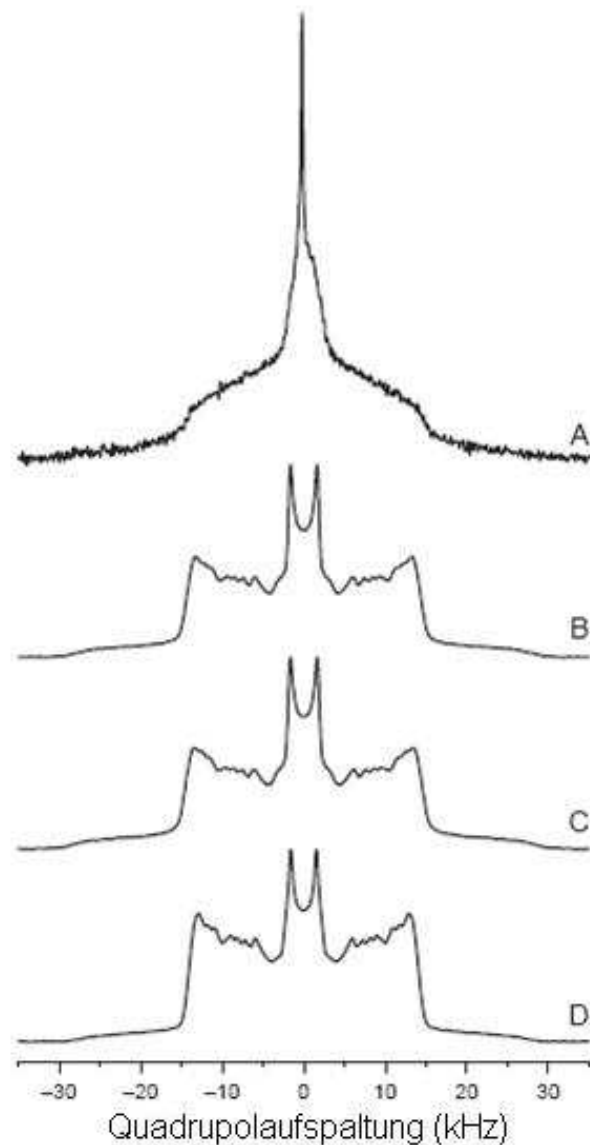


Abbildung 3.6: Festkörper- ^2H -NMR-Spektrum von (A) DMPC/myr- d_{27} -GCAP-2, (B) DMPC- d_{54} /myr-GCAP-2, (C) DMPC- d_{54} /non-myr-GCAP-2, and (D) DMPC- d_{54} in der $L\alpha$ Phase aufgenommen bei 30 °C. Die Probe enthielt 50 % (w/v) Puffer (100 mM MOPS/KOH, 40 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, pH 7,0).

Alternativ könnte dieses Signal durch die deuterierten Myristoylgruppen ungebundenen Proteins hervorgerufen worden sein. Zum Vergleich werden in Abbildung 3.6 die Festkörper- ^2H Spektren für deuterierte DMPC-LUVs gezeigt, an denen entweder myr-GCAP-2 (B), non-myr-GCAP-2 (C), oder der LUVs alleine (D) gezeigt sind. Diesen drei Spektren waren nicht von einem isotropen Signal überlagert. Sowohl das Signal der Membranlipide als auch das Signal der Myristoylgruppe zeigten eine Quadrupolaufspaltung von -15 – 15 kHz. Da die gleiche Breite der Spektren für die Membranlipide als auch für die deuterierte Myristoylgruppe bestimmt wurde, kann von einer vollständigen Insertion letzterer in die Membran ausgegangen werden.

Nimmt man eine zunehmende Beweglichkeit hin zum ω -Ende der Acylreste an und ordnet die zu erwartende Fläche den ^2H der jeweiligen Kohlenstoffposition (i) zu, kann man aus der zugehörigen Quadrupolaufspaltung einen Ordnungsparameter bestimmen. Dabei steht ein Ordnungsparameter von 1 für maximale Rigidität. Null dagegen repräsentiert isotrope Bewegung. Da es sich bei dem Acylrest am Protein und denen des LUV beide Male um Myristoylreste handelt, erhielt man sehr ähnliche Ordnungsparameter. Die Ordnungsparameter der Membranlipide erhöhten sich geringfügig durch Bindung von GCAP-2. Dabei war kein Unterschied durch Bindung von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 zu erkennen. Die Myristoylkette des Proteins dagegen unterschied sich vor allem zwischen den Kohlenstoffpositionen 5 und 12 von den Membranlipiden. Ein geringerer Ordnungsparameter wurde hier beobachtet.

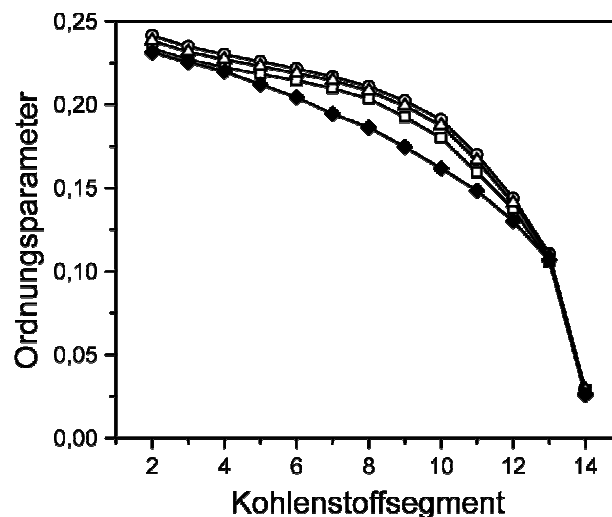


Abbildung 3.7: Ordnungsparameter und Kettenausdehnung als Funktion der Kohlenstoffposition, die anhand der Festkörper ^2H Spektren berechnet wurden. (A) zeigt die erhaltenen Ordnungsparameter für DMPC- d_{54} (\square), DMPC- d_{54} /non-myr-GCAP-2 (\circ), DMPC- d_{54} /myr-GCAP-2 (Δ), and DMPC/myr- d_{27} -GCAP-2 (\blacklozenge).

Anstelle der artifiziellen DMPC-LUVs wurde anschließend eine physiologischere Membranzusammensetzung gewählt. GCAP-2 wurde an LUVs bestehend aus dem Retina-Mix gebunden. Anschließend wurden die Liposomen und das daran gebundene myr- d_{27} -GCAP-2 mittels Ultrazentrifugation separiert und ein Festkörper- ^2H -NMR-Spektrum aufgenommen. In Abbildung 3.8 A wird ein solches Festkörper- ^2H -NMR-Spektrum gezeigt. Zusätzlich sind die Festkörper- ^2H -NMR-Spektren von deuterierten Retina-Mix-LUVs gezeigt. Dabei wurde myr-GCAP-2 an Retina-Mix-LUVs gebunden, die entweder deuteriertes POPC (B), POPE (C) oder POPS (D) enthielten. Die Festkörper- ^2H -NMR-Spektren B-D unterscheiden sich kaum für die einzelnen Lipide. Sie zeigten eine Quadrupolaufspaltung von -18-18 kHz. Obwohl die Membranlipide eine ungesättigte Komponente enthielten, die zu größerer Flexibilität und damit zu geringeren Ordnungsparametern führten, waren die Spektren etwas breiter als die mit DMPC-LUVs gemessenen. Dies liegt am Cholesterinanteil im Retina-Mix, der die Membran starrer macht.

Das Festkörper- ^2H -NMR-Spektrum der deuterierten Myristoylgruppe von GCAP-2 dagegen war schmaler. Lediglich eine Quadrupolaufspaltung von ca. -15-15 kHz wurde hier bestimmt, während die Membranlipide der LUVs ein etwas breiteres Spektrum von ca. -18-18 kHz zeigten. Auch hier wurde ein isotropes Signal ermittelt, obwohl ein großer Teil der Lipidmodifikation vollständig in der Membran verankert war. Damit ergab sich für myr- d_{27} -GCAP-2, gebunden an Retina-Mix-LUVs, ein ähnliches Festkörper- ^2H -NMR-Spektrum, wie für an DMPC-LUVs gebundenes.

Unabhängig von den verwendeten Membranlipiden wurden also sowohl frei bewegliche als auch vollständig in der Membran der LUVs verankerte Myristoylgruppen nachgewiesen.

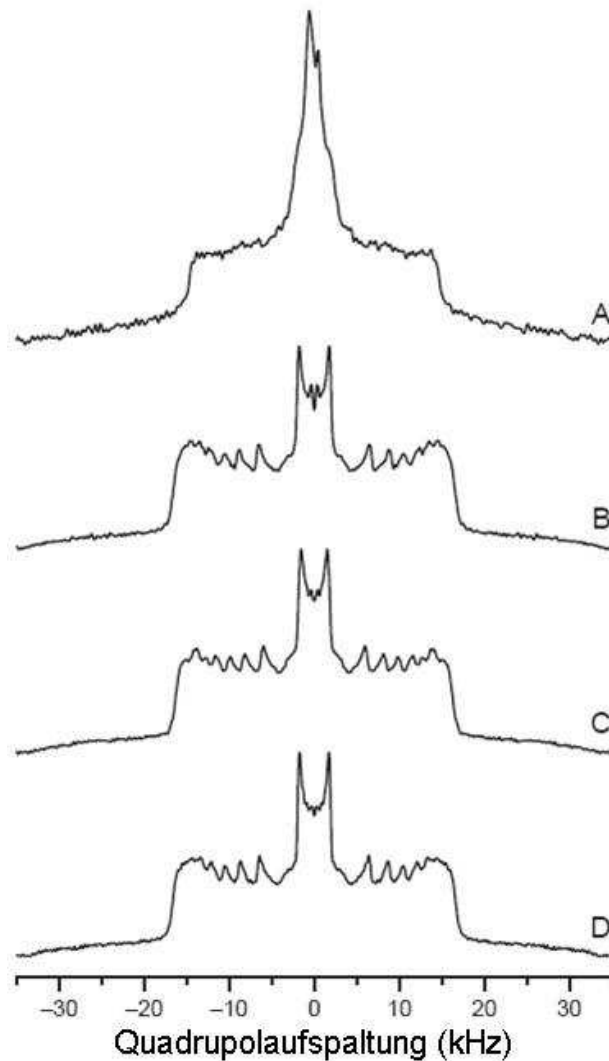


Abbildung 3.8: Festkörper- ^2H -NMR-Spektrum von (A) POPC/POPE/POPS/Cholesterin/myr- d_{27} -GCAP-2, (B) POPC/POPE/POPS- d_{31} /Cholesterin/myr-GCAP-2, (C) POPC/POPE- d_{31} /POPS/Cholesterin/myr-GCAP-2 und (D) POPC- d_{31} /POPE/POPS/Cholesterin/myr-GCAP-2, $L\alpha$ Phase, aufgenommen bei 30 °C. Die Probe enthielt 50 % (w/v) Puffer (100 mM MOPS/KOH, 40 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, pH 7,0). Die Lipide waren in einem molaren Verhältnis von 40:40:15:5 gemischt.

Die aus den Spektren resultierenden Ordnungsparameter zeigten, dass die Myristoylkette des Proteins beweglicher war, als die Acylketten der Membranlipide. Verglichen mit den Ordnungsparametern von myr- d_{27} -GCAP-2 gebunden an DMPC-LUVs wurden nahezu identische Werte erhalten.

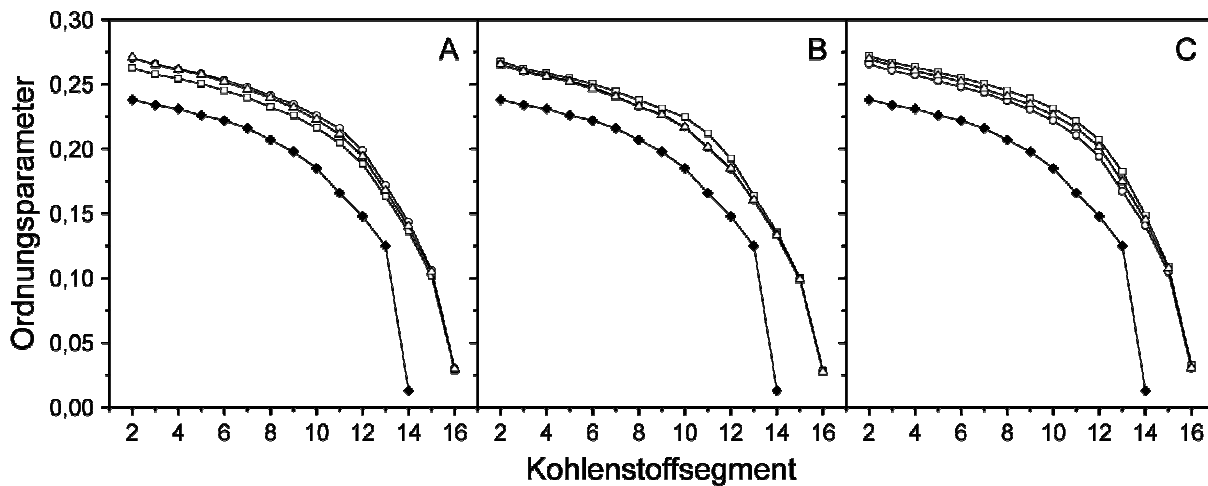


Abbildung 3.9: Ordnungsparameter und Kettenausdehnung, die anhand der Festkörper-²H-Spektren berechnet wurden, als Funktion der Kohlenstoffposition. (A) zeigt die erhaltenen Ordnungsparameter für POPC-*d*₃₁/POPE/POPS/Cholesterin, (B) für POPC/POPE-*d*₃₁/POPS/Cholesterin und (C) für POPC/POPE/POPS-*d*₃₁/Cholesterin jeweils im molaren Verhältnis von 40:40:15:5. Die Ordnungsparameter für den jeweiligen Retina-Mix ohne Protein (□), für den Retina-Mix/non-myr-GCAP-2 (○), für Retina-Mix/myr-GCAP-2 (Δ) und den ungelabelten Retina-Mix/myr-*d*₂₇-GCAP (◆) sind gezeigt.

Die einzelnen Lipide der Retina-Mix-LUVs zeigten einen höheren Ordnungsparameter (siehe Abbildung 3.9) als die der DMPC-LUVs. Alle zeigten aber nahezu identische Ordnungsparameter, was auf eine ideale Mischung der einzelnen Lipide hindeutet. Die Ordnungsparameter wurden durch die Bindung von GCAP-2 wenig beeinflusst. Für POPC erhöhten sie sich nach der Bindung von GCAP-2. Die Ordnungsparameter von POPE und POPS verringerten sich. Der Einfluss von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 war identisch für POPC und POPE. Die Ordnungsparameter von POPS wurden durch myr-GCAP-2 weniger stark reduziert als durch non-myr-GCAP-2. Alle Unterschiede waren sehr gering und nahe am Auflösungsvermögen des Experiments. Eine bevorzugte Bindung an eine der Membrankomponenten, wie POPS, oder gar eine Entmischung der Membran wurde nicht festgestellt. Hervorzuheben ist, dass auch das netto negativ geladene POPS keine große Änderung des Ordnungsparameters zeigte, was die bisherigen Beobachtungen bestätigt, dass es vermutlich keine Rolle bei der Bindung von GCAP-2 spielt.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Myristoylierung keinen Einfluss auf die Stärke der Membranbindung von GCAP-2 hat. Die Bindung wurde durch die N-terminale Acylierung nicht signifikant beeinflusst. Auch ändern sich die Ordnungsparameter der

Membranlipide durch Bindung von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 im gleichen Maße. Dennoch liegt ein Anteil der Myristoylgruppen vollständig in der Membran verankert vor. Gleichzeitig konnten keine Hinweise gefunden werden, die auf einen Bindungsmechanismus über eine Ansammlung positiv geladener Reste auf der Oberfläche von GCAP-2 (basisches Cluster) deuten. Das legt den Schluss nahe, dass die Bindung hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt wird.

3.5 Einfluss der Myristoylgruppe auf die Stabilität

Da der Myristoylierung kein signifikanter Beitrag zur Membranbindung zugeordnet werden konnte, kam eine strukturelle Bedeutung in Frage, wie sie für GCAP-1 zumindest in Anwesenheit von Ca^{2+} nachgewiesen wurde [97]. Um eine solche strukturelle Bedeutung der Myristoylierung zu untersuchen, wurden Stabilitätsuntersuchungen von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 in den beiden biologisch relevanten Zuständen, dem Ca^{2+} -gebundenen und dem Ca^{2+} -freien, durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss von Mg^{2+} untersucht.

3.5.1 Chemisch induzierte Faltung/Entfaltung

Es sollte ermittelt werden, ob die Myristoylgruppe abhängig von der Anwesenheit von Ca^{2+} einen stabilisierenden Einfluss hat. Gleichzeitig sollte der Einfluss von Ca^{2+} auf die Stabilität überprüft werden. Dazu wurden myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} mit verschiedenen Konzentrationen an Guanidinhydrochlorid (GuHCl) versetzt. Dieses chaotrope Salz verschiebt das Gleichgewicht, das zwischen nativem und entfaltetem Zustand herrscht. Nimmt man einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Denaturierungsmittels und der freien Enthalpie an, lässt sich durch lineare Extrapolation die freie Enthalpie der Faltung/Entfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel berechnen [131].

Eine solche normierte Kurve mit dem zugehörigen Fit wird am Beispiel von non-myr-GCAP-2 in Anwesenheit von Ca^{2+} in Abbildung 3.10 A gezeigt. Die Erhöhung der Konzentration an GuHCl führte zu einem einzigen kooperativen Übergang von nativem non-myr-GCAP-2. Das deutet darauf hin, dass neben dem nativen und entfaltetem Zustand keine weiteren Zustände populiert werden. Um zu zeigen, dass sich ein Gleichgewicht eingestellt hatte, wurde diese Übergangskurve noch einmal, ausgehend von denaturiertem Protein in 6 M GuHCl, gemessen. Der Entfaltungsprozess war völlig reversibel, da die Rückfaltung des non-myr-GCAP-2 in einer nahezu identischen Kurve resultierte.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich durch Verwendung einer anderen spektroskopischen Sonde die gleiche Übergangskurve beschreiben lässt. Dies würde die Auswertung der Daten nach einem Zwei-Zustands-Modell rechtfertigen. Neben dem CD-Signal bei 222 nm wurde auch das intrinsische Tryptophan-Fluoreszenzsignal von non-myr-GCAP-2 mit ansteigender GuHCl-Konzentration verfolgt. Der gleiche Übergangsmittelpunkt, auch bei Auswertung bei anderen Wellenlängen (nicht gezeigt), wurde hier bestimmt. Diese Übergangskurve wurde bei einer 6-fach niedrigeren Proteinkonzentration aufgenommen. Der nahezu identische Übergang bei verschiedenen Proteinkonzentrationen und zwei unabhängigen Messsonden (Tryptophan-Fluoreszenz und Sekundärstrukturanteil) bestätigte das für die Auswertung verwendete Zwei-Zustands-Modell.

Diese Messungen wurden auch in Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Auch für myr-GCAP-2 wurden in An- und Abwesenheiten von Ca^{2+} Übergangskurven ermittelt. In allen Fällen waren diese Übergangskurven reversibel (nicht gezeigt). Lediglich der mittels Fluoreszenz ermittelte Übergangsmittelpunkt lag für non-myr-GCAP-2 in Abwesenheit von Ca^{2+} bei einer etwas kleineren GuHCl-Konzentration (bei ca. 2,5 M anstatt 2,8 M). Alle anderen Übergangsmittelpunkte waren jedoch identisch.

Die ermittelten Parameter eines globalen Fit der Übergänge von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Dabei konnte kein Einfluss der Myristoylierung auf die thermodynamische Stabilität in Abwesenheit von Ca^{2+} festgestellt werden, ca. 12 kJ/mol wurden hier in beiden Fällen ermittelt. Auch die Kooperativitäten der Übergänge, repräsentiert im m-Wert, unterschieden sich in Abwesenheit von Ca^{2+} kaum für myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2. Der m-Wert korreliert mit der Änderung der lösungsmittlexponierten hydrophoben Oberfläche zwischen nativem und entfaltetem Zustand [135;136]. Für myr-GCAP-2 wurden -3,64 kJ/mol*M bestimmt, für non-myr-GCAP-2 waren es -4,12 kJ/mol*M.

In Anwesenheit von Ca^{2+} war myr-GCAP-2 mit 19,6 kJ/mol stabiler als non-myr-GCAP-2 für das nur eine thermodynamische Stabilität von 14,8 kJ/mol bestimmt wurde. Auch die m-Werte unterschieden sich in Anwesenheit von Ca^{2+} abhängig von der Myristoylierung. Für myr-GCAP-2 wurde mit -4,76 kJ/mol*M ein größerer Wert ermittelt als für non-myr-GCAP-2, für das 3,55 kJ/mol*M berechnet wurden.

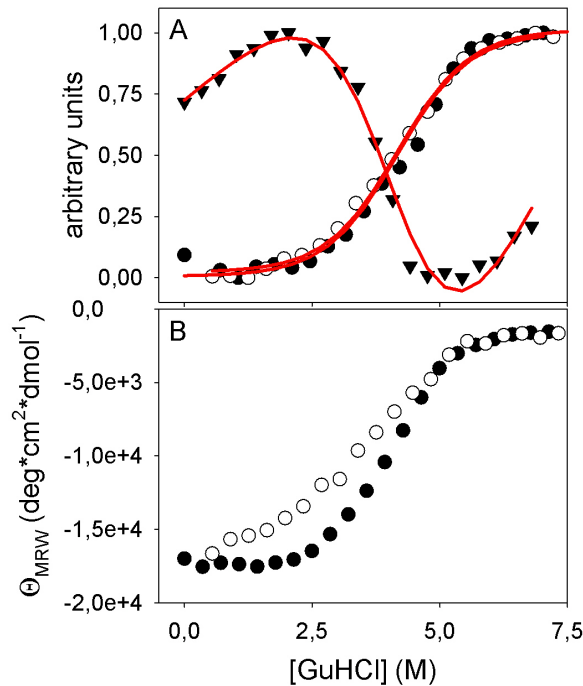


Abbildung 3.10: Chemisch induzierter Übergang von non-myr-GCAP-2 in Anwesenheit von 1 mM Ca^{2+} . (A) Repräsentative Übergangskurve von GCAP-2 am Beispiel von non-myr-GCAP-2 in Anwesenheit von Ca^{2+} . Natives (●) und in 6 M GuHCl entfaltetes (○) non-myr-GCAP-2 in einer Konzentration von 0,11 mg/ml wurde 1 h bei den angegebenen GuHCl Konzentrationen inkubiert. Das CD-Signal bei 222 nm wurde aufgenommen und über 24 s gemittelt. Alternativ wurden 16 $\mu\text{g/ml}$ natives non-myr-GCAP-2 (▼) 1 h bei den angegebenen GuHCl Konzentrationen inkubiert. Ein Fluoreszenzemissionsspektrum wurde nach Anregung bei 295 nm aufgenommen und dreimal akkumuliert. Das Signal von 349-351 nm wurde gemittelt und für den Plot verwendet. Die Daten wurden normalisiert und global nach einem Zwei-Zustands-Modell gefittet (—). (B) Einziger irreversibler Übergang der untersuchten Bedingungen. Natives (●) und in 6 M GuHCl denaturiertes (○) non-myr-GCAP-2 in einer Konzentration von 0,11 mg/ml wurde in Anwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} 1 h bei den angegebenen GuHCl Konzentrationen inkubiert. Das CD-Signal bei 222 nm wurde aufgenommen und über 24 s gemittelt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

Unter physiologischen Bedingungen okkupiert Mg^{2+} die EF-Hände von GCAP, wenn die Ca^{2+} -Konzentration nach Auslösung der Phototransduktion niedrig ist [101;104]. Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Mg^{2+} einen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität von GCAP-2 hat, wurde eine chemisch induzierte Übergangskurve in Anwesenheit von 10 mM MgCl_2 aufgenommen. Diese Messungen resultierten in ähnlichen Übergangskurven, wie in Abwesenheit von Mg^{2+} . Die Resultate sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Auch in Anwesenheit von Mg^{2+} wurde kein Einfluss der Myristoylgruppe festgestellt, wenn kein Ca^{2+} präsent war. Thermodynamische Stabilitäten von ca. 11,5 kJ/mol

und ein m-Wert von ca. $-3,5 \text{ kJ/mol}\cdot\text{M}$ wurden hier für myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 bestimmt. In Anwesenheit von Ca^{2+} wurden ein ΔG_0 von $18,8 \text{ kJ/mol}$ und ein m-Wert von $-3,95 \text{ kJ/mol}\cdot\text{M}$ von myr-GCAP-2 gemessen.

Tabelle 3.3: Ermittelte thermodynamische Parameter aus den chemisch induzierten Übergängen in Abwesenheit von Mg^{2+} . Die normierten Daten wurden global gefittet. Die erhaltenen Werte für ΔG_0 und m sind gezeigt. Die angegebenen Fehler entsprechen dem Standardfehler des Fits.

<i>thermodynamische Parameter</i>	$+\text{Ca}^{2+}$		$-\text{Ca}^{2+}$	
	$-\text{Mg}^{2+}$		$-\text{Mg}^{2+}$	
	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2
ΔG_0 (kJ/mol)	$19,6\pm 0,9$	$14,8\pm 0,9$	$12,2\pm 1,1$	$12,3\pm 0,8$
m (kJ/mol \cdot M)	$-4,76\pm 0,21$	$-3,55\pm 0,22$	$-3,64\pm 0,29$	$-4,15\pm 0,23$

Die in Anwesenheit von Mg^{2+} bestimmten thermodynamischen Stabilitäten sind etwas niedriger als die in Abwesenheit bestimmten. Besonders in Abwesenheit von Ca^{2+} ist dies überraschend, da eine bessere Bindung von Mg^{2+} an den nativen Zustand zu einer Stabilisierung führen sollte. Die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität von non-myr-GCAP-2 war nicht möglich, da die Anwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} bei gleichzeitiger Abwesenheit der Myristoylgruppe zu einer Irreversibilität der Faltung/Entfaltung führte. Dieser Übergang ist in Abbildung 3.10 B gezeigt. Die Denaturierungskurve gleicht noch der Übergangskurve im Teil A der Abbildung. Für die Rückfaltung von non-myr-GCAP-2 wurde jedoch eine Kurve mit einem niedrigeren Übergangsmittelpunkt und auch einer geringeren Kooperativität erhalten.

Tabelle 3.4: Ermittelte thermodynamische Parameter aus den chemisch induzierten Übergängen in Anwesenheit von Mg^{2+} . Die normierten Daten wurden global gefittet. Die erhaltenen Werte für ΔG_0 und m sind gezeigt. Die angegebenen Fehler entsprechen dem Standardfehler des Fits.

<i>thermodynamische Parameter</i>	$+\text{Ca}^{2+}$		$-\text{Ca}^{2+}$	
	$+\text{Mg}^{2+}$		$+\text{Mg}^{2+}$	
	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2
ΔG_0 (kJ/mol)	$18,8\pm 1,1$	--	$11,9\pm 0,6$	$11,4\pm 0,9$
m (kJ/mol \cdot M)	$-3,95\pm 0,25$	--	$-3,45\pm 0,17$	$-3,50\pm 0,27$

Diese Daten zeigen, dass die Myristoylkette in Abwesenheit von Ca^{2+} , unabhängig von Mg^{2+} , keinen Beitrag zur thermodynamischen Stabilität leistet. Vermutlich liegt die Myristoylgruppe lösungsmittlexponiert vor. Die erhöhte Stabilität in Anwesenheit von Ca^{2+} durch die Myristoylierung deutet darauf hin, dass die Fettsäure möglicherweise im Inneren des Proteins verborgen vorliegt oder zumindest auf einem hydrophoben Bereich aufliegt.

Die Vergrößerung des m -Werts durch die Myristoylierung in Anwesenheit von Ca^{2+} deutet ebenfalls darauf hin, dass die Myristoylgruppe im Inneren des Proteins vorliegt. Liegt die Myristoylgruppe im entfalteten Zustand lösungsmittlexponiert vor, trägt dies zu einer Erhöhung der Änderung der lösungsmittlexponierten hydrophoben Oberfläche bei der Faltung/Entfaltung bei. Dagegen ist die Änderung der lösungsmittlexponierten hydrophoben Oberfläche bei der Faltung/Entfaltung im Ca^{2+} -freien Zustand in etwa gleich.

3.5.2 Thermisch und chemisch induzierte Faltung/Entfaltung

Die ermittelten thermodynamischen Parameter aus den chemischen Übergangskurven sollten mittels einer zweiten Methode bestätigt werden. Mittels thermisch induzierter Entfaltung sollte der Einfluss der Myristoylgruppe auf die thermodynamische Stabilität von GCAP-2 abhängig von der Anwesenheit von Ca^{2+} überprüft werden. Gleichzeitig sollte bei diesen Experimenten die Wärmekapazität bei konstantem Druck, ΔC_{pU} , von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 bestimmt werden. ΔC_{pU} gilt als zuverlässiger Parameter, die Änderung der lösungsmittlexponierten hydrophoben Oberfläche der Faltung/Entfaltung zu bestimmen [136].

Dazu wurde GCAP-2 in Anwesenheit verschiedener GuHCl Konzentrationen einer konstanten Temperaturrampe ausgesetzt. Das CD-Signal bei 222 nm wurde verfolgt. Diese Experimente wurden aufgrund der Irreversibilität des chemisch induzierten Übergangs von non-myr-GCAP-2 in Abwesenheit von Mg^{2+} durchgeführt.

Eine solche Übergangskurve wird in Abbildung 3.11 gezeigt. In Abwesenheit von GuHCl war zwischen 0 und 80 °C kein Übergang zu beobachten. Erst durch Zugabe von GuHCl kam es zu einer Erhöhung des Anteils denaturierten Proteins. Der entfaltete Zustand war bei Temperaturen unter 20 °C und über 40 °C stärker populiert als bei 30 °C. In Anwesenheit von Ca^{2+} waren diese Temperaturübergänge völlig reversibel. In Abwesenheit von Ca^{2+} und GuHCl waren die Temperaturübergänge nur bis 50 °C reversibel. In Abwesenheit von Ca^{2+} und Anwesenheit von 2 M GuHCl waren die Übergänge reversibel bis 70 °C. Waren 3 M GuHCl oder mehr in der Lösung, waren die Temperaturübergänge in Abwesenheit von Ca^{2+} reversibel bis 80 °C.

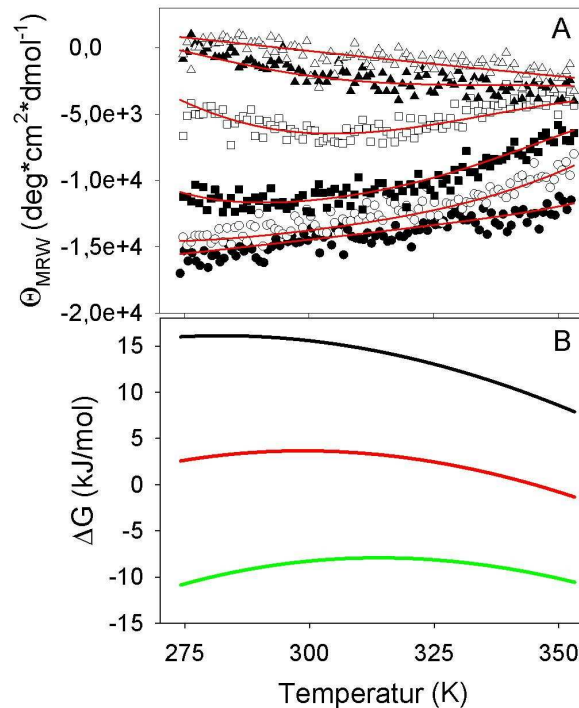


Abbildung 3.11: (A) typischer temperaturinduzierter Übergang am Beispiel von 0,1 mg/ml non-my-GCAP-2 in 0 M (●), 2 M (○), 3 M (■), 4 M (□), 5 M (▲) und 7 M (△) GuHCl. Das CD-Signal wurde bei 222 nm von 1-80 °C verfolgt, bei einer Heizrate von 1 °C/min. Die Daten wurden global nach einem Zwei-Zustands-Modell gefittet. (B) Die aus den Fitparametern dieses Experiments resultierende Stabilität bei 0 M GuHCl (—), 3 M GuHCl (—) oder 6 M GuHCl (—) und der jeweiligen Temperatur.

Die ermittelten Parameter der Kurvenanpassung wurden zu ΔG_0 und dem m -Wert zusammengefasst, um sie mit den Ergebnissen der chemisch induzierten Faltung/Entfaltung besser vergleichen zu können. Diese Werte sind in Tabelle 3.5 gezeigt. Die Parameter, aus denen sich diese Werte ergeben, sind im Anhang gezeigt.

Die Parameter der Kurvenanpassung wurden benutzt, um die temperaturabhängige Stabilität zu berechnen, wie sie für verschiedene GuHCl Konzentrationen in Abbildung 3.11 B dargestellt ist. Beides, Temperatur und Konzentration an GuHCl, verschieben das Gleichgewicht zwischen nativem und denaturiertem Zustand. Es ergeben sich glockenförmige Kurven, deren Krümmung sich aus $\Delta C_p U$ ergibt.

In Abwesenheit von Ca^{2+} wurden für myr-GCAP-2 ein $\Delta C_p U$ von 0,76 kJ/mol*K und für non-my-GCAP-2 ein Wert von 0,72 kJ/mol*K bestimmt. Zugabe von Ca^{2+} führte zu einer Erhöhung von $\Delta C_p U$. Diese Erhöhung war stärker für myr-GCAP-2. Hier wurden 1,68 kJ/mol*K bestimmt. Für non-my-GCAP-2 wurde mit 1,12 kJ/mol*K ein geringerer $\Delta C_p U$ -Wert bestimmt.

Tabelle 3.5: Ermittelte thermodynamische Parameter aus den thermisch und chemisch induzierten Übergängen in Abwesenheit von Mg^{2+} . Die ermittelten Parameter für ΔG_0 und m bei 25 °C sind als Mittelwerte einer Doppelbestimmung mit Standardfehler dargestellt.

<i>thermodynamische Parameter</i>	$+Ca^{2+}$		$-Ca^{2+}$	
	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2
ΔG_0 (kJ/mol)	18,5±3,4	15,5±0,3	11,5±0,5	10,7±0,9
m (kJ/mol*M)	-4,35±0,60	-3,97±0,05	-3,33±0,14	-3,63±0,26
$\Delta C_p U$ (kJ/mol*K)	1,68±0,00	1,12±0,17	0,76±0,36	0,72±0,02

Die ermittelten Werte für ΔG_0 und den m -Wert bei 25 °C ergaben ähnliche Werte für myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} , wie zuvor. Wieder wurde für myr-GCAP-2 in Abwesenheit von Ca^{2+} ein ΔG_0 von 11,5 kJ/mol und ein m -Wert von -3,33 kJ/mol*M ermittelt. Für non-myr-GCAP-2 wurden ein ΔG_0 von 10,7 kJ/mol und ein m -Wert von -3,63 kJ/mol*M errechnet.

Die Anwesenheit von Ca^{2+} führte zu einer Erhöhung von ΔG_0 und des m -Werts. Dabei war der für myr-GCAP-2 ermittelte ΔG_0 Wert mit 18,5 kJ/mol höher als der für non-myr-GCAP-2 für das sich 15,5 kJ/mol ergaben. Auch für den m -Wert wurde beobachtet, dass dieser mit -4,35 kJ/mol*M für myr-GCAP-2 höher war als für non-myr-GCAP-2, für das nur -3,97 kJ/mol*M bestimmt wurden.

Tabelle 3.6: Änderung der (hydrophoben) lösungsmittlexponierten Oberfläche zwischen nativem und entfaltendem Zustand (ΔASA), berechnet Anhand von $\Delta C_p U$ und m -Wert (Tabelle 3.5), unter der jeweiligen Bedingung

<i>Grundlage</i>	$+Ca^{2+}$		$-Ca^{2+}$	
	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2
m (nach [136])	826 Å ²	413 Å ²	-282 Å ²	43 Å ²
$\Delta C_p U$ (nach [136])	2602 Å ²	1933 Å ²	1502 Å ²	1455 Å ²
$\Delta C_p U$ (nach [135])	2486 Å ²	1950 Å ²	1606 Å ²	1568 Å ²

Die Bindung von Ca^{2+} führte zu einer größeren thermodynamischen Stabilität. Auch wurde bei Anwesenheit von Ca^{2+} die thermische ($\Delta C_p U$) als auch chemische (m) Kooperativität der Faltung/Entfaltung erhöht. Dies gilt nicht für den m -Wert von non-myr-GCAP-2. Hier wurden etwa gleiche m -Werte bestimmt.

Die Myristoylgruppe beeinflusst die thermodynamische Stabilität und die Kooperativität der Faltung/Entfaltung des Ca^{2+} freien Zustands nicht. In Anwesenheit von Ca^{2+} war myr-GCAP-2 thermodynamisch stabiler. Auch die Parameter der Kooperativität der Übergänge (m , $\Delta C_p U$) wurden durch die Myristoylgruppe vergrößert.

Die Änderung der (hydrophoben) lösungsmittlexponierten Oberfläche (ΔASA) ist in Tabelle 3.6 dargestellt. Im Ca^{2+} -gebundenen Zustand wurde für myr-GCAP-2 eine größere ΔASA bestimmt als für non-myr-GCAP-2. In Abwesenheit von Ca^{2+} wurde eine kleinere ΔASA ermittelt. Die Anhand von $\Delta C_p U$ errechnete ΔASA ist größer für myr-GCAP-2 als für non-myr-GCAP-2. Die Unterschiede sind aber wesentlich geringer als im Ca^{2+} -gebundenen Zustand. Die anhand von m errechnete ΔASA ist in Abwesenheit von Ca^{2+} sogar größer für non-myr-GCAP-2 als für myr-GCAP-2.

3.6 Konformationsänderungen durch Ca^{2+} -Bindung

Die größere thermodynamische Stabilität und erhöhte Kooperativität der Faltung/Entfaltung im Ca^{2+} -gebundenen Zustand deuten darauf hin, dass die Myristoylgruppe unter dieser Bedingung möglicherweise im Inneren des Proteins verborgen vorliegt. Dagegen scheint sie im Ca^{2+} -freien Zustand dem Lösungsmittel exponiert vorzuliegen und keinen Beitrag zur Stabilität zu leisten. Um diese Hypothese zu prüfen, sollte zunächst die Zugänglichkeit dieses zusätzlichen hydrophoben Restes nachgewiesen werden.

3.6.1 Titration der hydrophoben Oberfläche

Der Fluoreszenzfarbstoff 8-Anilino-1-Naphthalinsulfonsäure (ANS) bindet an hydrophobe Oberflächen auf Proteinen. Dabei ändert ANS seine Fluoreszenzeigenschaften und kann so zur Quantifizierung hydrophober Oberflächen genutzt werden. Sollte die Myristoylgruppe in Abwesenheit von Ca^{2+} dem Lösungsmittel exponiert sein, würde mehr ANS an myr-GCAP-2 als an non-myr-GCAP-2 binden. In Anwesenheit von Ca^{2+} wäre kein Unterschied zu erwarten, sollte die Myristoylgruppe vollständig verborgen vorliegen.

Eine Titration mit ANS wurde bei konstanter Konzentration an GCAP-2 durchgeführt. Diese Titration wurde in Anwesenheit von 1 M GuHCl durchgeführt, um zu gewährleisten, dass das Ca^{2+} -freie GCAP-2 als Monomer vorliegt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.12 gezeigt. Die Erhöhung der ANS Konzentration führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals von gebundenem ANS bei 479 nm. Sowohl für myr-GCAP-2 als auch für non-myr-GCAP-2 ergab sich eine hyperbole Kurve. Bis zu einer Konzentration von 50 μM ANS verlaufen beide Kurven parallel. Danach wurden höhere Werte der ANS-Fluoreszenz für myr-GCAP-2

gemessen. Bei ca. 120 μM ANS erreichte das ANS-Signal für non-myr-GCAP-2 ein Plateau bei ca. $2,1 \cdot 10^6$. Für myr-GCAP-2 wurde dieses Plateau bei ca. 150 μM ANS erreicht. Es lag bei ca. $2,4 \cdot 10^6$. Das für myr-GCAP-2 ein höherer Wert gemessen wurde, deutet bereits auf die Zugänglichkeit der Myristoylgruppe hin.

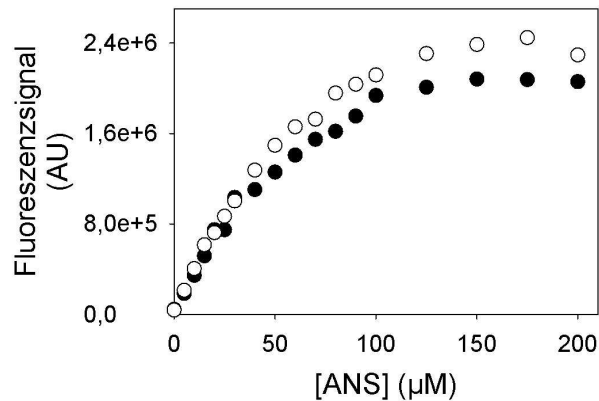


Abbildung 3.12: ANS-Titration von GCAP-2. Myr-GCAP-2 (\circ) und non-myr-GCAP-2 (\bullet) in einer Konzentration von 2,14 μM wurden in Abwesenheit von Ca^{2+} und Anwesenheit von 1 M GuHCl mit unterschiedlichen Mengen ANS versetzt. Das Fluoreszenzsignal bei 479 nm ist, nach Anregung bei 350 nm, gegen die Konzentration an ANS aufgetragen.

Alle weiteren Versuche zur ANS-Fluoreszenz wurden nun bei 173 μM ANS durchgeführt, einer Konzentration, bei der das Plateau erreicht war. Hier wurde nun myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 in An- und Abwesenheit der beiden Liganden Ca^{2+} und Mg^{2+} untersucht.

Die Resultate sind in Abbildung 3.13 und Tabelle 3.7 zusammengefasst.

In Abwesenheit von Ca^{2+} wurden für myr-GCAP-2 $2,74 \cdot 10^6$ ermittelt. Für non-myr-GCAP-2 nur $2,11 \cdot 10^6$. Anwesenheit von Mg^{2+} führte zu bei myr-GCAP-2 zu einer Reduktion der ANS-Fluoreszenz auf $2,43 \cdot 10^6$, bei non-myr-GCAP-2 dagegen zu einem Anstieg auf $2,25 \cdot 10^6$. Auch im Ca^{2+} -gebundenen Zustand wurde für myr-GCAP-2 ein höheres ANS-Signal gemessen als für non-myr-GCAP-2. In Abwesenheit von Mg^{2+} wurden für myr-GCAP-2 $2,54 \cdot 10^6$ bestimmt, in Abwesenheit von Mg^{2+} $2,55 \cdot 10^6$. Für non-myr-GCAP-2 wurden mit $2,38 \cdot 10^6$ in Abwesenheit von Mg^{2+} und $2,47 \cdot 10^6$ in Anwesenheit von Mg^{2+} kleinere Werte bestimmt. Überraschenderweise wurde durch Ca^{2+} -Bindung das ANS-Signal nicht in allen Fällen verringert.

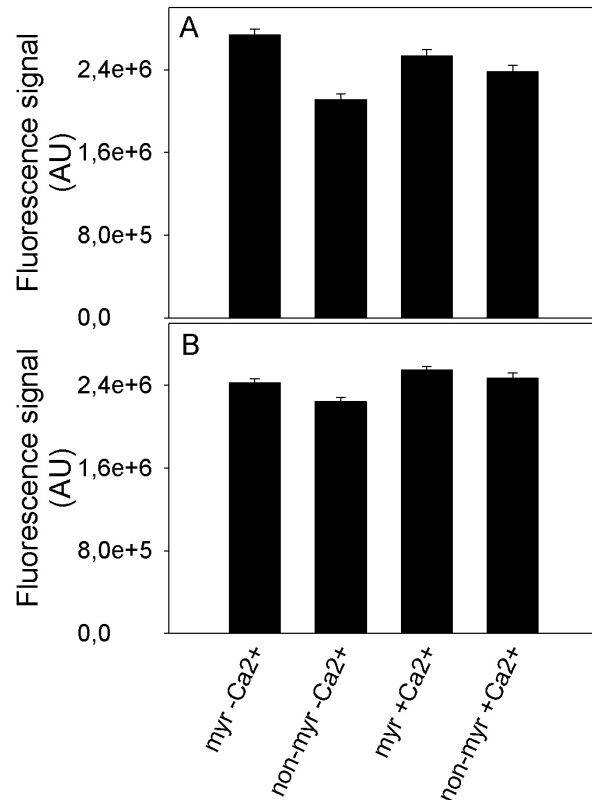


Abbildung 3.13: ANS-Fluoreszenz bei 479 nm von GCAP-2 in An- und Abwesenheit der Liganden Ca^{2+} und Mg^{2+} . ANS-Signal von je $2,14 \mu\text{M}$ myr-GCAP-2 (myr) bzw. non-myr-GCAP-2 (non-myr) in (A) Abwesenheit von Mg^{2+} . Die Messungen wurden Anwesenheit von 1 M GuHCl, 1 mM EGTA ($-\text{Ca}^{2+}$) bzw. 1 mM CaCl_2 ($+\text{Ca}^{2+}$) in 100 mM Cacodylat; 40 mM KCl; pH $7,0$ durchgeführt. (B) Analog dazu verlief die Messung in Anwesenheit von Mg^{2+} mit zusätzlich 10 mM MgCl_2 .

Tabelle 3.7: Fluoreszenzsignal bei 479 nm von $173 \mu\text{M}$ ANS und $2,14 \mu\text{M}$ GCAP-2 in Abhängigkeit der Liganden Ca^{2+} und Mg^{2+} .

	$+\text{Ca}^{2+}$		$-\text{Ca}^{2+}$	
	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2
$-\text{Mg}^{2+} (\cdot 10^6)$	$2,54 \pm 0,06$	$2,38 \pm 0,06$	$2,74 \pm 0,05$	$2,11 \pm 0,05$
$+\text{Mg}^{2+} (\cdot 10^6)$	$2,55 \pm 0,03$	$2,47 \pm 0,05$	$2,43 \pm 0,03$	$2,25 \pm 0,04$

Unabhängig von Ca^{2+} wurde jeweils ein signifikanter Unterschied der ANS-Fluoreszenz von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 beobachtet. Dabei war das ANS-Signal von myr-GCAP-2 immer größer als das von non-myr-GCAP-2. Das Signifikanzniveau dieses Unterschieds ist unter der jeweiligen Bedingung in Tabelle 3.8 gezeigt.

Tabelle 3.8: Signifikanzniveau (p-Werte) aus den Sechsfachbestimmungen des ANS-Signals von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 unter den jeweiligen Bedingungen.

	$+Ca^{2+}$		$-Ca^{2+}$	
	$-Mg^{2+}$	$+Mg^{2+}$	$-Mg^{2+}$	$+Mg^{2+}$
p-Wert	$8,8 \cdot 10^{-4}$	$9,3 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-9}$	$2,9 \cdot 10^{-6}$

Alle p-Werte waren deutlich kleiner als 0,05. Allerdings waren die p-Werte in Abwesenheit von Ca^{2+} noch mindestens drei Größenordnungen geringer. Der deutliche Unterschied im ANS-Signal bestätigte, dass die Myristoylgruppe im Ca^{2+} -freien Zustand vermutlich lösungsmittel exponiert vorlag. Gleichzeitig deuteten die p-Werte in Anwesenheit von Ca^{2+} darauf hin, dass die Myristoylierung auch hier zu einer Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche führt. Diese ist etwas schwächer als im Ca^{2+} -freien Zustand, aber dennoch signifikant.

Soweit unterstützen die Ergebnisse der ANS-Messungen, dass die Myristoylgruppe von GCAP-2 im Ca^{2+} -freien Zustand lösungsmittel exponiert vorliegt. Dies scheint, zumindest partiell, auch im Ca^{2+} -gebundenen Zustand der Fall zu sein.

3.6.2 Zugänglichkeit von SH-Gruppen

Eine weitere Möglichkeit, die durch Ca^{2+} hervorgerufenen Konformationsänderungen zu untersuchen, ist die Zugänglichkeit von Cysteinen auf der Oberfläche von Proteinen zu messen. Dazu kann der thiolreaktive Farbstoff 5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), DTNB, verwendet werden. Ein freies Cystein reagiert dabei mit Thionitrobenzoesäure unter Ausbildung einer Disulfidbrücke. Dabei wird ein weiteres Thionitrobenzoesäure-Molekül, das eine gute Abgangsgruppe ist, freigesetzt. Es ionisiert im Wasser und ändert dabei seine chromophoren Eigenschaften. So kann die Anzahl zugänglicher Thiolgruppen quantifiziert werden.

Diese Methode ermöglicht es, zu untersuchen, ob die durch Ca^{2+} hervorgerufene Konformationsänderung sich nur auf die Myristoylgruppe beschränkt oder auch andere Bereiche im Protein beeinflusst.

Gleichzeitig wurde diese Methode genutzt, um die Zugänglichkeit einer SH-Gruppe an der ω -Position der Fettsäure zu untersuchen. Dazu wurde GCAP-2 mit einem artifiziellen Fettsäurederivat modifiziert.

3.6.2.1 Einführung einer zusätzlichen Thiolgruppe an die ω -Position der Fettsäuremodifikation

Um eine solche SH-Gruppe an der ω -Position der N-terminalen Lipidmodifikation einzuführen, wurde während der Koexpression von GCAP-2 mit NMT1 12-Mercaptododekansäure anstelle von Myristinsäure zum Expressionsmedium gegeben.

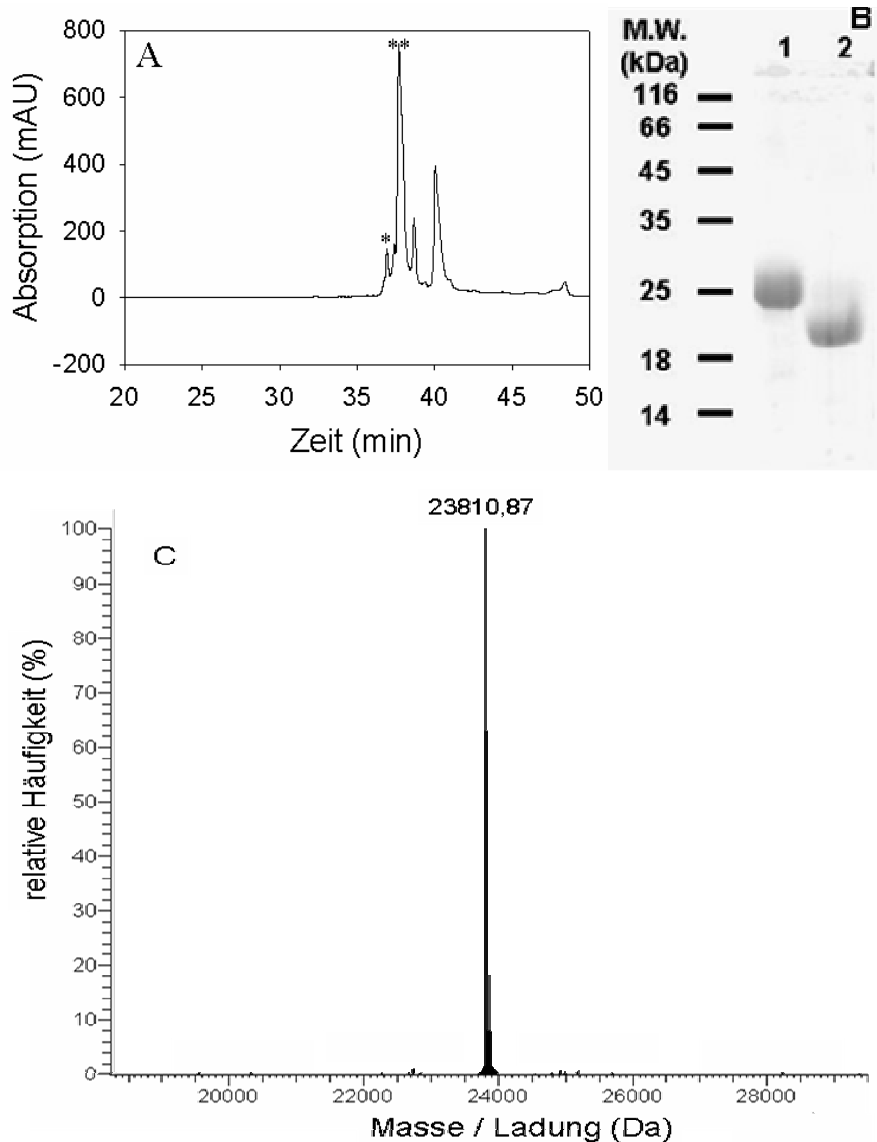


Abbildung 3.14: Erfolg der Reinigung von thio-GCAP-2. (A) Thio-GCAP-2 wurde nach Ionenaustauschchromatographie auf eine *reversed phase* C18 Säule gebunden und in einem linearen Gradienten eluiert. Die Peaks wurden anhand ihrer Masse zugeordnet. Der Peak bei 36,9 min (*) ist non-myr-GCAP-2. Bei 37,7 min (**) eluierte thio-GCAP-2. (B) Das gereinigte, native Protein wurde in An- (2) und Abwesenheit (1) von Ca^{2+} einer SDS-Page unterzogen. Das Gel wurde mit Coomassie-Brillant-Blau G-250 gefärbt. (C) Die molare Masse des gereinigten Proteins wurde mittels ESI-Orbitrap bestimmt.

Die NMT1 akzeptierte 12-Mercaptododekansäure als Substrat und mit 12-Mercaptododekansäure am N-terminalen Glycin verestertes GCAP-2 (thio-GCAP-2) konnte erfolgreich exprimiert werden. Die Aufreinigung erfolgte analog zur Reinigung von myr-GCAP-2. Auch non-myr-GCAP-2 und thio-GCAP-2 konnten erfolgreich getrennt werden, wenngleich auch die Retentionszeiten um weniger als eine Minute differierten (Abbildung 3.14 A). Die beiden zusätzlichen Peaks enthielten ebenfalls Protein. Diesem wurde die Masse von thio-GCAP-2 zugeordnet. Aufgrund des abweichenden Retentionsverhaltens wurden diese Spezies verworfen. Der Erfolg der Reinigung wird in Abbildung 3.14 B gezeigt. Der für GCAP-2 typische Ca^{2+} -*shift*, der auf Funktionalität der EF-Hände hindeutet, wurde beobachtet. Der erfolgreiche Einbau der 12-Mercaptododekansäure anstelle der Myristinsäure wurde massenspektrometrisch verifiziert. Dabei konnte kein myr-GCAP-2 detektiert werden. Die erzielten Ausbeuten beliefen sich auf 0,9-1 mg thio-GCAP-2 pro 1 g Biofeuchtmasse. Sowohl die Expression als auch die Reinigung lieferten somit ähnliche Ergebnisse wie bei der Produktion von myr-GCAP-2.

3.6.2.2 Charakterisierung von thio-GCAP-2

Um zu überprüfen, ob durch die Acylierung mit der artifiziellen Fettsäure 12-Mercaptododekansäure die Struktur von GCAP-2 gestört wird, wurde jeweils ein fern-UV-CD-Spektrum in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} aufgenommen. Es wurden ebenfalls für ein Protein mit hohem α -Helixgehalt typische Spektren gemessen (Abbildung 3.15).

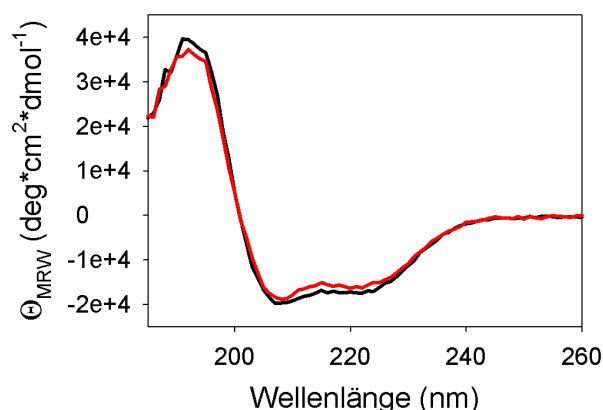


Abbildung 3.15: Fern-UV-CD-Spektren von thio-GCAP-2 in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} . Von 0,81 mg/ml thio-GCAP-2 in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 wurde ein CD-Spektrum aufgenommen und anschließend mit dem Spektrum des Puffers korrigiert. Die Probe mit Ca^{2+} (schwarz) enthielt zusätzlich 1 mM CaCl_2 , die Probe ohne Ca^{2+} (rot) enthielt zusätzlich 1 mM EGTA.

Ca²⁺-Bindung führte zu einer signifikanten Änderung des CD-Spektrums. Damit wurden für thio-GCAP-2 identische Spektren gemessen wie für myr-GCAP-2. Der Sekundärstrukturanteil wurde also durch die Acylierung mit 12-Mercaptododecangruppe anstelle von Myristinsäure nicht beeinflusst. Gleichzeitig bewirkte Ca²⁺-Bindung eine Erhöhung des α -Helixgehalts.

Um auszuschließen, dass die zusätzliche Thiolgruppe einen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität hatte, wurde die Faltung/Entfaltung von thio-GCAP-2 in Abwesenheit von Mg²⁺ chemisch induziert. Als Beispiel ist die Faltung/Entfaltung von thio-GCAP-2 in Anwesenheit von Ca²⁺ gezeigt (Abbildung 3.16). Dabei wurde eine freie Enthalpie der Faltung/Entfaltung, ΔG_0 , von 20,4 kJ/mol und ein m-Wert von 4,47 kJ/mol*M bestimmt. In Abwesenheit von Ca²⁺ wurde ein ΔG_0 von 12,3 kJ/mol und ein m-Wert von 3,5 kJ/mol*M bestimmt. Diese Werte entsprachen denen für myr-GCAP-2, wie in Abschnitt 3.5.1 ermittelt.

Weder der Sekundärstrukturanteil noch die Stabilität in An- und Abwesenheit von Ca²⁺ wurden durch die Einführung der artifiziellen Fettsäure verändert.

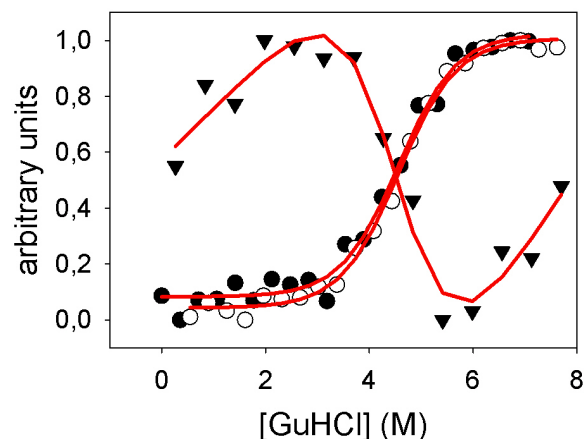


Abbildung 3.16: Chemisch induzierte Faltung/Entfaltung von thio-GCAP-2 in Anwesenheit von 1 mM Ca²⁺. Natives (●) und in 6 M GuHCl entfaltetes (○) thio-GCAP-2 in einer Konzentration von 0,11 mg/ml wurde 1 h bei den angegebenen GuHCl Konzentrationen inkubiert. Das CD-Signal bei 222 nm wurde aufgenommen und über 24 s gemittelt. Alternativ wurden 12 μ g/ml natives thio-GCAP-2 (▼) 1 h bei den angegebenen GuHCl Konzentrationen inkubiert. Ein Fluoreszenzspektrum nach Anregung bei 295 nm wurde aufgenommen und dreimal akkumuliert. Das Signal von 349-351 nm wurde gemittelt und für den Plot verwendet. Die Daten wurden normalisiert und global nach einem Zwei-Zustands-Modell gefittet (—).

Als nächstes wurde überprüft, ob der Einbau der artifiziellen Fettsäure die Fähigkeit von GCAP-2 beeinflusst, die Aktivität rekombinant hergestellter ROS-GC1 zu modulieren.

Die Aktivität von thio-GCAP-2 entsprach in etwa der von myr-GCAP-2. Eine Aktivierung der Guanylatzyklaseaktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} um ca. Faktor 12 wurde ermittelt. Die Konzentration, bei der die Aktivierung halbmaximal ist (EC_{50}), war kleiner als $2,5 \mu\text{M}$. In Anwesenheit von Ca^{2+} wurde die Basalaktivität der Guanylatzyklase auf ca. 85 % reduziert. Damit wird GCAP-2 nicht durch die Modifikation mit der artifiziellen Fettsäure negativ beeinträchtigt. Im Gegenteil, für thio-GCAP-2 wurden sogar leicht höhere EC_{50} -Werte gemessen. Auch die Steigerung bzw. Verringerung der Basalaktivität war größer als für myr-GCAP-2.

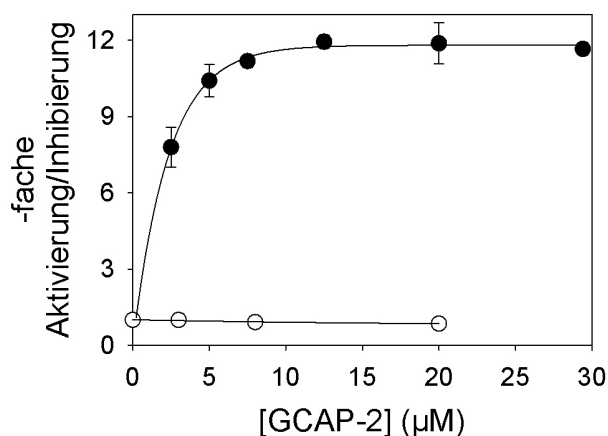


Abbildung 3.17: Aktivitätstest von thio-GCAP-2. In HEK293 exprimierte ROS-GC1 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von thio-GCAP-2 in An- (○) und Abwesenheit (●) von Ca^{2+} inkubiert. Die gebildete Menge cGMP wurde mittels *reversed phase* HPLC quantifiziert und auf die Menge an gebildetem cGMP in Abwesenheit von thio-GCAP-2 normiert.

Da weder Sekundärstruktur, Stabilität noch Aktivität durch die artifizielle Fettsäure apparent beeinflusst wurden, wurde thio-GCAP-2 als repräsentatives Modell für myr-GCAP-2 angenommen.

3.6.2.3 Reaktion mit DTNB

Da sich myr-GCAP-2 und thio-GCAP-2 sowohl strukturell als auch funktionell nicht unterschieden, konnten sie nun bezüglich der Zugänglichkeit ihrer Thiolgruppen untersucht werden. Dazu wurde der Umsatz von DTNB zeitabhängig und abhängig von den Liganden Ca^{2+} und Mg^{2+} bestimmt. Myr-GCAP-2 besitzt drei freie Cysteinreste und damit drei Thiolgruppen die, sofern sie zugänglich sind, von DTNB umgesetzt werden. Thio-GCAP-2 besitzt vier Thiolgruppen.

Eine DTNB-Umsatzkinetik von beiden Proteinen ist in Abbildung 3.18 gezeigt. War kein Ca^{2+} an myr-GCAP-2 gebunden, reagierten alle drei Thiolgruppen innerhalb von 2,5 min.

Zugabe von Ca^{2+} führte nicht zur Freisetzung weiterer Thiolgruppen. Eine nahezu identische Kinetik wurde für thio-GCAP-2 beobachtet. Allerdings reagierten hier vier Thiolgruppen innerhalb der ersten 2,5 min des Experimentes. Zugabe von Ca^{2+} führte auch hier nicht zur Freisetzung weiterer Thiolgruppen.

In Anwesenheit von Ca^{2+} reagierten nur ca. 1,4 Thiolgruppen von myr-GCAP-2 innerhalb von 2,5 min. Wurde Ca^{2+} durch einen Überschuss an EGTA entfernt, wurden zusätzliche SH-Gruppen zugänglich und reagierten beschleunigt. Eine Amplitude von weiteren 1,2 Thiolgruppen reagierte innerhalb der nächsten 2,5 min. Durch die Dissoziation von Ca^{2+} und die damit einhergehende Konformationsänderung veränderte mindestens ein Cystein seine Umgebung so, dass es verstärkt mit DTNB reagierte.

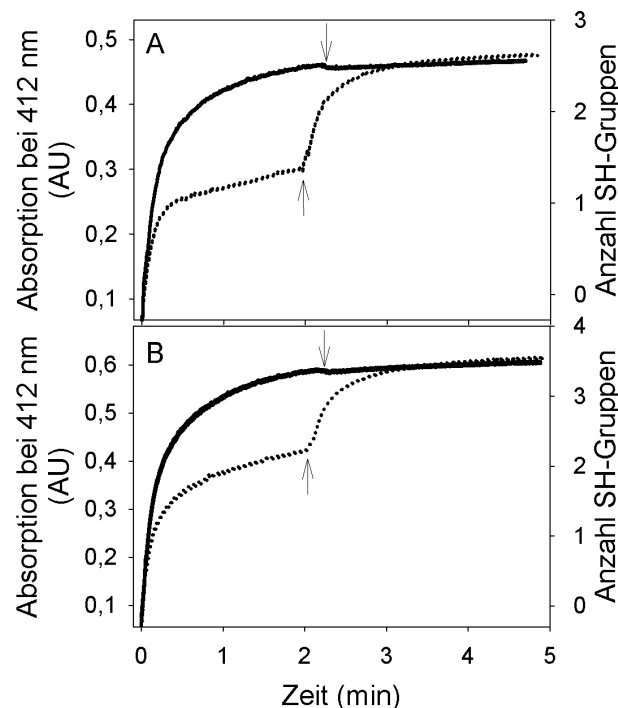


Abbildung 3.18: DTNB-Umsatz von 10 μM myr-GCAP-2 (A) und 10 μM thio-GCAP-2 (B). Die Kinetik wurde durch Zugabe von 200 μM DTNB in An- (gepunktete Linie) bzw. Abwesenheit (durchgezogene Linie) von Ca^{2+} gestartet. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt, bei dem die 0,125 mM CaCl_2 bzw. 0,125 mM EGTA mit 2 mM EGTA bzw. 2 mM CaCl_2 übertitriert wurden. Sowohl die Absorption bei 412 nm als auch die daraus resultierende Anzahl umgesetzter SH-Gruppen sind dargestellt.

Wurde thio-GCAP-2 in Anwesenheit von Ca^{2+} mit DTNB inkubiert, reagierten innerhalb der ersten 2,5 min ca. 2,1 Thiolgruppen. Zugabe eines Überschusses an EGTA führte zu einem beschleunigten Umsatz weiterer 1,5 Thiolgruppen. Die zusätzlich eingeführte Thiolgruppe an der Fettsäure reagierte also bereits in Anwesenheit von Ca^{2+} durch DTNB.

Ein vollständiger Umsatz aller drei Thiolgruppen von myr-GCAP-2 und aller vier Thiolgruppen von thio-GCAP-2 wurde auch in Anwesenheit von Ca^{2+} beobachtet. Nach mehr als 20 min wurde ein Plateau bei drei Thiolgruppen bzw. vier Thiolgruppen erreicht (Abbildung 3.19 A). Zugabe von EGTA nach 25 min führte dann nicht mehr zu einem verstärkten Umsatz von DTNB (nicht gezeigt).

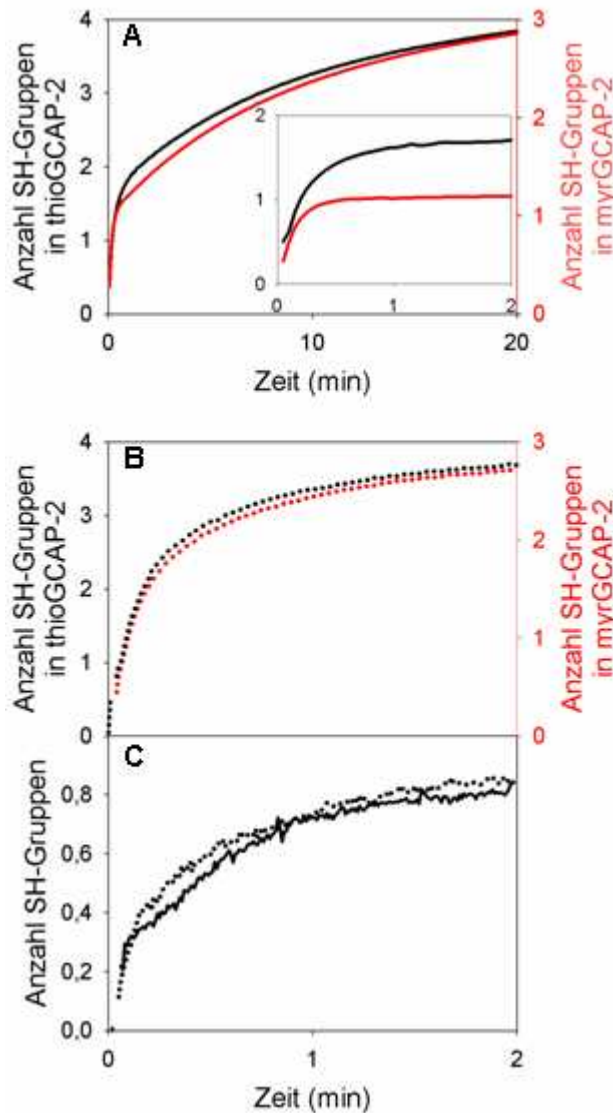


Abbildung 3.19: DTNB-Umsatz von myr-GCAP-2 und thio-GCAP-2 im Vergleich. (A) In Anwesenheit von Ca^{2+} reagieren alle SH-Gruppen von myr-GCAP-2 (rot) und thio-GCAP-2 (schwarz) mit DTNB. Im Inset sind die beiden Kinetiken ohne die langsame Phase dargestellt. (B) Vergleich der Kinetik bei der Reaktion mit DTNB von myr-GCAP-2 (rot) und thio-GCAP-2 (schwarz) in Abwesenheit von Ca^{2+} . (C) Der Beitrag der zusätzlichen SH-Gruppe an der Fettsäure zur Umsatzkinetik von DTNB wurde in An- (durchgezogene Linie) und Abwesenheit (gestrichelt) durch Subtraktion der Kinetik für myr-GCAP-2 von der Kinetik von thio-GCAP-2 errechnet.

In Abwesenheit von Ca^{2+} unterschieden sich die Kinetiken von thio-GCAP-2 und myr-GCAP-2 nicht (Abbildung 3.19 B). Dagegen offenbarte sich ein Unterschied der Kinetiken in Anwesenheit von Ca^{2+} . In einer langsamen Phase wurden bei myr-GCAP-2 2,1 Cysteine mit DTNB umgesetzt. Für thio-GCAP-2 ergaben sich 2,5 Cysteine. In beiden Fällen wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $0,1 \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Um die schnelle Phase der Kinetik besser vergleichen zu können, wurde daher die langsame Phase subtrahiert. Die daraus resultierende Kurve ist als Inset in Abbildung 3.19 A gezeigt. Diese Kurve kann für myr-GCAP-2 durch eine monophasische Kinetik beschrieben werden. Eine Amplitude von 1,0 und eine Geschwindigkeitskonstante von $6,5 \text{ min}^{-1}$ wurden bestimmt. Für thio-GCAP-2 dagegen konnten zwei Phasen aufgelöst werden. Eine Phase reagiert über eine Amplitude von 1,0 mit einer Geschwindigkeitskonstante von $8,2 \text{ min}^{-1}$ und ist damit vergleichbar zu der Kinetik von myr-GCAP-2. Die zweite Phase wurde durch eine Amplitude von 0,7 und einer Geschwindigkeitskonstante von $2,0 \text{ min}^{-1}$ beschrieben. Es ist anzunehmen, dass es sich bei dieser langsameren Phase um die Reaktion der Thiolgruppe an der Fettsäure handelt.

Bestätigt wurde dies durch Subtraktion der Kinetik von myr-GCAP-2 von der Kinetik von thio-GCAP-2 unter der jeweiligen Bedingung (Abbildung 3.19 C). Da sich beide Proteine nur um die eine zusätzliche SH-Gruppe an der Fettsäure unterscheiden, konnte deren Reaktion auch direkt dargestellt werden. Auch hier zeigte sich, dass in Anwesenheit von Ca^{2+} diese Gruppe mit einer Geschwindigkeitskonstante von $1,9 \text{ min}^{-1}$ reagierte. Die Amplitude betrug 0,88. In Abwesenheit von Ca^{2+} wurde nahezu die gleiche Kinetik gemessen. Eine Geschwindigkeitskonstante von $2,2 \text{ min}^{-1}$ wurde bestimmt. Die Amplitude betrug 0,89. Somit konnte für die zusätzliche SH-Gruppe an der Fettsäure keine Beschleunigung im Umsatz festgestellt werden.

Zusammengefasst bedeutet das, dass GCAP-2 nach Ca^{2+} -Dissoziation eine Konformationsänderung erfährt. Durch diese Konformationsänderung wurden vermutlich zwei Cysteine so orientiert, dass sie schneller mit DTNB reagieren konnte. Dennoch reagieren alle Thiolgruppen auch in Anwesenheit von Ca^{2+} . Gleichzeitig erfährt die zusätzliche Thiolgruppe an der Fettsäure durch Entzug von Ca^{2+} vermutlich keine Beschleunigung im Umsatz.

3.6.2.4 Zuordnung der Thiolgruppen bezüglich ihrer Reaktivität

Die drei Cysteine von GCAP-2 befinden sich in der EF-Hand 1 (Cys 35), in EF-Hand 3 (Cys 111) und in einem *loop* zwischen EF-Hand 3 und 4 (Cys 131). Dabei sind Cys 35 und Cys 111

besonders interessant. Die EF-Hand 1 wurde als Wechselwirkungsregion mit der ROS-GC beschrieben, und Cys 111 ist direkt an der Koordination eines Ca^{2+} beteiligt. Thio-GCAP-2 besitzt eine weitere SH-Gruppe an der N-terminalen Fettsäuremodifikation.

Um den Ca^{2+} -freien Zustand von GCAP-2, der die Aktivierung der ROS-GC bewirkt, besser zu charakterisieren, sollten die Thiolgruppen identifiziert werden, deren jeweilige Umsatzraten sich durch Ca^{2+} -Dissoziation verändern.

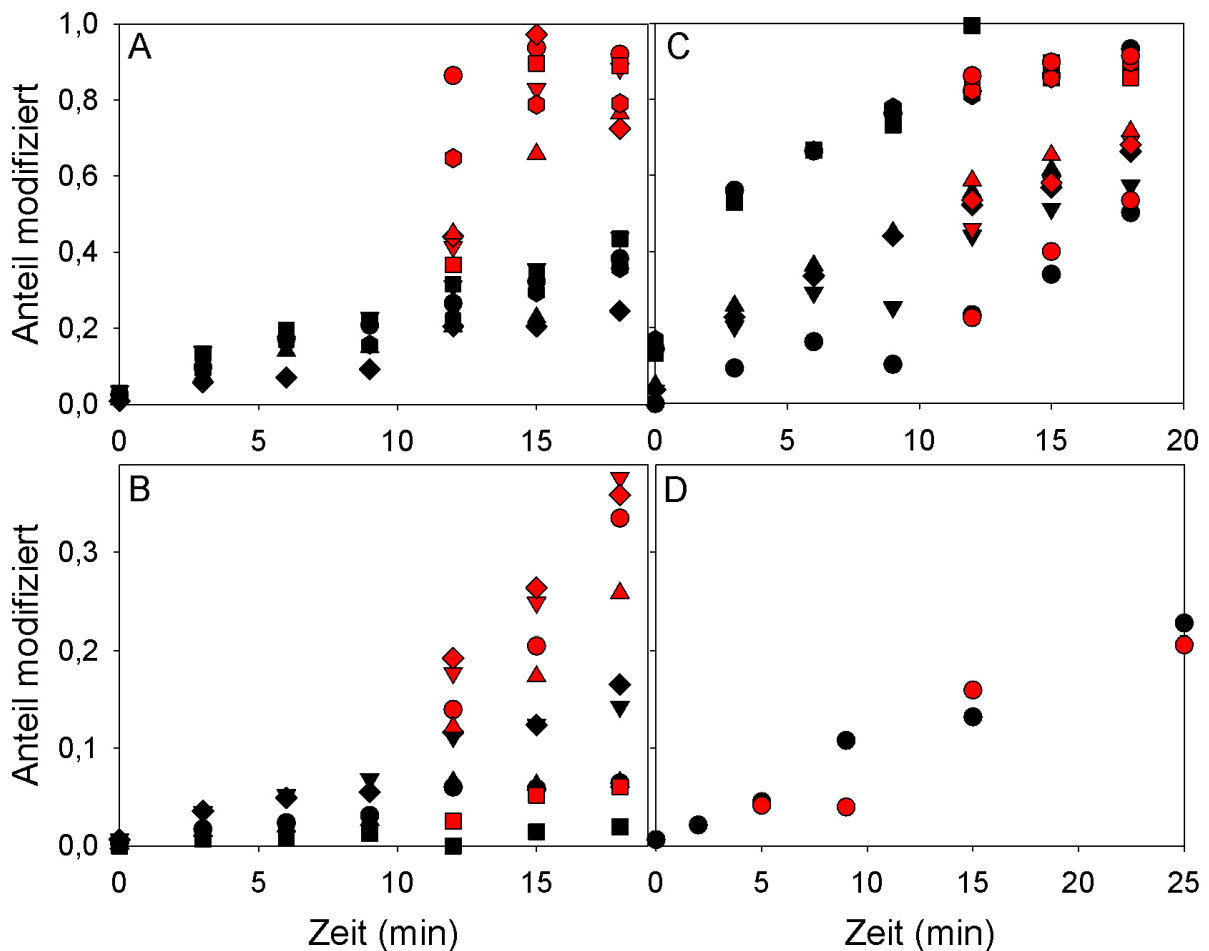


Abbildung 3.20: Modifikation einzelner SH-Gruppen in thio-GCAP-2 mittels 4 mM IAA. Der IAA-modifizierte Anteil verschiedener repräsentative Peptide (siehe Legende im Anhang) die Cys 35 (A) und Cys 111 (B), Cys 131 (C) und die 12-Mercaptododecansäure (D) enthielten, sind in Anwesenheit von Ca^{2+} (schwarz) dargestellt. Für A-C wurde die Probe nach 9 min, für D bereits nach 2 min, aufgeteilt und das Ca^{2+} entzogen (rot).

Dazu wurde GCAP-2 mit dem thiolreaktiven Agens Iodacetamid (IAA) inkubiert. Cysteine bzw. die zusätzliche Thiolgruppe an der artifiziellen Fettsäure wurden so kovalent und irreversibel modifiziert. Diese Reaktion wurde nach verschiedenen Zeiten durch Absenken des pH-Wertes abgestoppt. Aufgrund des sauren pH wurde Pepsin zur Proteolyse von myr-GCAP-2 und thio-GCAP-2 eingesetzt. Die entstandenen Peptide wurden mittels *reversed*

phase HPLC aufgetrennt. Mittels ESI-Orbitrap wurden die carboxyamidomethylierten und unmodifizierten Peptide quantifiziert. Zur Auswertung wurden pro Cystein vier verschiedene Peptide ausgewertet. Der Anteil carboxyamidomethyliertes Peptid ist für die jeweilige SH-Gruppe in Abbildung 3.20 dargestellt. Dieses Experiment wurde zusammen mit Dr. Christian Ihling (MLU) durchgeführt.

Wieder zeigte sich, dass alle Cysteine auch in Anwesenheit von Ca^{2+} umgesetzt werden. Die Thiolgruppen von Cys 35 und Cys 111 erfuhren eine Beschleunigung der Umsatzgeschwindigkeit nach Dissoziation von Ca^{2+} , während Cys 131 und die zusätzliche SH-Gruppe an der Fettsäure unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Ca^{2+} gleich schnell modifiziert wurde. Obwohl im DTNB-Assay (3.6.2.3) die zusätzliche SH-Gruppe sehr schnell reagiert, wurde mittels der semi-quantitativen Methode LC/MS nur ein 25 %iger Umsatz nach 25 min detektiert.

Die Ca^{2+} -abhängige Modifikation der Cysteine war für myr-GCAP-2- und thio-GCAP-2 identisch (nicht gezeigt).

3.6.3 Bedeutung des N-Terminus für die Regulation der ROS-GC

Die bisherigen Experimente belegen, dass sich durch Ca^{2+} -Bindung/Dissoziation eine Konformationsänderung vollzieht, die sich auf verschiedene Bereiche von GCAP-2 auswirkt. Davon betroffen ist unter anderem der N-Terminus, der eine Fettsäuremodifikation trägt. Dieser scheint zwar auch im Ca^{2+} -gebundenen Zustand zugänglich zu sein, verlagert aber seine Position nach Ca^{2+} -Dissoziation in eine weniger hydrophobe Umgebung. Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus eine Rolle bei der Regulation der GC spielt.

Um zu überprüfen, ob der N-Terminus an der Aktivierung der ROS-GC1 beteiligt ist, wurde ein Peptid, das den ersten 19 Aminosäuren von GCAP-2, einschließlich Myristoylgruppe, entsprach (myr-NT), zu rekombinant hergestellter ROS-GC1 gegeben. Myr-NT war in der Lage, die Aktivität der ROS-GC1 zu stimulieren. Bei einer Konzentration von 500 μM wurde die gleiche Steigerung der Basalaktivität gemessen, wie sie durch 10 μM GCAP erreicht wurde. Myr-NT war also in der Lage, allein die ROS-GC voll zu aktivieren. Der EC_{50} -Wert der Aktivierung lag bei einer Peptidkonzentration von ca. 200 μM .

Gleichzeitig wurde untersucht, ob myr-NT in der Lage war, bei Anwesenheit von myr-GCAP-2 im Ca^{2+} -freien sowie im Ca^{2+} -gebundenen Zustand die Aktivität rekombinant hergestellter ROS-GC1 zu modulieren.

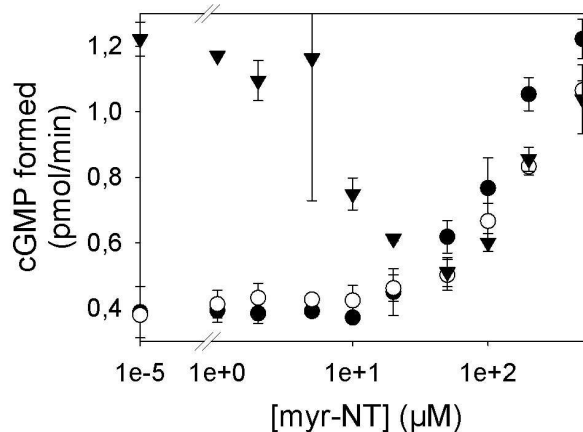


Abbildung 3.21: Einfluss des N-terminalen Peptids auf die Aktivität der ROS-GC1. Gebildete Menge an cGMP durch in HEK 293 exprimierte ROS-GC1 durch Inkubation der Membranfraktion mit myr-NT allein (●), zusätzlich mit 10 µM myr-GCAP-2 in Anwesenheit 0,6 µM CaCl₂ (○) oder zusätzlich mit 10 µM myr-GCAP-2 in Anwesenheit 0,6 µM EGTA (▼).

In Anwesenheit von 10 µM GCAP-2 und Ca²⁺ wurde die gleiche Menge cGMP gebildet, wie in Anwesenheit von myr-NT allein. Allerdings wurden hier, gerade bei höheren Peptidkonzentrationen, etwas geringere ROS-GC1 Aktivitäten bestimmt. Dies könnte durch die inhibitorischen Eigenschaften von Ca²⁺-gebundenem GCAP-2 begründet sein.

In Abwesenheit von Ca²⁺ ist die Aktivität der ROS-GC1 durch 10 µM GCAP-2 bereits maximal. Überraschenderweise führte die Zugabe von myr-NT zu einer Verringerung auf nahezu Basalaktivität. Der IC₅₀ dieser Inhibierung lag bei 10 µM und damit äquimolar zum eingesetzten GCAP-2. Bei höheren Konzentrationen konnte die ROS-GC1 wieder maximal aktiviert werden.

Somit ist myr-NT für die Aktivierung der ROS-GC1 ausreichend, kann aber auch die Wirkung von Ca²⁺-freien GCAP-2 unterdrücken. Diese Konkurrenz fand schon bei 20-fach niedrigerer Konzentration als der EC₅₀ der vollen Aktivierung durch myr-NT statt.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Konkurrenz der ROS-GC1-Aktivierung um eine Bindung des myr-NT an GCAP-2 selbst handelt, wurde ein Koelutionsexperiment durchgeführt. Dazu wurde GCAP-2 in Abwesenheit von Ca²⁺ mit myr-NT inkubiert und über eine Größenausschlusschromatographie getrennt. Das Elutionsprofil wurde mit denen gleicher Mengen von GCAP-2 bzw. myr-NT allein verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.22 gezeigt.

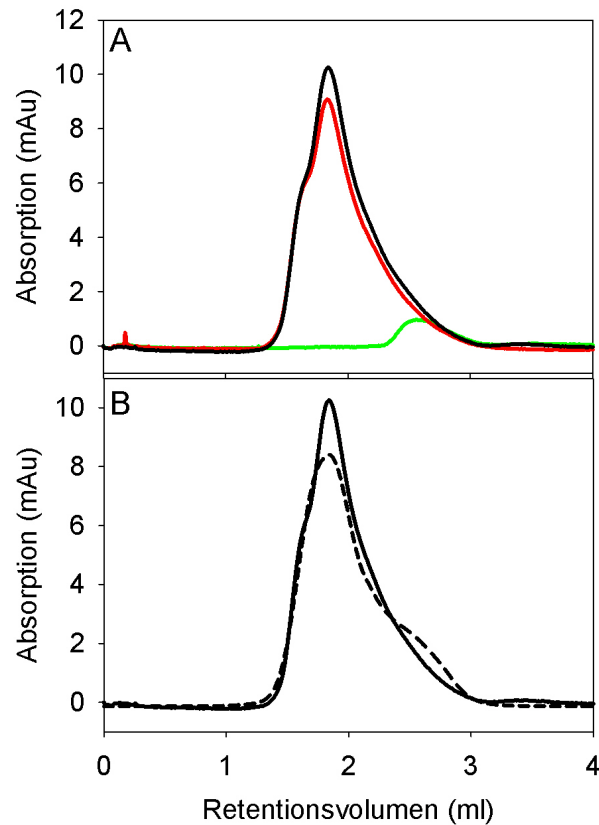


Abbildung 3.22: myr-NT koeluiert mit GCAP-2 in einer Größenausschlusschromatographie. (A) Myr-GCAP-2 allein (rot), myr-NT allein (grün) und myr-GCAP-2 und myr-NT zusammen (schwarz) wurden in Gegenwart von 1 mM EGTA auf einer S75 separiert. (B) Das erwartete, theoretische Profil bei unabhängiger Migration auf der Säule (gestrichelt) ist dem experimentellen Elutionsprofil (schwarz) gegenübergestellt.

Durch einen abgeschätzten Anteil von ca. 20 % Dimer und ein *tailing* eluierte GCAP-2 über ein relativ großes Retentionsvolumen. Das Maximum des Elutionsprofils von GCAP-2 wurde mit 1,83 ml bestimmt, das Retentionsvolumen von myr-NT mit 2,56 ml. Bei der Trennung einer Mischung aus GCAP-2 und myr-NT war die Signalintensität des Peaks bei der Retentionszeit von 1,83 ml erhöht. Die Peakform blieb identisch. Der Peak bei 2,56 ml wurde nicht mehr detektiert. Es ist also anzunehmen, dass myr-NT mit dem etwa zehnfach größeren GCAP-2 koeluierte.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden myr-GCAP-2, myr_D-GCAP-2, non-myr-GCAP-2 und thio-GCAP-2 erfolgreich hergestellt. Die N-terminale Acylierung wurde dabei durch Koexpression mit NMT1 und Zugabe der jeweiligen Fettsäure ins Medium erreicht. Dass es gelingt, durch Zugabe von deuterierter Myristinsäure bzw. 12-Mercaptododecansäure fast ausschließlich damit modifiziertes GCAP-2 zu erhalten, deutet darauf hin, dass der zelleigene Myristoyl-CoA-Pool relativ klein ist.

Des Weiteren ist die Substratspezifität der NMT1 nicht auf Myristinsäure beschränkt. So wird auch der Einbau anderer, vor allem kürzerer, Fettsäuren erlaubt [137]. Daher überrascht es nicht, dass die NMT1 auch 12-Mercaptododecansäure als Substrat akzeptiert. Gleichzeitig fällt kein myr-GCAP-2 als Verunreinigung an.

Der Einbau einer Dodecansäure ist durchaus nicht artifiziell. Auch mit kürzeren, zum Teil ungesättigten Fettsäuren modifiziertes GCAP wird in der Retina gefunden. Die Modifikation mit Dodecansäure macht dabei mehr als 10 % aus [31]. Weiterhin konnte für Neurocalcin δ gezeigt werden, dass sein Myristoyl-*switch* und seine membranbindenden Eigenschaften nicht durch Modifikation mit einer kürzeren oder längeren Fettsäure verändert werden [138].

4.1 Eigenschaften der GCAP-2-Varianten

Das erstmalig hergestellte thio-GCAP-2 unterschied sich funktionell nicht von myr-GCAP-2. Sowohl myr-GCAP-2 als auch thio-GCAP-2 entsprachen in ihren biophysikalischen Eigenschaften denen für myr-GCAP-2 in der Literatur beschriebenen. So konnte für beide Proteinvarianten eine durch Bindung von Ca^{2+} hervorgerufene Erhöhung des Helixanteils mittels fern-UV-CD-Spektroskopie gezeigt werden. Dieses Verhalten ist für GCAP-2 bereits beschrieben [98] und wurde u.A. auch für Recoverin beobachtet [139]. Dass GCAP-2 Ca^{2+} -abhängig seine Konformation ändert, belegt außerdem die durch Ca^{2+} -induzierte Veränderung der Mobilität im SDS-Gel [76], die auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. Auch konnten myr-GCAP-2 und thio-GCAP-2 die Aktivität rekombinant hergestellter ROS-GC1 modulieren. Dabei wurden ähnliche Werte bestimmt, wie in der Literatur beschrieben [118]. Eine Oligomerisierung von GCAP-2 in Abwesenheit von Ca^{2+} , wie sie in der Literatur beschrieben ist [113;114], wurde ebenfalls beobachtet. Davon ausgehend, dass nur zwei Spezies, Monomer und Dimer, vorlagen, ergab sich aus dem apparenten Molekulargewicht unter den physiologisch relevanten Bedingungen ein Dimeranteil von 25 %. Die dabei verwendete Proteinkonzentration entsprach mit 4,4 μM etwa der vermuteten Konzentration

von GCAP-2 in der Zelle [100]. Dennoch könnten *molecular crowding* sowie Wechselwirkungspartner in der Zelle zu einem höheren Anteil an Dimeren GCAP-2 führen, weshalb ein dadurch induzierter Aktivierungsmechanismus der ROS-GC [113] nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Genausogut könnte die Oligomerisierung ein *in-vitro*-Artefakt sein. Durch Zugabe von 1,25 M GuHCl ließ sich jegliche Oligomerisierung unterdrücken. Zusammen mit der vollständigen Reversibilität der Faltung/Entfaltung und der Tatsache, dass mit zwei verschiedenen spektroskopischen Methoden ein- und derselbe Übergangsmittelpunkt ermittelt wurde, erlaubte dies die Verwendung eines Zwei-Zustands-Modell zur Auswertung der Übergangskurven.

Dass sich die Faltung/Entfaltung eines Protein dieser Größe durch ein Zwei-Zustands-Modell beschreiben lässt, ist ungewöhnlich. Für CaM, das aus zwei Domänen aufgebaut ist, wurden zwei Übergänge beobachtet [140]. Verglichen mit CaM [16] weist GCAP-2 [14] auch eine deutlich kompaktere Struktur auf. Es ist durchaus denkbar, dass die Domänen, die in CaM durch die zentrale Helix getrennt sind, durch ihre räumliche Nähe in GCAP-2 stark miteinander interagieren und deshalb nicht mehr unabhängig voneinander entfalten. Bei NCS-1 allerdings, dessen Struktur ähnlich kompakt ist [141], ließ sich die Faltung/Entfaltung durch ein Drei- bzw. Vier-Zustands-Modell im Ca^{2+} -gebundenen Zustand am besten beschreiben [142;143].

Die thermodynamische Stabilität war für GCAP-2 deutlich geringer als für CaM und NCS-1. Für CaM ergibt sich in Abwesenheit von Ca^{2+} eine globale thermodynamische Stabilität von 21,4 kJ/mol [140]. Das ist fast doppelt so viel wie für GCAP-2 ermittelt. Auf die einzelnen Domänen entfallen dabei 6 kJ/mol bzw. 15,4 kJ/mol [140].

Auch die Parameter, die die Kooperativität der chemisch (m-Wert) und thermisch ($\Delta C_p U$) induzierten Faltung/Entfaltung ausdrücken, waren deutlich geringer als für CaM und NCS-1 [140;142]. Diese gelten außerdem als Maß für die Änderung der (hydrophoben [135;136;144]) lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (ΔASA) zwischen den nativen und entfalteten Zustand [136;145], wobei $\Delta C_p U$ als genaueres Maß gilt. Anhand von $\Delta C_p U$ kann nach Myers et al. [136] die ΔASA berechnet werden. In Abwesenheit von Ca^{2+} ergeben sich hier $\sim 1500 \text{ \AA}^2$. Dies ist ein sehr kleiner Wert für ein Protein dieser Größe. Erwarten würde man eine ΔASA von mehr als 18.000 \AA^2 für ein Protein mit 204 Aminosäuren [136]. Geht man davon aus, dass im entfalteten Zustand alle Reste lösungsmittlexponiert vorliegen, sind demnach bereits im nativen Zustand zahlreiche hydrophobe Reste auf der Oberfläche von GCAP-2 exponiert. Das erklärt die starke Membran- und ANS-Bindung.

4.1.1 Einfluss der Liganden Ca^{2+} und Mg^{2+}

Durch Ca^{2+} -Bindung erhöht sich die thermodynamische Stabilität von GCAP-2. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Stabilitätsuntersuchungen an CaM [140] und NCS-1 [142;143]. Die Bindung eines Liganden, z.B. Ca^{2+} , die im entfalteten Zustand schwächer ist, trägt zur Erhöhung der thermodynamischen Stabilität bei [146]. Dabei ist jedoch der Beitrag zur thermodynamischen Stabilisierung durch Ca^{2+} -Bindung bei GCAP-2 kleiner als bei NCS-1 oder CaM. Insgesamt wird myristoyliertes NCS-1 durch Ca^{2+} -Bindung um mehr als 14,5 kJ/mol stabilisiert [142], CaM sogar um fast 21 kJ/mol [140]. Dagegen ist die Stabilisierung von myr-GCAP-2 durch Ca^{2+} -Bindung mit ca. 7,5 kJ/mol eher gering, was wahrscheinlich daran liegen könnte, dass die Entfaltung nicht oder nur partiell zum Verlust der Ca^{2+} -Bindung führt.

Durch Ca^{2+} -Bindung erhöht sich auch die Kooperativität der Faltung/Entfaltung. Diese Erhöhung deutet darauf hin, dass durch Ca^{2+} -Bindung die lösungsmittelzugängliche, hydrophobe Oberfläche im nativen Zustand verringert wird, verglichen mit der Ca^{2+} -freien Form. Bestätigt wird das dadurch, dass GCAP-2 im Ca^{2+} -gebundenen Zustand schlechter an Liposomen bindet. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass sich das ANS-Signal nicht deutlich durch die Bindung von Ca^{2+} verkleinert. Dies wurde auch von Gorczyca et al. beobachtet [99]. Möglicherweise sind die zusätzlichen exponierten hydrophoben Reste nicht in größeren, hydrophoben Bereichen assoziiert. Dass ANS nicht an einzelne hydrophobe Reste, sondern nur an größeren, hydrophoben Bereiche bindet, kann als Erklärung dienen, erklärt aber trotzdem nicht die Diskrepanz zu den unterschiedlichen Kooperativitäten im Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -gebundenen Zustand.

Obwohl durch Bindung von Ca^{2+} die Kooperativität der Faltung/Entfaltung erhöht wurde, waren die bestimmten m- und $\Delta\text{C}_p\text{U}$ -Werte immer noch vergleichsweise gering. Für myr-GCAP-2 ergab sich aus dem $\Delta\text{C}_p\text{U}$ -Wert eine ΔASA von ca. 2.600 \AA^2 . Das bedeutet nicht, dass GCAP-2 wenig hydrophobe Reste besitzt. Im Gegenteil, GCAP-2 besitzt zahlreiche hydrophobe Reste. Diese Reste sind bereits im nativen Zustand auf der Protein-Oberfläche exponiert [14]. Das und die geringe thermodynamische Stabilität, die weit geringer ist als für globuläre Proteine dieser Größe, deutet darauf hin, dass GCAP-2 einen Bindungspartner misst. Die ROS-GC, an die GCAP-2 unter physiologischen Bedingungen Ca^{2+} -unabhängig gebunden zu sein scheint, könnte dieser Bindungspartner sein.

Obwohl Mg^{2+} im Ca^{2+} -freien Zustand an GCAP-2 bindet [101], erhöht es dessen Stabilität nicht. Ähnliches wurde für NCS-1 beobachtet. Das Apo-NCS-1 unterscheidet sich in seiner

thermodynamischen Stabilität nicht vom Mg^{2+} -gebundenen NCS-1 [143]. Dies kann durch die um ca. drei Größenordnungen niedrigeren Mg^{2+} -Affinitäten im Vergleich zu den Ca^{2+} -Affinitäten begründet werden. Eine deutlich kleinere Stabilisierung als für Ca^{2+} wird erwartet, falls es durch Denaturierung zum Verlust der Bindung kommt.

4.1.2 Einfluss der Myristoylgruppe

In Abwesenheit von Ca^{2+} trägt die Myristoylgruppe weder zu einer Erhöhung der thermodynamischen Stabilität bei, noch wird die Kooperativität der Faltung/Entfaltung durch diese Gruppe verändert. Für non-myr-GCAP-2 ist ΔASA unter dieser Bedingung identisch. Deshalb wird in Abwesenheit von Ca^{2+} die gleiche Kooperativität als auch thermodynamische Stabilität gemessen. Es ist daher anzunehmen, dass die Myristoylgruppe im Ca^{2+} -freien Zustand nicht im Inneren des Proteins verborgen vorliegt. Auch wurde ein stärkeres ANS-Signal für das Ca^{2+} -freie myr-GCAP-2 gemessen, als für non-myr-GCAP-2. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Myristoylgruppe zugänglich ist. Weiterhin kann die Myristoylgruppe in Membranen vorliegen. Zusätzlich kann anhand des isotropen Signals im Festkörper 2H Spektrum vermutet werden, dass die Myristoylgruppe, wenn sie nicht in der Membran vorliegt, vermutlich lösungsmittlexponiert ist. Auch kann die zusätzliche SH-Gruppe an der Fettsäure von DTNB und IAA modifiziert werden. Dass die Myristoylgruppe zumindest partiell lösungsmittlexponiert ist, wurde bereits anhand von Vergleichen mit NMR-Spektren der Myristoylgruppe von Recoverin vorgeschlagen. Allerdings wurde auch gezeigt, dass keine der theoretisch möglichen Erkennungsstellen am N-Terminus tatsächlich durch limitierte Proteolyse mit V8-Protease geschnitten wird [98], was gegen einen freien N-Terminus spricht. Es ist also anzunehmen, dass die Myristoylgruppe auf der Oberfläche des Proteins aufliegt und in ihrer Zugänglichkeit minimal beschränkt ist, was sich auch in den reduzierten Umsatzraten der zusätzlichen Thiolgruppe im Vergleich zur voll zugänglichen Thiolgruppe des Cys 131 widerspiegelt.

Bisherige Untersuchungen zur Lokalisation der Fettsäure im Ca^{2+} -freien Zustand beschränkten sich auf GCAP-1 und dabei auf die Verwendung der Fluoreszenzsonde 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol, die mit dem terminalen Kohlenstoffatom eines Palmitinsäurerestes verbunden war. Leider bleiben die Autoren den Beweis der Funktionalität des derartig modifizierten Proteins schuldig [97]. Durch den Einbau einer derart großen Fluoreszenzsonde sind sterische Behinderungen, sowie die Störung des hydrophoben Kerns mehr als wahrscheinlich. Selbst eine N-terminale Acylierung mit Palmitinsäure wurde für

native GCAP nicht gefunden [31] und gilt aufgrund der Substratspezifität der NMT1 als unwahrscheinlich [137]. Dennoch wurde anhand der Fluoreszenzspektren des markierten Proteins postuliert, dass die Acylgruppe von GCAP-1 auch in Abwesenheit von Ca^{2+} im Inneren des Proteins verborgen vorliegt [97].

GCAP-2 wäre nicht das einzige Protein, dass seine Acylgruppe dem Lösungsmittel exponiert. So ist zum Beispiel im Ca^{2+} -gebundenen Zustand die Myristoylgruppe von Recoverin lösungsmittel-exponiert [22]. Auch die Palmitoylgruppe von FCaBP, einem Ca^{2+} -Bindprotein aus *Trypanosoma cruzi*, scheint lösungsmittel-exponiert zu sein [147].

Im Ca^{2+} -gebundenen Zustand wurde durch die Myristoylgruppe eine Erhöhung der thermodynamischen Stabilität und der Kooperativität der Faltung/Entfaltung von GCAP-2 beobachtet. Obwohl es darauf hindeutet, dass diese Gruppe mehr hydrophobe Oberfläche bedeckt und stärker in der Struktur eingebunden ist, wurde keine signifikant langsamere Modifizierung der SH-Gruppe an der Fettsäure ermittelt. Auch war der Unterschied der ANS-Bindung von myr-GCAP-2 und non-myr-GCAP-2 signifikant, wenn auch geringer als in Abwesenheit von Ca^{2+} . Eine Erhöhung der thermodynamischen Stabilität und Kooperativität der Faltung/Entfaltung durch Myristoylierung wurde auch für NCS-1 beschrieben. Diese trat sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca^{2+} auf. In Anwesenheit von Ca^{2+} war sie deutlicher [142]. Die Myristoylkette von NCS-1 gilt aber als lösungsmittel-exponiert, da sie einer permanenten und Ca^{2+} -unabhängigen Membranlokalisation in der Zelle dient [33], aber auch keinen Einfluss auf das ^{15}N - ^1H HSQC-Spektrum von NCS-1 hat [141].

Demnach ist es durchaus möglich, dass sich durch Ca^{2+} -Bindung/Dissoziation die Myristoylgruppe in einer ähnlichen chemischen Umgebung befindet. Diese könnte in Anwesenheit von Ca^{2+} etwas hydrophober sein, was die thermodynamischen Parameter erklären würde, aber dennoch partiell zugänglich. Damit würde sich GCAP-2 strukturell von GCAP-1 unterscheiden, dessen Myristoylgruppe sich in der Kristallstruktur abgeschirmt im Inneren des Proteins befindet [97].

4.2 Konformationsänderung nach Ca^{2+} -Dissoziation

Mehrere Faktoren bestimmen die Umsatzgeschwindigkeit von Thiolgruppen. Zum einen ist es erforderlich, dass die Thiolgruppe dem Reaktionspartner zugänglich ist. Zum anderen kann eine Thiolgruppe nur reagieren, wenn sie deprotoniert, also als Thiolat vorliegt. Die Reaktionen wurden bei neutralen pH durchgeführt. Die Umsatzgeschwindigkeit hing also

stark vom lokalen pK_A -Wert der Thiolgruppe ab. So würde eine Änderung des pK_A -Werts von ca. 0,7 zu einer 5-fach schnelleren Reaktion führen. Für Thiolgruppen, die an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, würden niedrigere Umsatzgeschwindigkeiten erwartet werden [148]. Die jeweilige Lokalisation der 3 Cysteinreste in der räumlichen Struktur von GCAP-2 ist in Abbildung 4.1 dargestellt

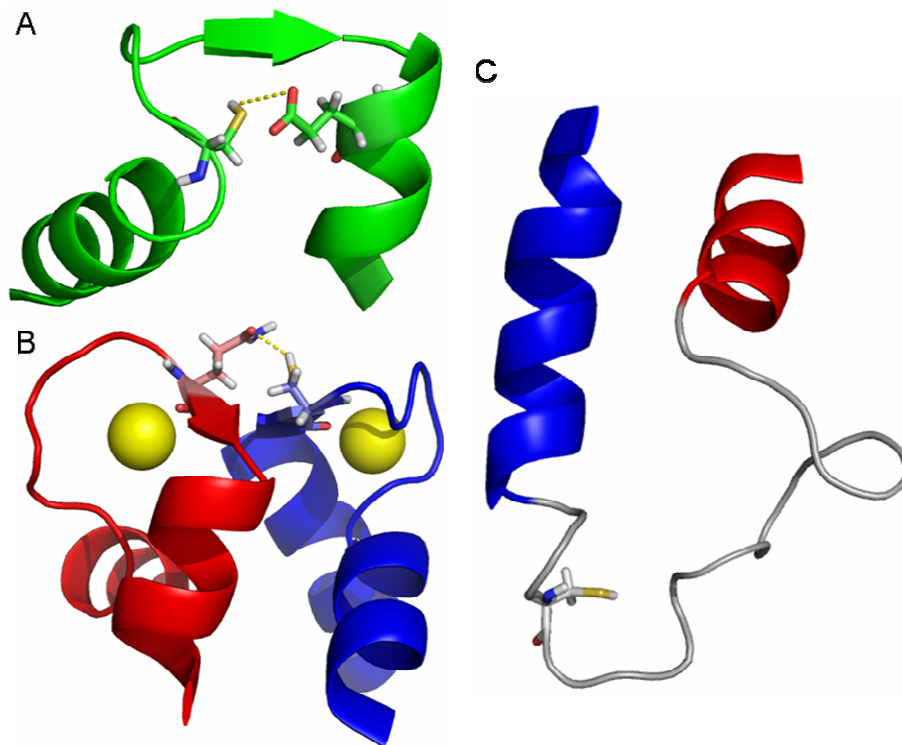


Abbildung 4.1: Molekulare Umgebung der Cysteine im Ca^{2+} -gebundenen Zustand von GCAP-2 (1JBA) [14]. (A) Cys 35 (*sticks*, links) befindet sich im *loop* der nicht funktionalen EF-Hand I (grün) und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung (gestrichelt) zu Glu 44 (*sticks*, rechts) (B) Cys 111 (*sticks*, rechts) befindet sich in EF-Hand 3 (blau) und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung (gestrichelt) zu Gln 164 (*sticks*, links) in EF-Hand 4 (rot) aus. Beide Reste koordinieren ein Ca^{2+} (gelbe Kugeln) über den Carbonylsauerstoff im Peptidrückgrat. (C) Cys 131 (*sticks*) befindet sich in einem *loop* zwischen EF-Hand 3 (blau) und EF-Hand 4 (rot). Es ist nicht in einer Wasserstoffbrückenbindung eingebunden und befindet sich zugänglich auf der Oberfläche (nach 1JBA [14]).

Cys 35 wird beschleunigt in Abwesenheit von Ca^{2+} modifiziert. Im Ca^{2+} -gebundenen Zustand liegt es in einer Wasserstoffbrückenbindung mit Glu 44 vor. In GCAP-1 entsprechen diese Positionen dem Cys 28 und Glu 37. In der Ca^{2+} -gebundenen Struktur von GCAP-1, sowie von GCAP-2, ist eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Thiolgruppe des Cysteins und der Carboxylgruppe der Glutamatseitenkette ausgebildet [14;97]. Sowohl bei GCAP-1 [106] als auch bei GCAP-2 [149] wurde gezeigt, dass der DTNB-Umsatz dieses Cysteins nach Ca^{2+} -Dissoziation gesteigert wird. Möglicherweise bricht bei der durch Ca^{2+} -Dissoziation

ausgelösten Konformationsänderung diese Wasserstoffbrückenbindung auf. Anschließend steht die Thiolgruppe als Substrat für die DTNB- bzw. IAA-Modifikation zur Verfügung.

Im Ca^{2+} -gebundenen Zustand befindet sich der N-Terminus über der C-terminalen Helix der EF-Hand 2 (siehe Abbildung 4.2). Diese Helix enthält ein Peptid, das beschrieben wurde die GCAP-2-abhängige Aktivierung der ROS-GC1 zu kompetieren [150]. Diese Helix könnte nach Ca^{2+} -Dissoziation freigelegt werden. Der N-Terminus bindet dann an eine andere Stelle im Protein, bzw. kann aus sterischen Gründen nicht mehr an diese Helix binden. Dagegen könnte das myristoylierte, N-terminale Peptid von GCAP-2 (myr-NT) an diese Helix assoziieren und so eine Bindung an die ROS-GC1 verhindern. Deshalb ist myr-NT ein Kompetitor der ROS-GC1-Aktivierung.

Folgendes Modell ist denkbar. Eine durch Ca^{2+} -Dissoziation in EF-Hand 2 ausgelöste Konformationsänderung wird auf EF-Hand 1 übertragen. Die EF-Hand 1 ist dabei eine potentielle Scharnierstelle für diese Konformationsänderung. So könnte der N-Terminus von der C-terminalen Helix der EF-Hand 2 entfernt werden.

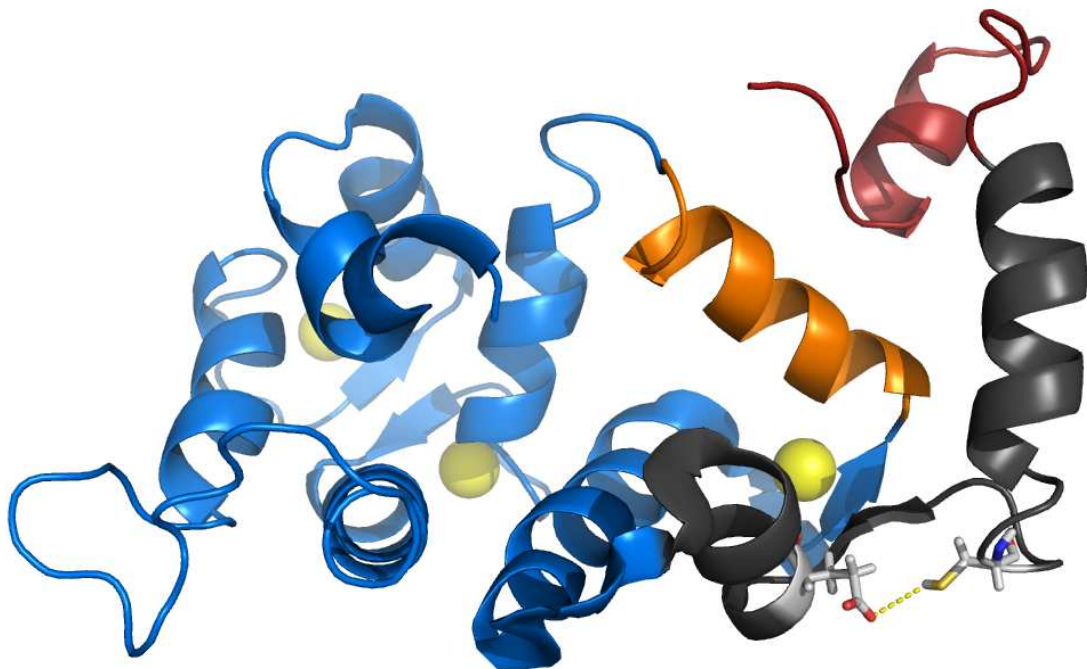


Abbildung 4.2: Der N-Terminus von GCAP-2 bedeckt die C-terminale Helix von EF-Hand 2. Die Sequenz die myr-NT repräsentiert (rot) bedeckt die C-terminale Helix von EF-Hand 2 (orange) in Anwesenheit von Ca^{2+} (gelb). Die nicht funktionale EF-Hand 1 (grau) ist eine potentielle Scharnierstelle einer Konformationsänderung nach Ca^{2+} -Dissoziation, bei der die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Cys 35 und Glu 44 (*sticks*) bricht (nach 1JBA [14]).

Dass sich in diesem Bereich eine Konformationsänderung vollzieht, wurde auch durch andere Methoden belegt. So wird nach Ca^{2+} -Dissoziation vor Glu 44 eine Schnittstelle für V8-

Protease zugänglich. Eine weitere Schnittstelle wurde in der N-terminalen Helix von EF-Hand 2 identifiziert [98].

Ein weiterer Hinweis für dieses Modell ist, dass Trp 21 von GCAP-1, das homolog zu Trp 28 in GCAP-2 ist, nach Ca^{2+} -Dissoziation lösungsmittlexponiert wird [104]. Im Ca^{2+} -gebundenen Zustand bildet dieser Rest aus der N-terminalen Helix von EF-Hand 1 hydrophobe Wechselwirkungen mit Resten aus der C-terminalen Helix von EF-Hand 2 [14].

Die durch Ca^{2+} -Dissoziation ausgelöste Konformationsänderung scheint aber nicht allein auf den N-Terminus beschränkt zu sein. So wird nach Ca^{2+} -Dissoziation auch Cys 111 beschleunigt umgesetzt. Cys 111 ist an der direkten Koordination von Ca^{2+} in EF-Hand 3 beteiligt. Die Thiolgruppe befindet sich in Anwesenheit von Ca^{2+} sehr nahe dem Gln 164, einem Rest in EF-Hand 4. Die Thiolgruppe liegt vermutlich in einer Wasserstoffbrückenbindung zur Carboxylgruppe der Glutaminsseitenkette vor und bildet eine Kontaktstelle des EF-Hand-Paares [14]. Nach Dissoziation von Ca^{2+} wird auch diese Thiolgruppe schneller umgesetzt, weil sie vermutlich nicht mehr so stark in die Wasserstoffbrückenbindung eingebaut ist. Die DTNB-Umsatzrate dieses Restes wird nach Ca^{2+} -Dissoziation gesteigert [149]. In GCAP-1 ist dieses Cystein homolog zu Cys 105. Es wurde beschrieben, dass dieser Rest ebenfalls nach Ca^{2+} -Dissoziation schneller von DTNB umgesetzt wird [106]. Zwischen der Thiolgruppe dieses Restes wird im Ca^{2+} -gebundenem Zustand ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Rest in EF-Hand 4 ausgebildet [97].

Die Umsatzkinetik von Cys 131 wird nicht beeinflusst. Es liegt lösungsmittlexponiert in einem flexiblen *loop* der EF-Hand 3 und EF-Hand 4 verbindet [14]. Cys 131 ändert vermutlich seine molekulare Umgebung nicht. Damit wurden Cystein-Mutationsstudien bestätigt, bei denen ebenfalls keine Änderung der Modifikationsrate dieses Cysteins festgestellt wurde [149].

Auch die Umsatzrate der zusätzlichen Thiolgruppe an der Fettsäure unterschied sich nicht in Abhängigkeit von Ca^{2+} . Diese Gruppe ist zugänglich für die Reaktion mit DTNB und IAA, scheint aber langsamer abzulaufen als die Modifikation von dem Ca^{2+} -unabhängig exponierten Cys 131. Das deutet darauf hin, dass die Gruppe in ihrer Zugänglichkeit, bzw. Reaktivität leicht beschränkt ist.

Ein Modell, das die Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderungen zusammenfasst, ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

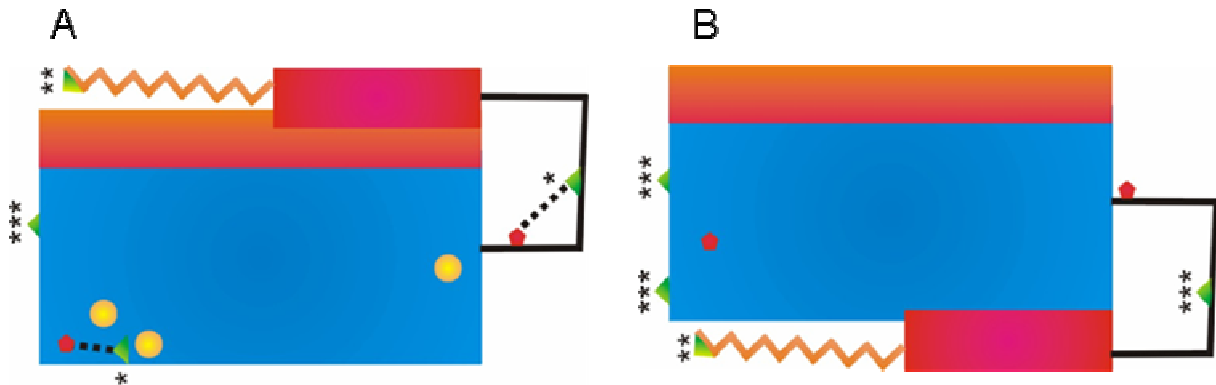


Abbildung 4.3: Modell des Ca^{2+} -gebundenen und Ca^{2+} -freien Zustandes von GCAP-2. (A) In Anwesenheit von Ca^{2+} bedeckt der N-Terminus von GCAP-2 einen hydrophoben Bereich (orange). An der Wechselwirkung ist auch der N-terminale Acylrest (orange gezackt) beteiligt. Thiolgruppen (grüne Dreiecke) weisen je nach ihrer Zugänglichkeit oder der Ausbildung von Wasserstoffbrücken (gestrichelt) zu Akzeptoren (rotes Fünfeck) unterschiedliche Reaktivitäten auf (*=langsam, **=mittel, ***=schnell). (B) Nach Ca^{2+} -Dissoziation kommt es zu zahlreichen Konformationsänderungen. Dabei brechen Wasserstoffbrückenbindungen auf und Thiolgruppen werden reaktiver. Der N-Terminus legt einen hydrophoben Bereich frei.

4.3 Mechanismus der Membranbindung

Die Myristoylierung dient nicht der Membranbindung, was auch in dieser Arbeit bestätigt wurde. Anders als Recoverin, das in Anwesenheit, aber nicht in Abwesenheit von Ca^{2+} , an Membranen bindet, assoziiert GCAP-2 verstärkt in Abwesenheit von Ca^{2+} an Lipidvesikel.

Dass GCAP-2 keinen klassischen bzw. inversen Myristoyl-*switch* vollzieht, bei dem die Myristoylgruppe in Anwesenheit von Ca^{2+} verborgen und im Ca^{2+} -freien Zustand exponiert ist, wurde bereits von anderen Gruppen vorgeschlagen [117;151].

Die Bindung an Membranen wird vermutlich ebenfalls nicht durch ionische Wechselwirkung basischer Aminosäuren mit negativ geladenen Lipidkopfguppen vermittelt, da die Erhöhung der Konzentration an negativ geladenen POPS in den eingesetzten Modellmembranen zu keiner verbesserten Bindung führte.

Die spezifische Änderung der Ordnungsparameter eines Lipids im Gemisch wurde im Falle der Bindung von Saposin C an Membranen beobachtet. Hier führte die Inkubation dieses, an negativ geladene Kopfgruppen bindenden, lysosomalen Enzyms mit Membranen zu einer stärkeren Verringerung der Ordnungsparameter für POPS. Die spezifische Bindung von Saposin C an die Phosphatidylserin-Kopfgruppe führt zu größerer Flexibilität der Acylketten

und verringert dadurch den Ordnungsparameter. Die Ordnungsparameter von POPC wurden weniger verändert [152]. Auch bei Bindung von NK-2, einem antimikrobiellen Peptid, an Membranen wurde eine Verringerung des Ordnungsparameters der Lipide errechnet. Dabei verringern sich die Ordnungsparameter der negativ geladenen Membranlipide ebenfalls stärker als die der neutral geladenen [153].

Bei der Bindung von GCAP-2 wurden allerdings die Ordnungsparameter von POPS nicht signifikant beeinflusst. Generell wurde keiner der Ordnungsparameter der Lipide im Retina-Mix durch GCAP-2-Bindung verändert, was gegen eine spezifische Interaktion GCAP-2 mit einer oder mehrerer Kopfgruppen der Membranlipide spricht.

GCAP-2 hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt von $\sim 4,8$. Unter physiologischen bzw. den Messbedingungen ist es also negativ geladen. Daher erscheint es plausibel, dass GCAP-2 nicht über elektrostatische Wechselwirkungen an Membranen bindet, die die gleiche Ladung tragen. Ähnliches wurde für NCS-1 beobachtet, das seine intrinsische Fluoreszenz stärker ändert, wenn es mit POPC-Liposomen inkubiert wird, als mit POPS [154]. NCS-1 hat einen isoelektrischen Punkt von $\sim 4,7$.

Zusammen mit der Beobachtung, dass auch die Myristoylierung nicht zur verbesserten Membranbindung beiträgt, kann vermutet werden, dass die Bindung von GCAP-2 an Membranen von hydrophoben Seitenketten vermittelt wird. So bindet das myr-NT an LUVs. Die Bindungsausbeuten wurden mit ca. 75% angegeben und sind damit fast doppelt so hoch, wie für myr-GCAP-2. Die Aminosäuren Gly 1, Phe 4 und Ala 9 des gebundenen myr-NT sind in der Lipid-Wasser-Grenzfläche lokalisiert. Ob dieses Peptid auch ohne die Myristoylgruppe an Membranen bindet, wurde nicht untersucht [155].

Das GCAP-2 zahlreiche hydrophobe Reste auf der Oberfläche präsentiert, die für eine Membranbindung in Frage kommen, wurde im Kapitel 4.1 bereits dargelegt. Die Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche nach Dissoziation von Ca^{2+} , um bis zu zwei Dritteln (Tabelle 3.6), führt zu einer verstärkten Membranbindung. Da GCAP-2 bereits im Ca^{2+} -gebundenen Zustand partiell an Membranen bindet, verstärken die zusätzlichen exponierten, hydrophoben Reste die Membranbindung. Auch eine Umorientierung hydrophober und geladener Reste könnte zur verstärkten Membranbindung führen.

Obwohl die Membranbindung durch hydrophobe Seitenketten vermittelt wird, ist die beobachtete partielle Quadrupolaufspaltung der deuterierten Myristoylgruppe von membrangebundenem GCAP-2 ein Anzeichen für eine Insertion der Lipidmodifikation in die Membran. Dabei waren die Ordnungsparameter aller Kohlenstoffpositionen der

Myristoylgruppe deutlich kleiner als die der Membranlipide aus Retina-Mix-Vesikeln. Dies ist auf die unterschiedliche Kettenlänge der Myristoylgruppe im Vergleich zu den Lipidketten im Retina-Mix zurückzuführen. So waren die Ordnungsparameter der Myristoylgruppe mit denen bei Bindung an DMPC und von DMPC selbst vergleichbar. Die Dynamik der Myristoylgruppe war also nicht von den verwendeten Lipiden abhängig. Die Ordnungsparameter der Myristoylgruppe waren bei Bindung an DMPC zwischen der 5. und 11. Kohlenstoffposition geringer als die der Membranlipide. Das ist identisch zu den Ordnungsparametern des myr-NT alleine [155]. Dass die Lipidmodifikation von Proteinen eine größere Flexibilität als die Membranlipide aufweisen kann, wurde auch für Ras beobachtet. Für die Palmitoylierung, die N-Ras permanent an Membranen bindet, wurden deutlich kleinere Ordnungsparameter bestimmt als für die Membranlipide [156]

Ein weiterer Anteil der Myristoylgruppen schien frei beweglich vorzuliegen. Dieses Signal könnte von ungebunden GCAP-2 verursacht werden, das sich zusammen mit seiner Myristoylgruppe so schnell bewegt, dass sich die Quadrupolaufspaltung nivelliert. Alternativ könnte es sich dabei um LUV gebundenes GCAP-2 handeln, dessen Myristoylgruppe nicht in der Membran verankert vorliegt, sondern frei beweglich ist.

Dieses isotrope Signal wurde auch für membrangebundenes Recoverin beobachtet, das ein sehr ähnliches ^2H -NMR-Spektrum aufweist [44]. Damit unterscheidet sich das ^2H -Spektrum der Myristoylgruppe dieser beiden NCS vom ^2H -Spektrum des myr-NT, das kein isotropes Signal zeigt [155].

Auf den ersten Blick erscheint es sehr widersprüchlich, dass die Myristoylgruppe von GCAP-2 zwar keinen signifikanten Beitrag zur Membranbindung leistet, aber trotzdem zu einem gewissen Anteil darin verankert vorliegt. Dies könnte damit begründet sein, dass zwei potentiell membranbindende Motive existieren. Eine Bindung über beide Motive zugleich könnte sterisch gehindert sein. Der Energiebeitrag einer inserierten Myristoylkette in der Membran könnte durch andere Konformationsänderungen kompensiert werden. Das erklärt auch, warum das myr-NT, das vermutlich lediglich eines der beiden membranbindenden Motive darstellt, kein isotropes Signal zeigt [155].

4.4 Regulation der ROS-GC1 durch GCAP-2

Offensichtlich wird durch die Myristoylgruppe, selbst wenn sie sich partiell zugänglich auf der Proteinoberfläche befindet, nicht die Membranbindung vermittelt [117]. GCAP-2 erfüllt in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} eine Aufgabe. Es kann die ROS-GC sowohl inhibieren als

auch aktivieren. Demnach ist es wahrscheinlich permanent an die ROS-GC, ein Membranprotein, gebunden. Dagegen dient der Myristoyl-*switch* von Recoverin der Ca^{2+} -abhängigen Membranlokalisation und damit der Ca^{2+} -abhängigen Kontrolle der Aktivität seines Zielproteins.

Die Aktivierung der ROS-GC1 wird durch den N-Terminus vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass myr-NT die ROS-GC1 im gleichen Maße aktivieren kann wie 10 μM GCAP-2. Das ist eine volle Aktivierung. Während der EC_{50} -Wert der ROS-GC1-Aktivierung durch GCAP-2 bei weniger als 5 μM liegt, wurde für myr-NT ein EC_{50} -Wert von 200 μM bestimmt. Die Affinität des myr-NT für die ROS-GC1 ist also geringer als die des gesamten GCAP-2. Das ist nicht überraschend, da das myr-NT weniger als 10 % der Sequenz von GCAP-2 repräsentiert.

Gleichzeitig war myr-NT auch in der Lage die ROS-GC1-Aktivierung durch GCAP-2 zu kompetieren. Der IC_{50} -Wert der Inhibition lag bei ca. 10 μM und damit um mehr als eine Größenordnung unter dem EC_{50} -Wert der Aktivierung durch myr-NT allein. Eine Inhibierung der GCAP-abhängigen ROS-GC-Aktivierung wurde bereits für ein N-terminales Peptid von GCAP-1 beschrieben. Dabei wurde ein nahezu identischer IC_{50} -Wert bestimmt [77].

Zusammengefasst bedeutet das, dass myr-NT die Aktivierung der ROS-GC1 auf zwei Weisen beeinflusst. Der eine Prozess hat eine vergleichsweise hohe Affinität und beeinflusst die Aktivierung durch GCAP-2. Der zweite Prozess ist unabhängig von GCAP-2 und führt zu einer Aktivierung der ROS-GC1. Dieser beruht vermutlich auf der direkten Wechselwirkung des myr-NT mit dem ROS-GC1-Komplex.

Dagegen findet die Inhibierung der GCAP-2-abhängigen ROS-GC1-Aktivierung durch myr-NT bei einer äquimolaren Konzentration statt. Bei diesem Prozess scheint es sich nicht um die Bindung an die ROS-GC1 und damit um die Verdrängung von GCAP-2 zu handeln. Vielmehr scheint myr-NT an GCAP-2 zu binden. So könnte es an Reste der C-terminalen Helix von EF-Hand 2 assoziieren und dadurch die Affinität von GCAP-2 zur ROS-GC1 reduzieren. Die C-terminale Helix von EF-Hand 2 wäre der Bereich, der im Ca^{2+} -gebundenen Zustand mit dem myristoylierten N-Terminus interagiert. Dies wäre analog zur Wirkungsweise von Recoverin, das nach Exposition der membranbindenden Myristoylgruppe mit Resten, die im Ca^{2+} -freien Zustand die Myristoylgruppe koordinieren, sein Zielprotein bindet [157].

Da der N-Terminus eine vergleichsweise geringe Affinität zur ROS-GC1 hat, sind noch andere Motive notwendig, um eine Bindung von GCAP-2 und damit eine Regulation der ROS-GC1 zu gewährleisten. Dabei ist denkbar, dass noch weitere Bereiche von GCAP-2 an

der Bindung beteiligt sind. Ein Modell zur Aktivierung der ROS-GC1 ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

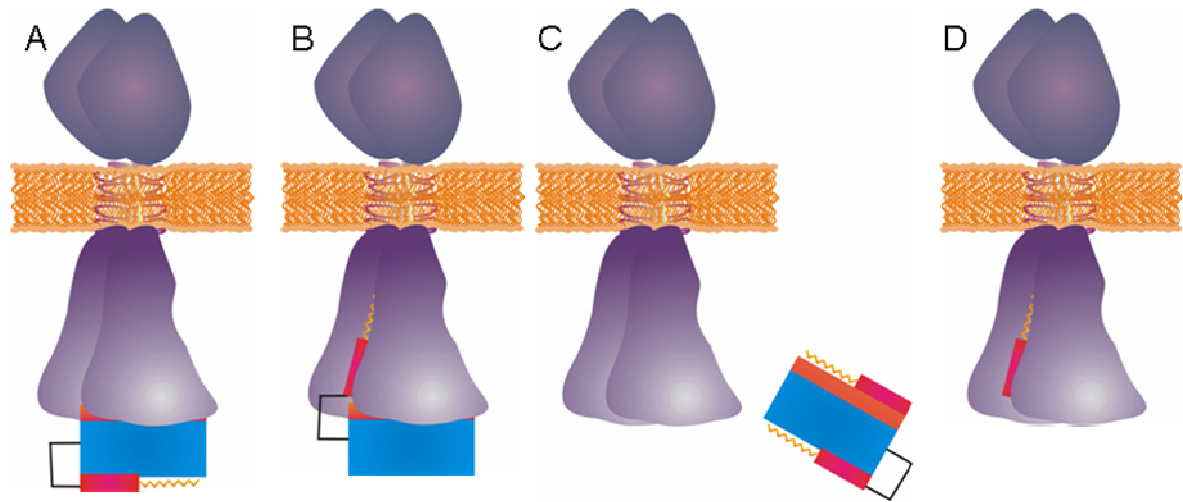


Abbildung 4.4: Modell der Aktivierung der ROS-GC1 durch GCAP-2 und die Konkurrenz durch myr-NT. (A) Die Konformationsänderung nach Ca^{2+} -Dissoziation legt einen Bereich (orange) von GCAP-2 (hellblau) frei der an die ROS-GC1 bindet. (B) Der N-Terminus (rot) kann nun an die ROS-GC1 binden und aktiviert diese. (C) Myr-NT (rot) bindet an den Bereich von GCAP-2, der die Interaktion mit der ROS-GC1 vermittelt. Dadurch dissoziiert GCAP-2. (D) Wird myr-NT in hohen Konzentration eingesetzt, bindet es an die ROS-GC1 und aktiviert diese.

Eine intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkung, die u.a. von einer Myristoylgruppe vermittelt wird, scheint auch für die Wechselwirkung von Recoverin und Caldendrin verantwortlich zu sein [158]. Analog dazu kann vermutet werden, dass die N-terminale Acylierung von GCAP-2 nicht der Membranbindung, sondern der direkten Wechselwirkung mit dem Zielprotein dient. Da gezeigt wurde, dass myr-GCAP-2 ein besserer Aktivator der ROS-GC als non-myr-GCAP-2 ist [118], könnten durch Bindung der Myristoylgruppe an die ROS-GC1 beide Untereinheiten in eine Orientierung zueinander gebracht werden, die eine effektiver Produktion von cGMP gewährleistet.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten zahlreiche Ansatzpunkte für weitere Studien. Dabei sind vor allem Experimente zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von großen, wissenschaftlichen Interesse. So wäre es sehr bedeutsam zu klären, welchen Einfluss der nicht-myristoylierte N-Terminus von GCAP-2 auf die Aktivität der ROS-GC1 und deren Aktivierbarkeit durch GCAP-2 hat. Analog dazu könnten diese Experimente auch für GCAP-1 durchgeführt werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob sich die Aktivierung der ROS-GC1 durch GCAP-1 auch durch das N-terminale Peptid von GCAP-2 inhibieren lässt und umgekehrt.

Für ein detailliertes Verständnis der Wirkungsweise der Inhibierung der ROS-GC1-Aktivierung durch myr-NT sind Wechselwirkungsstudien von myr-NT und GCAP-2 interessant. Dabei könnte man den Einfluss der Myristoylgruppe am myr-NT auf die Bindung an GCAP-2 untersuchen, indem man auch die Bindung des nicht-myristoylierten Peptids charakterisiert. Dazu bieten sich z.B. ITC-Untersuchungen an.

Da durch Zugabe von myr-NT die Löslichkeit von Ca^{2+} -freien GCAP-2 erhöht wird (persönliche Mitteilung von Stephan Theisgen, Universität Leipzig), könnte dieser physiologisch relevante, aber auf struktureller Ebene unverstandene Zustand charakterisiert werden.

Für ein besseres Verständnis des Mechanismus der ROS-GC-Regulation sind zwangsläufig Wechselwirkungsstudien mit ROS-GC oder deren Domänen erforderlich. Dabei sollte langfristig ein strukturelles Verständnis des Komplexes aus ROS-GC und GCAP angestrebt werden. Um dieses Ziel zu erreichen, ist die Expression und Reinigung der ROS-GC oder deren Domänen in großen Mengen erforderlich.

5. Referenzen

1. Berridge,M.J., Lipp,P. & Bootman,M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 11-21.
2. Berridge,M.J., Bootman,M.D. & Roderick,H.L. (2003) Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 517-529.
3. Carafoli,E. (2005) The Theodor Bucher Lecture - Calcium - a universal carrier of biological signals - Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels *Febs Journal* **272**, 1073-1089.
4. Bootman,M.D. & Berridge,M.J. (1995) The Elemental Principles of Calcium Signaling *Cell* **83**, 675-678.
5. Malgaroli,A., Milani,D., Meldolesi,J. & Pozzan,T. (1987) Fura-2 Measurement of Cytosolic Free Ca-2+ in Monolayers and Suspensions of Various Types of Animal-Cells *Journal of Cell Biology* **105**, 2145-2155.
6. Martikainen,P., Kyprianou,N., Tucker,R.W. & Isaacs,J.T. (1991) Programmed Death of Nonproliferating Androgen-Independent Prostatic-Cancer Cells *Cancer Research* **51**, 4693-4700.
7. Nicotera,P. & Orrenius,S. (1998) The role of calcium in apoptosis *Cell Calcium* **23**, 173-180.
8. Ikura,M. & Ames,J.B. (2006) Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: Two ways to promote multifunctionality *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1159-1164.
9. Kretsing,R.H. & Nockolds,C.E. (1973) Carp Muscle Calcium-Binding Protein .2. Structure Determination and General Description *Journal of Biological Chemistry* **248**, 3313-3326.
10. Strynadka,N.C.J. & James,M.N.G. (1989) Crystal-Structures of the Helix-Loop-Helix Calcium-Binding Proteins *Annual Review of Biochemistry* **58**, 951-998.
11. Donaldson,C., Barber,K.R., Kay,C.M. & Shaw,G.S. (1995) Human S100B Protein - Formation of A Tetramer from Synthetic Calcium-Binding Site Peptides *Protein Science* **4**, 765-772.
12. Haeseleer,F., Imanishi,Y., Sokal,I., Filipek,S. & Palczewski,K. (2002) Calcium-binding proteins: Intracellular sensors from the calmodulin superfamily *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**, 615-623.
13. Kawasaki,H., Nakayama,S. & Kretsinger,R.H. (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins *Biomaterials* **11**, 277-295.
14. Ames,J.B., Dizhoor,A.M., Ikura,M., Palczewski,K. & Stryer,L. (1999) Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases *Journal of Biological Chemistry* **274**, 19329-19337.

15. Gifford,J.L., Walsh,M.P. & Vogel,H.J. (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs *Biochemical Journal* **405**, 199-221.
16. Kretsinger,R.H., Rudnick,S.E. & Weissman,L.J. (1986) Crystal-Structure of Calmodulin *Journal of Inorganic Biochemistry* **28**, 289-302.
17. Ikura,M., Osawa,M. & Ames,J.B. (2002) The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function *Bioessays* **24**, 625-636.
18. Hoeflich,K.P. & Ikura,M. (2002) Calmodulin in action: Diversity in target recognition and activation mechanisms *Cell* **108**, 739-742.
19. Paterlini,M., Revilla,V., Grant,A.L. & Wisden,W. (2000) Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain *Neuroscience* **99**, 205-216.
20. Burgoyne,R.D. (2007) Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling *Nature Reviews Neuroscience* **8**, 182-193.
21. Burgoyne,R.D. (2004) The neuronal calcium-sensor proteins *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1742**, 59-68.
22. Ames,J.B., Ishima,R., Tanaka,T., Gordon,J.I., Stryer,L. & Ikura,M. (1997) Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches *Nature* **389**, 198-202.
23. Zhou,W., Qian,Y., Kunjilwar,K., Pfaffinger,P.J. & Choe,S. (2004) Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with Shal-type K⁺ channels *Neuron* **41**, 573-586.
24. Scannevin,R.H. et al. (2004) Two N-terminal domains of Kv4 K⁺ channels regulate binding to and modulation by KChIP1 *Neuron* **41**, 587-598.
25. Neubert,T.A., Johnson,R.S., Hurley,J.B. & Walsh,K.A. (1992) The Rod Transducin Alpha Subunit Amino Terminus Is Heterogeneously Fatty Acylated *Journal of Biological Chemistry* **267**, 18274-18277.
26. Dizhoor,A.M. et al. (1992) The Nh2 Terminus of Retinal Recoverin Is Acylated by A Small Family of Fatty-Acids *Journal of Biological Chemistry* **267**, 16033-16036.
27. Wilcox,C., Hu,J.S. & Olson,E.N. (1987) Acylation of Proteins with Myristic Acid Occurs Cotranslationally *Science* **238**, 1275-1278.
28. Towler,D.A. et al. (1987) Purification and Characterization of Yeast Myristoyl-Coa - Protein N-Myristoyltransferase *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 2708-2712.
29. Duronio,R.J., Towler,D.A., Heuckeroth,R.O. & Gordon,J.I. (1989) Disruption of the Yeast N-Myristoyl Transferase Gene Causes Recessive Lethality *Science* **243**, 796-800.
30. Glover,C.J., Goddard,C. & Felsted,R.L. (1988) N-Myristoylation of P60Src - Identification of A Myristoyl-Coa - Glycylpeptide N-Myristoyltransferase in Rat-Tissues *Biochemical Journal* **250**, 485-491.

31. Demar, J.C., Rundle, D.R., Wensel, T.G. & Anderson, R.E. (1999) Heterogeneous N-terminal acylation of retinal proteins *Progress in Lipid Research* **38**, 49-90.
32. McFerran, B.W., Weiss, J.L. & Burgoyne, R.D. (1999) Neuronal Ca²⁺ sensor 1 - Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca²⁺-independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca²⁺ signal transduction *Journal of Biological Chemistry* **274**, 30258-30265.
33. O'Callaghan, D.W., Ivings, L., Weiss, J.L., Ashby, M.C., Tepikin, A.V. & Burgoyne, R.D. (2002) Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of Ca²⁺ signal transduction *Journal of Biological Chemistry* **277**, 14227-14237.
34. O'Callaghan, D.W., Hasdemir, B., Leighton, M. & Burgoyne, R.D. (2003) Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca²⁺ sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K⁺ channels *Journal of Cell Science* **116**, 4833-4845.
35. Hasdemir, B., Fitzgerald, D.J., Prior, I.A., Tepikin, A.V. & Burgoyne, R.D. (2005) Traffic of Kv4 K⁺ channels mediated by KChIP1 is via a novel post-ER vesicular pathway *Journal of Cell Biology* **171**, 459-469.
36. Zozulya, S. & Stryer, L. (1992) Calcium Myristoyl Protein Switch *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 11569-11573.
37. Ladant, D. (1995) Calcium and Membrane-Binding Properties of Bovine Neurocalcin-Delta Expressed in Escherichia-Coli *Journal of Biological Chemistry* **270**, 3179-3185.
38. Spilker, C., Dresbach, T. & Braunewell, K.H. (2002) Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living hippocampal neurons *Journal of Neuroscience* **22**, 7331-7339.
39. Kobayashi, M., Takamatsu, K., Saitoh, S. & Noguchi, T. (1993) Myristoylation of Hippocalcin Is Linked to Its Calcium-Dependent Membrane Association Properties *Journal of Biological Chemistry* **268**, 18898-18904.
40. Tanaka, T., Ames, J.B., Harvey, T.S., Stryer, L. & Ikura, M. (1995) Sequestration of the Membrane-Targeting Myristoyl Group of Recoverin in the Calcium-Free State *Nature* **376**, 444-447.
41. Flaherty, K.M., Zozulya, S., Stryer, L. & McKay, D.B. (1993) 3-Dimensional Structure of Recoverin, A Calcium Sensor in Vision *Cell* **75**, 709-716.
42. Hughes, R.E., Brzovic, P.S., Klevit, R.E. & Hurley, J.B. (1995) Calcium-Dependent Solvation of the Myristoyl Group of Recoverin *Biochemistry* **34**, 11410-11416.
43. Peitzsch, R.M. & Mclaughlin, S. (1993) Binding of Acylated Peptides and Fatty-Acids to Phospholipid-Vesicles - Pertinence to Myristoylated Proteins *Biochemistry* **32**, 10436-10443.

44. Valentine,K.G., Mesleh,M.F., Opella,S.J., Ikura,M. & Ames,J.B. (2003) Structure, topology, and dynamics of myristoylated recoverin bound to phospholipid bilayers *Biochemistry* **42**, 6333-6340.
45. Kim,J.Y., Blackshear,P.J., Johnson,J.D. & Mclaughlin,S. (1994) Phosphorylation Reverses the Membrane Association of Peptides That Correspond to the Basic Domains of Marcks and Neuromodulin *Biophysical Journal* **67**, 227-237.
46. Mclaughlin,S. & Aderem,A. (1995) The Myristoyl-Electrostatic Switch - A Modulator of Reversible Protein-Membrane Interactions *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 272-276.
47. Mo,Y. et al. (2003) Interfacial basic cluster in annexin V couples phospholipid binding and trimer formation on membrane surfaces *Journal of Biological Chemistry* **278**, 2437-2443.
48. Resh,M.D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1451**, 1-16.
49. Zhang,F.L. & Casey,P.J. (1996) Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences *Annual Review of Biochemistry* **65**, 241-269.
50. Kinoshita,T., Fujita,M. & Maeda,Y. (2008) Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: Recent progress *Journal of Biochemistry* **144**, 287-294.
51. Ratto,G.M., Payne,R., Owen,W.G. & Tsien,R.Y. (1988) The Concentration of Cytosolic Free Calcium in Vertebrate Rod Outer Segments Measured with Fura-2 *Journal of Neuroscience* **8**, 3240-3246.
52. Graykeller,M.P. & Detwiler,P.B. (1994) The Calcium Feedback Signal in the Phototransduction Cascade of Vertebrate Rods *Neuron* **13**, 849-861.
53. Sampath,A.P., Matthews,H.R., Cornwall,M.C. & Fain,G.L. (1998) Bleached pigment produces a maintained decrease in outer segment Ca²⁺ in salamander rods *Journal of General Physiology* **111**, 53-64.
54. Muller,F. & Kaupp,U.B. (1998) Signal transduction in photoreceptors *Naturwissenschaften* **85**, 49-61.
55. Wensel,T.G. (2008) Signal transducing membrane complexes of photoreceptor outer segments *Vision Research* **48**, 2052-2061.
56. Norton,A.W., D'Amours,M.R., Grazio,H.J., Hebert,T.L. & Cote,R.H. (2000) Mechanism of transducin activation of frog rod photoreceptor phosphodiesterase - Allosteric interactions between the inhibitory gamma subunit and the noncatalytic cGMP-binding sites *Journal of Biological Chemistry* **275**, 38611-38619.
57. Mou,H.M., Grazio,H.J., Cook,T.A., Beavo,J.A. & Cote,R.H. (1999) cGMP binding to noncatalytic sites on mammalian rod photoreceptor phosphodiesterase is regulated by binding of its gamma and delta subunits *Journal of Biological Chemistry* **274**, 18813-18820.

58. D'Amours,M.R. & Cote,R.H. (1999) Regulation of photoreceptor phosphodiesterase catalysis by its non-catalytic cGMP-binding sites *Biochemical Journal* **340**, 863-869.
59. Wilson,E.M. & Chinkers,M. (1995) Identification of Sequences Mediating Guanylyl Cyclase Dimerization *Biochemistry* **34**, 4696-4701.
60. Jaleel,M., Saha,S., Shenoy,A.R. & Visweswariah,S.S. (2006) The kinase homology domain of receptor guanylyl cyclase C: ATP binding and identification of an adenine nucleotide sensitive site *Biochemistry* **45**, 1888-1898.
61. Yang,R.B. & Garbers,D.L. (1997) Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers *Journal of Biological Chemistry* **272**, 13738-13742.
62. Ogawa,H., Qiu,Y., Ogata,C.M. & Misono,K.S. (2004) Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain - Rotation mechanism for transmembrane signal transduction *Journal of Biological Chemistry* **279**, 28625-28631.
63. Yu,S., Avery,L., Baude,E. & Garbers,D.L. (1997) Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: A new family of chemosensory receptors *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3384-3387.
64. Schulz,S., Wedel,B.J., Matthews,A. & Garbers,D.L. (1998) The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor *Journal of Biological Chemistry* **273**, 1032-1037.
65. Bondarenko,V.A., Hayashi,F., Usukura,J. & Yamazaki,A. (2010) Involvement of rhodopsin and ATP in the activation of membranous guanylate cyclase in retinal photoreceptor outer segments (ROS-GC) by GC-activating proteins (GCAPs): a new model for ROS-GC activation and its link to retinal diseases *Molecular and Cellular Biochemistry* **334**, 125-139.
66. Duda,T., Jankowska,A., Venkataraman,V., Nagele,R.G. & Sharma,R.K. (2001) A novel calcium-regulated membrane guanylate cyclase transduction system in the olfactory neuroepithelium *Biochemistry* **40**, 12067-12077.
67. Duda,T., Krishnan,R. & Sharma,R.K. (2006) GCAP1: Antithetical calcium sensor of ROS-GC transduction machinery *Calcium Binding Proteins* **1**, 102-107.
68. Young,J.M., Waters,H., Dong,C., Fulle,H.J. & Liman,E.R. (2007) Degeneration of the Olfactory Guanylyl Cyclase D Gene during Primate Evolution *Plos One* **2**.
69. Fik-Rymarkiewicz,E., Duda,T. & Sharma,R.K. (2006) Novel frequenin-modulated Ca²⁺-signaling membrane guanylate cyclase (ROS-GC) transduction pathway in bovine hippocampus *Molecular and Cellular Biochemistry* **291**, 187-204.
70. Krishnan,A., Duda,T., Pertzev,A., Kobayashi,M., Takamatsu,K. & Sharma,R.K. (2009) Hippocalcin, new Ca²⁺ sensor of a ROS-GC subfamily member, ONE-GC, membrane guanylate cyclase transduction system *Molecular and Cellular Biochemistry* **325**, 1-14.

71. Koch, K.W. (1991) Purification and Identification of Photoreceptor Guanylate-Cyclase *Journal of Biological Chemistry* **266**, 8634-8637.
72. Shyjan, A.W., Desauvage, F.J., Gillett, N.A., Goeddel, D.V. & Lowe, D.G. (1992) Molecular-Cloning of A Retina-Specific Membrane Guanylyl Cyclase *Neuron* **9**, 727-737.
73. Dizhoor, A.M., Lowe, D.G., Olshevskaya, E.V., Laura, R.P. & Hurley, J.B. (1994) The Human Photoreceptor Membrane Guanylyl Cyclase, Retgc, Is Present in Outer Segments and Is Regulated by Calcium and A Soluble Activator *Neuron* **12**, 1345-1352.
74. Imanishi, Y. et al. (2002) Characterization of retinal guanylate cyclase-activating protein 3 (GCAP3) from zebrafish to man *European Journal of Neuroscience* **15**, 63-78.
75. Gorczyca, W.A., Graykeller, M.P., Detwiler, P.B. & Palczewski, K. (1994) Purification and Physiological Evaluation of A Guanylate-Cyclase Activating Protein from Retinal Rods *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4014-4018.
76. Frins, S., Bonigk, W., Muller, F., Kellner, R. & Koch, K.W. (1996) Functional characterization of a guanylyl cyclase-activating protein from vertebrate rods - Cloning, heterologous expression, and localization *Journal of Biological Chemistry* **271**, 8022-8027.
77. Palczewski, K. et al. (1994) Molecular-Cloning and Characterization of Retinal Photoreceptor Guanylyl Cyclase-Activating Protein *Neuron* **13**, 395-404.
78. Dizhoor, A.M. et al. (1995) Cloning, Sequencing, and Expression of A 24-Kda Ca²⁺-Binding Protein Activating Photoreceptor Guanylyl Cyclase *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25200-25206.
79. Dizhoor, A.M. & Hurley, J.B. (1996) Inactivation of EF-hands makes GCAP-2 (p24) a constitutive activator of photoreceptor guanylyl cyclase by preventing a Ca²⁺-induced "activator-to-inhibitor" transition *Journal of Biological Chemistry* **271**, 19346-19350.
80. Lowe, D.G. et al. (1995) Cloning and Expression of A 2Nd Photoreceptor-Specific Membrane Retina Guanylyl Cyclase (Retgc), Retgc-2 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5535-5539.
81. Krylov, D.M., Niemi, G.A., Dizhoor, A.M. & Hurley, J.B. (1999) Mapping sites in guanylyl cyclase activating protein-1 required for regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10833-10839.
82. Haeseleer, F. et al. (1999) Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily *Journal of Biological Chemistry* **274**, 6526-6535.
83. Goracznik, R.M., Duda, T. & Sharma, R.K. (1998) Calcium modulated signaling site in type 2 rod outer segment membrane guanylate cyclase (ROS-GC2) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 447-453.

84. Imanishi, Y., Yang, L.L., Sokal, I., Filipek, S., Palczewski, K. & Baehr, W. (2004) Diversity of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in teleost fish: Characterization of three novel GCAPs (GCAP4, GCAP5, GCAP7) from zebrafish (*Danio rerio*) and prediction of eight GCAPs (GCAP1-8) in pufferfish (*Fugu rubripes*) *Journal of Molecular Evolution* **59**, 204-217.
85. Li, N. et al. (1998) Guanylate-cyclase-inhibitory protein is a frog retinal Ca²⁺-binding protein related to mammalian guanylate-cyclase-activating proteins *European Journal of Biochemistry* **252**, 591-599.
86. Margulis, A., Pozdnyakov, N. & Sitaramayya, A. (1996) Activation of bovine photoreceptor guanylate cyclase by S100 proteins *Biochemical and Biophysical Research Communications* **218**, 243-247.
87. Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 637-668.
88. Rambotti, M.G., Giambanco, I., Spreca, A. & Donato, R. (1999) S100B and S100A1 proteins in bovine retina: Their calcium-dependent stimulation of a membrane-bound guanylate cyclase activity as investigated by ultracytochemistry *Neuroscience* **92**, 1089-1101.
89. Duda, T., Goraczniak, R.M. & Sharma, R.K. (1996) Molecular characterization of S100A1-S100B protein in retina and its activation mechanism of bovine photoreceptor guanylate cyclase *Biochemistry* **35**, 6263-6266.
90. Venkataraman, V., Duda, T., Vardi, N., Koch, K.W. & Sharma, R.K. (2003) Calcium-modulated guanylate cyclase transduction machinery in the photoreceptor-bipolar synaptic region *Biochemistry* **42**, 5640-5648.
91. Duda, T., Koch, K.W., Venkataraman, V., Lange, C., Beyermann, M. & Sharma, R.K. (2002) Ca²⁺ sensor S100 beta-modulated sites of membrane guanylate cyclase in the photoreceptor-bipolar synapse *Embo Journal* **21**, 2547-2556.
92. Venkataraman, V., Duda, T., Ravichandran, S. & Sharma, R.K. (2008) Neurocalcin delta modulation of ROS-GC1, a new model of Ca²⁺ signaling *Biochemistry* **47**, 6590-6601.
93. Duda, T. & Sharma, R.K. (2004) S100B-modulated Ca²⁺-dependent ROS-GC1 transduction machinery in the gustatory epithelium: a new mechanism in gustatory transduction *Febs Letters* **577**, 393-398.
94. Venkataraman, V., Nagele, R., Duda, T. & Sharma, R.K. (2000) Rod outer segment membrane guanylate cyclase type 1-linked stimulatory and inhibitory calcium signaling systems in the pineal gland: Biochemical, molecular, and immunohistochemical evidence *Biochemistry* **39**, 6042-6052.
95. Lange, C., Duda, T., Beyermann, M., Sharma, R.K. & Koch, K.W. (1999) Regions in vertebrate photoreceptor guanylate cyclase ROS-GC1 involved in Ca²⁺-dependent regulation by guanylate cyclase-activating protein GCAP-1 *Febs Letters* **460**, 27-31.

96. Krylov,D.M. & Hurley,J.B. (2001) Identification of proximate regions in a complex of retinal guanylyl cyclase 1 and guanylyl cyclase-activating protein-1 by a novel mass spectrometry-based method *Journal of Biological Chemistry* **276**, 30648-30654.
97. Stephen,R., Bereta,G., Golczak,M., Palczewski,K. & Sousa,M.C. (2007) Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal calcium sensor, guanylate cyclase-activating protein 1 *Structure* **15**, 1392-1402.
98. Hughes,R.E., Brzovic,P.S., Dizhoor,A.M., Klevit,R.E. & Hurley,J.B. (1998) Ca²⁺-dependent conformational changes in bovine GCAP-2 *Protein Science* **7**, 2675-2680.
99. Gorczyca,W.A., Kobialka,M., Kuropatwa,M. & Kurowska,E. (2003) Ca²⁺ differently affects hydrophobic properties of guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs) and recoverin *Acta Biochimica Polonica* **50**, 367-376.
100. Hwang,J.Y. et al. (2003) Regulatory modes of rod outer segment membrane guanylate cyclase differ in catalytic efficiency and Ca²⁺-sensitivity *European Journal of Biochemistry* **270**, 3814-3821.
101. Peshenko,I.V. & Dizhoor,A.M. (2004) Guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs) are Ca²⁺/Mg²⁺ sensors - Implications for photoreceptor guanylyl cyclase (RetGC) regulation in mammalian photoreceptors *Journal of Biological Chemistry* **279**, 16903-16906.
102. Lim,S., Peshenko,I., Dizhoor,A. & Ames,J.B. (2009) Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and Myristoylation on Guanylyl Cyclase Activating Protein 1 Structure and Stability *Biochemistry* **48**, 850-862.
103. Peshenko,I.V. & Dizhoor,A.M. (2007) Activation and inhibition of photoreceptor guanylyl cyclase by guanylyl cyclase activating protein 1 (GCAP-1) *Journal of Biological Chemistry* **282**, 21645-21652.
104. Peshenko,I.V. & Dizhoor,A.M. (2006) Ca²⁺ and Mg²⁺ binding properties of GCAP-1 - Evidence that Mg²⁺-bound form is the physiological activator of photoreceptor guanylyl cyclase *Journal of Biological Chemistry* **281**, 23830-23841.
105. Ermilov,A.N., Olshevskaya,E.V. & Dizhoor,A.M. (2001) Instead of binding calcium, one of the EF-hand structures in guanylyl cyclase activating protein-2 is required for targeting photoreceptor guanylyl cyclase *Journal of Biological Chemistry* **276**, 48143-48148.
106. Hwang,J.Y., Schlesinger,R. & Koch,K.W. (2001) Calcium-dependent cysteine reactivities in the neuronal calcium sensor guanylate cyclase-activating protein 1 *Febs Letters* **508**, 355-359.
107. Payne,A.M. et al. (1998) A mutation in guanylate cyclase activator 1A (GUCA1A) in an autosomal dominant cone dystrophy pedigree mapping to a new locus on chromosome 6p21.1 *Human Molecular Genetics* **7**, 273-277.
108. Sokal,I. et al. (1998) GCAP1(Y99C) mutant is constitutively active in autosomal dominant cone dystrophy *Molecular Cell* **2**, 129-133.

109. Dizhoor,A.M., Boikov,S.G. & Olshevskaya,E.V. (1998) Constitutive activation of photoreceptor guanylate cyclase by Y99C mutant of GCAP-1 - Possible role in causing human autosomal dominant cone degeneration *Journal of Biological Chemistry* **273**, 17311-17314.
110. Olshevskaya,E.V. et al. (2004) The Y99C mutation in guanylyl cyclase-activating protein 1 increases intracellular Ca²⁺ and causes photoreceptor degeneration in transgenic mice *Journal of Neuroscience* **24**, 6078-6085.
111. Wilkie,S.E. et al. (2001) Identification and functional consequences of a new mutation (E155G) in the gene for GCAP1 that causes autosomal dominant cone dystrophy *American Journal of Human Genetics* **69**, 471-480.
112. Olshevskaya,E.V., Boikov,S., Ermilov,A., Krylov,D., Hurley,J.B. & Dizhoor,A.M. (1999) Mapping functional domains of the guanylate cyclase regulator protein, GCAP-2 *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10823-10832.
113. Olshevskaya,E.V., Ermilov,A.N. & Dizhoor,A.M. (1999) Dimerization of guanylyl cyclase-activating protein and a mechanism of photoreceptor guanylyl cyclase activation *Journal of Biological Chemistry* **274**, 25583-25587.
114. Yu,H. et al. (1999) Activation of retinal guanylyl cyclase-1 by Ca²⁺-binding proteins involves its dimerization *Journal of Biological Chemistry* **274**, 15547-15555.
115. Duda,T. et al. (1996) Calcium modulation of bovine photoreceptor guanylate cyclase *Biochemistry* **35**, 8478-8482.
116. Hwang,J.Y., Schlesinger,R. & Koch,K.W. (2004) Irregular dimerization of guanylate cyclase-activating protein 1 mutants causes loss of target activation *European Journal of Biochemistry* **271**, 3785-3793.
117. Olshevskaya,E.V., Hughes,R.E., Hurley,J.B. & Dizhoor,A.M. (1997) Calcium binding, but not a calcium-myristoyl switch, controls the ability of guanylyl cyclase-activating protein GCAP-2 to regulate photoreceptor guanylyl cyclase *Journal of Biological Chemistry* **272**, 14327-14333.
118. Hwang,J.Y. & Koch,K.W. (2002) The myristoylation of the neuronal Ca²⁺-sensors guanylate cyclase-activating protein 1 and 2 *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1600**, 111-117.
119. Orban,T. et al. (2010) Conformational Changes in Guanylate Cyclase-Activating Protein 1 Induced by Ca²⁺ and N-Terminal Fatty Acid Acylation *Structure* **18**, 116-126.
120. Chow,M., Newman,J.F.E., Filman,D., Hogle,J.M., Rowlands,D.J. & Brown,F. (1987) Myristylation of Picornavirus Capsid Protein Vp4 and Its Structural Significance *Nature* **327**, 482-486.
121. Zheng,J.H., Knighton,D.R., Xuong,N.H., Taylor,S.S., Sowadski,J.M. & Teneyck,L.F. (1993) Crystal-Structures of the Myristylated Catalytic Subunit of Camp-Dependent Protein-Kinase Reveal Open and Closed Conformations *Protein Science* **2**, 1559-1573.

122. Duronio,R.J. et al. (1990) Protein N-Myristoylation in Escherichia-Coli - Reconstitution of A Eukaryotic Protein Modification in Bacteria *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 1506-1510.
123. Lange,C. (1999) Identifizierung regulatorischer Regionen in der partikulären Guanylatzyklase aus Photorezeptoraußensegmenten ROS-GC1 *Promotion der Universität Köln*.
124. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4 *Nature* **227**, 680-&.
125. Fairbank,G., Steck,T.L. & Wallach,D.F.H. (1971) Electrophoretic Analysis of Major Polypeptides of Human Erythrocyte Membrane *Biochemistry* **10**, 2606-&.
126. Nesterenko,M.V., Tilley,M. & Upton,S.J. (1994) A Simple Modification of Blums Silver Stain Method Allows for 30 Minute Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **28**, 239-242.
127. Kang,D.H., Gho,Y.S., Suh,M.K. & Kang,C.H. (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis *Bulletin of the Korean Chemical Society* **23**, 1511-1512.
128. Bradford,M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
129. Schaffner,W. & Weissman,C. (1973) Rapid, Sensitive, and Specific Method for Determination of Protein in Dilute-Solution *Analytical Biochemistry* **56**, 502-514.
130. Vogel,A., Schröder,T., Lange,C. & Huster,D. (2007) Characterization of the myristoyl lipid modification of membrane-bound GCAP-2 by H-2 solid-state NMR spectroscopy *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1768**, 3171-3181.
131. Pace,C.N. & Shaw,K.L. (2000) Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves *Proteins-Structure Function and Genetics* 1-7.
132. Schröder,T. (2006) Liganden-abhängige Stabilität der Ca²⁺-Sensorproteine GCAP-1 & GCAP-2 *Diplomarbeit der MLU, Halle*.
133. Sreerama,N. & Woody,R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set *Analytical Biochemistry* **287**, 252-260.
134. Anderson,R.E. & Maude,M.B. (1970) Phospholipids of Bovine Rod Outer Segments *Biochemistry* **9**, 3624-&.
135. Livingstone,J.R., Spolar,R.S. & Record,M.T. (1991) Contribution to the Thermodynamics of Protein Folding from the Reduction in Water-Accessible Nonpolar Surface-Area *Biochemistry* **30**, 4237-4244.
136. Myers,J.K., Pace,C.N. & Scholtz,J.M. (1995) Denaturant M-Values and Heat-Capacity Changes - Relation to Changes in Accessible Surface-Areas of Protein Unfolding *Protein Science* **4**, 2138-2148.

137. Towler,D.A., Eubanks,S.R., Towery,D.S., Adams,S.P. & Glaser,L. (1987) Amino-Terminal Processing of Proteins by N-Myristoylation - Substrate-Specificity of N-Myristoyl Transferase *Journal of Biological Chemistry* **262**, 1030-1036.
138. Beven,L. et al. (2001) Ca²⁺-myristoyl switch and membrane binding of chemically acylated neurocalcins *Biochemistry* **40**, 8152-8160.
139. Kataoka,M., Mihara,K. & Tokunaga,F. (1993) Recoverin Alters Its Surface-Properties Depending on Both Calcium-Binding and N-Terminal Myristoylation *Journal of Biochemistry* **114**, 535-540.
140. Masino,L., Martin,S.R. & Bayley,P.M. (2000) Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin *Protein Science* **9**, 1519-1529.
141. Ames,J.B., Hendricks,K.B., Strahl,T., Huttner,I.G., Hamasaki,N. & Thorner,J. (2000) Structure and calcium-binding properties of Frq1, a novel calcium sensor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Biochemistry* **39**, 12149-12161.
142. Muralidhar,D. et al. (2005) Equilibrium unfolding of neuronal calcium sensor-1 - N-terminal myristoylation influences unfolding and reduces protein stiffening in the presence of calcium *Journal of Biological Chemistry* **280**, 15569-15578.
143. Aravind,P., Chandra,K., Reddy,P.P., Jeromin,A., Chary,K.V.R. & Sharma,Y. (2008) Regulatory and structural EF-hand motifs of neuronal calcium sensor-1: Mg²⁺ modulates Ca²⁺ binding, Ca²⁺-induced conformational changes, and equilibrium unfolding transitions *Journal of Molecular Biology* **376**, 1100-1115.
144. Privalov,P.L. & Makhatadze,G.I. (1992) Contribution of Hydration and Noncovalent Interactions to the Heat-Capacity Effect on Protein Unfolding *Journal of Molecular Biology* **224**, 715-723.
145. Courtenay,E.S., Capp,M.W., Saecker,R.M. & Record,M.T. (2000) Thermodynamic analysis of interactions between denaturants and protein surface exposed on unfolding: Interpretation of urea and guanidinium chloride m-values and their correlation with changes in accessible surface area (ASA) using preferential interaction coefficients and the local-bulk domain model *Proteins-Structure Function and Genetics* 72-85.
146. Schellman,J.A. (1987) The Thermodynamic Stability of Proteins *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **16**, 115-137.
147. Wingard,J.N. et al. (2008) Structural insights into membrane targeting by the flagellar calcium-binding protein (FCaBP), a myristoylated and palmitoylated calcium sensor in *Trypanosoma cruzi* *J Biol Chem* **283**.
148. Guo,X. et al. (2008) Partial acetylation of lysine residues improves intraprotein cross-linking *Analytical Chemistry* **80**, 951-960.
149. Helten,A. & Koch,K.W. (2007) Calcium-dependent conformational changes in guanylate cyclase-activating protein 2 monitored by cysteine accessibility *Biochemical and Biophysical Research Communications* **356**, 687-692.
150. Schrem,A., Lange,C., Beyermann,M. & Koch,K.W. (1999) Identification of a domain in guanylyl cyclase-activating protein 1 that interacts with a complex of guanylyl

- cyclase and tubulin in photoreceptors *Journal of Biological Chemistry* **274**, 6244-6249.
151. Hwang,J.Y. & Koch,K.W. (2002) Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and protein-2 *Biochemistry* **41**, 13021-13028.
 152. Abu-Baker,S., Qi,X.Y. & Lorigan,G.A. (2007) Investigating the interaction of saposin c with POPS and POPC phospholipids: A solid-state NMR spectroscopic study *Biophysical Journal* **93**, 3480-3490.
 153. Pimthon,J., Willumeit,R., Lendlein,A. & Hofmann,D. (2009) Membrane association and selectivity of the antimicrobial peptide NK-2: a molecular dynamics simulation study *Journal of Peptide Science* **15**, 654-667.
 154. Jeromin,A. et al. (2004) N-terminal myristoylation regulates calcium-induced conformational changes in neuronal calcium sensor *Journal of Biological Chemistry* **279**, 27158-27167.
 155. Theisgen,S., Scheidt,H.A., Magalhaes,A., Bonagamba,T.J. & Huster,D. (2010) A solid-state NMR study of the structure and dynamics of the myristoylated N-terminus of the guanylate cyclase-activating protein-2 *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1798**, 266-274.
 156. Reuther,G. et al. (2006) The lipidated membrane anchor of full length N-Ras protein shows an extensive dynamics as revealed by solid-state NMR spectroscopy *Journal of the American Chemical Society* **128**, 13840-13846.
 157. Ames,J.B., Levay,K., Wingard,J.N., Lusin,J.D. & Slepak,V.Z. (2006) Structural basis for calcium-induced inhibition of rhodopsin kinase by recoverin *Journal of Biological Chemistry* **281**, 37237-37245.
 158. Fries,R. et al. (2010) Dynamic cellular translocation of caldendrin is facilitated by the Ca²⁺-myristoyl switch of recoverin *Journal of Neurochemistry* **113**, 1150-1162.

6. Anhang

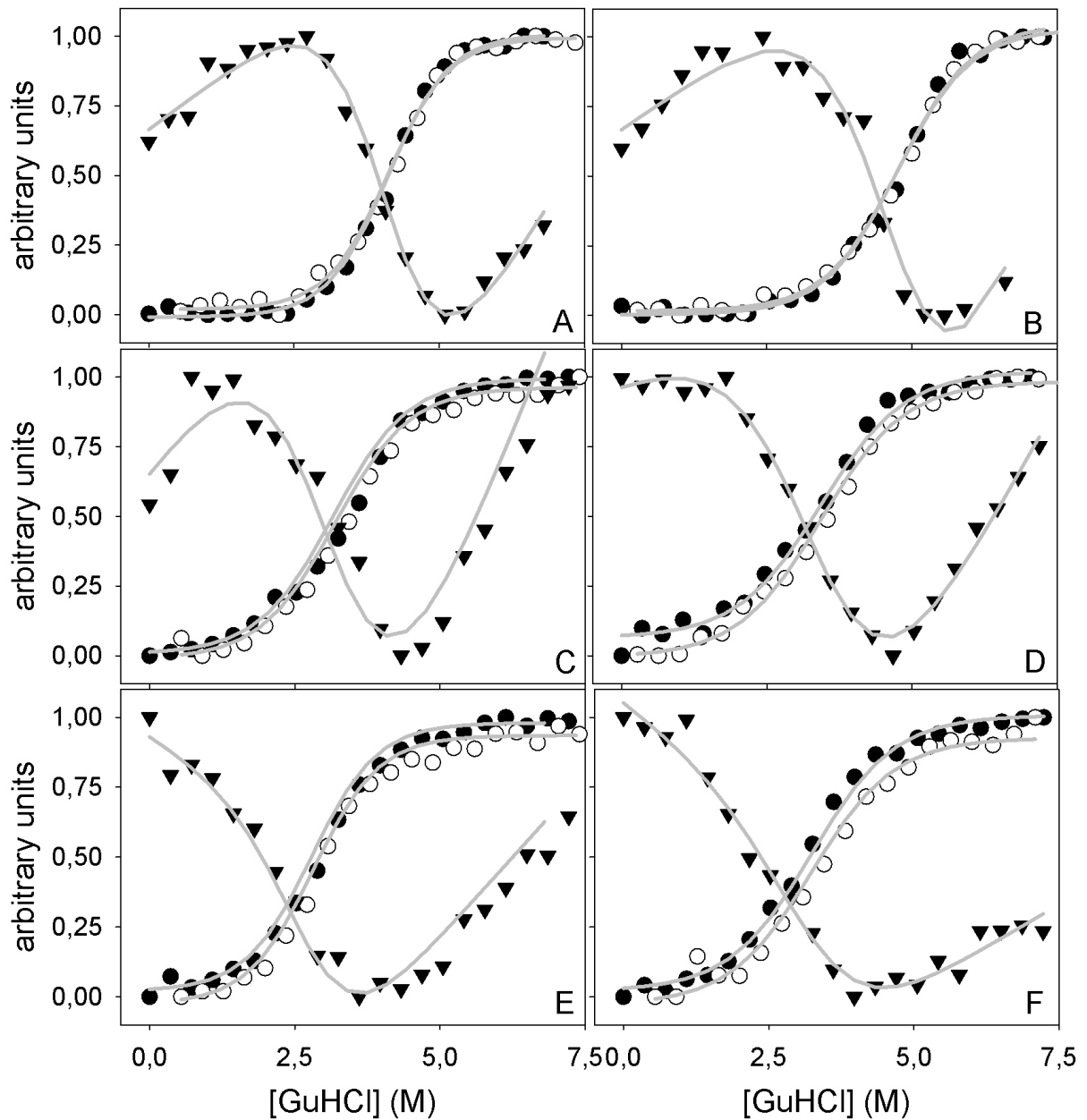


Abbildung 6.1: Chemisch induzierter Übergang von (A) myr-GCAP-2 in Anwesenheit von 1 mM Ca²⁺ und (B) mit zusätzlich 10 mM MgCl₂, (C) myr-GCAP-2 in Anwesenheit von 1 mM EGTA und (D) mit zusätzlich 10 mM MgCl₂, (E) non-myr-GCAP-2 in Anwesenheit von 1 mM EGTA und (F) mit zusätzlich 10 mM MgCl₂. Natives (●) und in 6 M GuHCl entfaltetes (○) non-myr-GCAP-2 in einer Konzentration von 0,11 mg/ml wurde 1 h bei den angegebenen GuHCl Konzentrationen inkubiert. Das CD-Signal bei 222 nm wurde aufgenommen und über 24 s gemittelt. Alternativ wurden 16 µg/ml natives non-myr-GCAP-2 (▼) 1 h bei den angegebenen GuHCl Konzentrationen inkubiert. Ein Fluoreszenzemissionsspektrum wurde nach Anregung bei 295 nm aufgenommen und dreimal akkumuliert. Das Signal von 349-351 nm wurde gemittelt und für den Plot verwendet. Die Daten wurden normalisiert und global nach einem Zwei-Zustands-Modell gefittet (—).

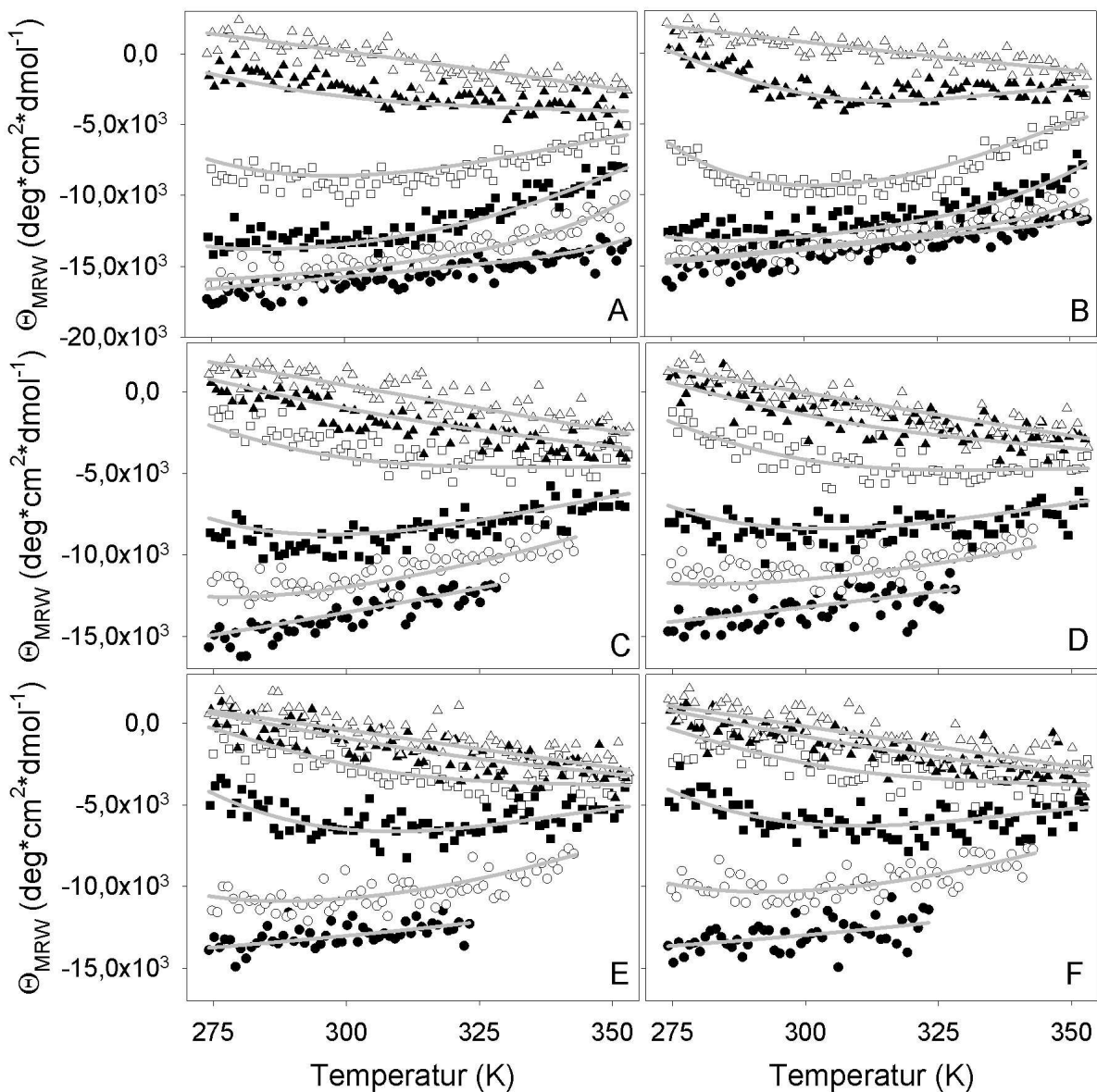


Abbildung 6.2: temperaturinduzierter Übergang und Duplikat von 0,1 mg/ml (A+B) myr-GCAP-2 in Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 , (C+D) myr-GCAP-2 in Anwesenheit von 1 mM EGTA und (E+F) non-myr-GCAP-2 in Anwesenheit von 1 mM EGTA bei 0 M (●), 2 M (○), 3 M (■), 4 M (□), 5 M (▲) und 7 M (Δ) GuHCl. Das CD-Signal wurde bei 222 nm von 1-80 °C verfolgt, bei einer Heizrate von 1 °C/min. Die Daten wurden global nach einem Zwei-Zustands-Modell gefittet (—).

Tabelle 6.1: Fitparameter der kombinierten Temperatur- und [GuHCl]-induzierten Übergänge. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert und Standardabweichung einer Doppelbestimmung. Dabei ist ΔH_0 die Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit von Denaturierungsmittel bei 25°C, ΔS_0 die Entfaltungsentropie in Abwesenheit von Denaturierungsmittel bei 25°C, $\Delta C_p U$ wurde bereits in einem vorherigen Kapitel erklärt, mH ist die Abhängigkeit von ΔH_0 von der Konzentration an Denaturierungsmittel, mS ist die Abhängigkeit von ΔS_0 von der Konzentration an Denaturierungsmittel und mC ist die Abhängigkeit von $\Delta C_p U$ von der Konzentration an Denaturierungsmittel.

<i>Fitparameter</i>	$+Ca^{2+}$		$-Ca^{2+}$	
	$-Mg^{2+}$		$-Mg^{2+}$	
	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2	myr-GCAP-2	non-myr-GCAP-2
ΔH_0 (J/mol)	20885±628	26008±8172	10282±932	19105±5668
ΔS_0 (J/mol*K)	8.0±9.3	35.4±26.4	-4.0±4.9	28.3±15.9
$\Delta C_p U$ (J/mol*K)	1677±1	1125±172	764±365	723±23
mH (J/mol*M)	-6180±1705	-8017±2211	-4494±442	-8073±2196
mS (J/mol*K*M)	-6.1±3.7	-13.6±7.3	-3.9±2.0	-14.9±6.5
mC (J/mol*K*M)	-181±118	-24±61	-63±122	14±35

Ergänzung zu Abbildung 3.20: Die analysierten Peptide in (A) sind (●) WYKKFLEECPSGTLF (2-fach geladen), (▼) YKKFLEECPSGTLF (2-fach geladen), (■) YKKFLEECPSGTLF (1-fach geladen), (◆) WYKKFLEECPSGTL (2-fach geladen), (▲) LEECPSTGLF (1-fach geladen) und (●) LEECPSTGLF (2-fach geladen), in (B) (●) KIYDKDRNGCIDRQEL (2-fach geladen), (▼) KIYDKDRNGCIDRQEL (3-fach geladen), (■) KIYDKDRNGCID (2-fach geladen), (◆) KIYDKDRNGCIDRQELLD (2-fach geladen), (▲) KIYDKDRNGCIDRQELLD (3-fach geladen) und (●) KIYDKDRNGCIDRQELL (2-fach geladen), in (C) (●) KLKKACSVE (1-fach geladen), (▼) KLKKACSVE (2-fach geladen), (■) KLKKACSVEVE (2-fach geladen), (◆) SIYKLKKACSVE (2-fach geladen), (▲) SIYKLKKACSVE (3-fach geladen), (●) SIYKLKKACSVEVE (2-fach geladen) und (✱) SIYKLKKACSVEVE (3-fach geladen) und in (D) (●) Mercatododecanyl-GQQ.

Danksagung

Diese Arbeit war kooperativer als es die Übergänge anmuten mögen.

Mein Dank gilt:

Dr. Christian Lange als Initiator der Arbeit

Dr. Lilie, Dr. Ihling, Jens Pettelkau, Prof. Sinz, Dr. Vogel, Stephan Theisgen, Prof. Huster, Tina Brehmer, Dr. Kerth, Prof. Blume und Dr. Parthier für Rat und Tat

Gabriela Krnac*, Matthias Müller, Alexander Hajdukzoc*, Anja Greschuchna, Amelia Owsicka**, Robert Ose und Chris Schreiber für deren Tat nach meinem Rat

Sabine Bergelt u. a. für die Korrektur der Arbeit

Alexander Tischer für ergiebige Diskussionen

Sven Rothemund für die Peptidsynthese und den Hinweis, dass 12-Mercaptododecansäure kommerziell erhältlich ist

Dr. Schierhorn für zahlreiche massenspektrometrische Analysen

den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des roten Labors für die kollegiale Zusammenarbeit

Dr. Bang, Dr. Geysens und Dr. Sandstrom für die Wissensvermittlung

dem GRK1026 für 3 Monate Finanzierung, produktive Seminare, schöne Meetings und interessante Sprecher

meiner Frau und meinen Söhnen

* DAAD Fellowship

** Erasmus Fellowship

Halle, Oktober 2010

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation

"Konformationsänderung des Guanylatzyklase-aktivierenden Proteins 2 (GCAP-2) zur Aktivierung der Sebstäbchenaußensegment-Guanylatzyklase (ROS-GC1)"

erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades bewirbt und diese Arbeit selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen verfasst habe.

Thomas Schröder

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Thomas Schröder
Geburtsdatum: 11. 07. 1980
Geburtsort: Friedrichroda/Thüringen
Familienstand: verheiratet, +2

Werdegang

1999
Abitur am Gustav-Adolf-Gymnasium, Lützen

1999-2000
Zivildienst, mobile Hauskrankenpflege, Leipzig

2000-2001
Studium des Bioingenieurwesen an der Martin-Luther-Universität Halle

2001-2006
Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle

September 2006
Diplom in Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle
Note: sehr gut

2007-2010
Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biotechnologie, MLU Halle

Publikationen

Alexander Vogel, **Thomas Schröder**, Christian Lange, and Daniel Huster
"Characterization of the Myristoyl Lipid Modification of Membrane Bound GCAP-2
by ^2H Solid-State NMR Spectroscopy"
Biochim. Biophys. Acta 1768 (2007) 3171-3181

Stephan Theisgen, Lars Thomas, **Thomas Schröder**, Christian Lange, Michael
Kovermann, Jochen Balbach and Daniel Huster
"The Presence of Membranes or Micelles Induces Structural Changes of the
Myristoylated Guanylate Cyclase Activating Protein 2"
European Biophysics Journal, submitted