

Aus dem
Institut für Medizinische Physik und Biophysik
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Direktor: Professor Dr. K. P. Hofmann

Habilitationsschrift

Regulationsmechanismen der visuellen Signaltransduktion: Untersuchungen zu Deaktivierungs- und Translokationsprozessen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Biophysik

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. rer. nat. Alexander Pulvermüller
geboren am 25.06.1960 in Ebingen

Eingereicht: April / 2009

Dekanin: Professor Dr. med. A. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. K.-W. Koch / Oldenburg

2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. R.S. Goody / Dortmund

Öffentlicher wissenschaftlicher Vortrag am 25.01.2010

Meiner Frau und meinen beiden Töchtern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Signaltransduktion der Photorezeptorzelle	3
1.2. Deaktivierung der visuellen Kaskade	5
1.2.1. Rhodopsinkinase	8
1.2.2. Arrestin	9
1.3. Translokationsprozesse der Photorezeptorzelle	12
1.3.1. Centrin	13
2. Eigene Arbeiten	15
2.1. Deaktivierungsprozesse in der visuellen Kaskade	15
2.1.1. Mechanismen und biologische Rolle des Arrestins und seiner splice Varianten p ⁴⁴ im Rezeptorabschaltungsprozess.....	15
2.1.2. Bindungsstellen des Arrestins mit dem photoaktivierten Rezeptor Rhodopsin.....	26
2.1.3. Funktionelle Unterschiede der Arrestin und p ⁴⁴ Wechselwirkung mit dem Rezeptor Rhodopsin	34
2.1.4. Interaktion zwischen photoaktiviertem Rezeptor Rhodopsin und seiner Kinase	43
2.2. Translokationsprozesse in der visuellen Kaskade	51
2.2.1. Centrine, Regulatoren im Verbindungscilium retinaler Photorezeptorzellen	51
2.2.2. Lichtabhängige CK2-vermittelte Phosphorylierung der Centrine reguliert die Komplexbildung mit dem visuellen G-Protein	75

2.2.3. Interaktion von Centrin Isoformen mit visuellem G-Protein Transducin in Photorezeptorzellen	89
2.2.4 Calcium abhängig Bildung des Centrin-G-Protein Komplexes in Photorezeptorzellen	100
3. Diskussion	111
4. Zusammenfassung	123
5. Literaturverzeichnis	125

Danksagung

Erklärung

Abkürzungen

Å	Ångström (10^{-10}m)
ABCR-	photoreceptor cell-specific ATP binding cassette-
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Cen1-4p	Centrin-Isoformen 1-4
cGMP	cyclische Guanosin-3',5'-monophosphat
CK2	Casein-Kinase 2
CNG-	cyclic nucleotide-gated-
EC number	Enzyme Commission number
GAPs	GTPase activating proteins
GARP	Guanylate cyclase-activating protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GPCRs	G-protein coupled receptors
GRKs	G-protein coupled receptor kinases
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G_t	G-Protein der Stäbchenzelle, Transducin
$G_t\alpha$	α -Untereinheit des Transducin
$G_t\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Untereinheit des Transducin
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration
$InsP_6$	D-myo-Inositol-6-phosphat
K_D	Dissoziationskonstante
k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
Meta I	Metarhodopsin I
Meta II	Metarhodopsin II

Meta III	Metarhodopsin III
Ops*	aktive Konformation des Opsin
PDE	cGMP-Phosphodiesterase
P-Meta II	phosphoryliertes Metarhodopsin II
P-Rh	phosphoryliertes Rhodopsin
P-Rh*	photoaktiviertes und phosphoryliertes Rhodopsin
p ⁴⁴	Arrestin splice Variante
RDH	Retinol-Dehydrogenase
RGS	regulator of G-protein signalling
Rh	Rhodopsin
Rh*	photoaktiviertes Rhodopsin
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA

1. Einleitung

Eine grundlegende Eigenschaft lebender Organismen ist die Fähigkeit auf externe physikalische und chemische Veränderungen ihrer Umgebung zu reagieren und sich daran anzupassen. Diese Fähigkeit setzt Strukturen voraus, die spezifische Signale aufnehmen, sie zwischenspeichern und in ein für die Zelle geeignetes Signal überführen können, die Sinnes- oder Rezeptorzellen. Ein Prinzip ist dabei die Perzeption von Signalen durch membranständige Rezeptormoleküle, die Reize spezifisch registrieren und in das Cytoplasma der Zelle weiterleiten. Zu diesen Transmembransensoren zählen neben Ionenkanal-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptoren mit eigener katalytischer Aktivität auch die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (G-protein coupled receptors, GPCRs).

G-Protein gekoppelte Rezeptoren, auch heptahelikale oder serpentine Rezeptoren genannt [1] repräsentieren die größte und möglicherweise evolutionär ausgedehnteste Familie von transmembranären Signalmolekülen. Die Superfamilie wird von mehr als 1000 Genen im menschlichen Genom codiert. Dies entspricht über 3% der menschlichen Gene und ist für die Beantwortung der unterschiedlichsten extrazellulären Signale, wie Licht, Duftstoffe, Nukleotide, Ionen, Lipide, Steroide, Aminosäuren und Peptide (das Größenspektrum reicht hier von großen Glykoproteinen bis hin zu Oligopeptiden), verantwortlich [2]. GPCRs sind in einer Vielzahl von verschiedenen zellulären Systemen involviert und regulieren nahezu jede biologische Reaktion der Zelle, von der Sensorik über metabolische und physiologische Instandhaltungen bis hin zu neurologischen Funktionen [3-5]. Bemerkenswert ist die topologische Homogenität der sieben, die Zellmembran durchspannenden α -Helices der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wohingegen die extra- und intrazellulären Elemente in Größe und Struktur stark variieren können [6]. Alle GPCR abhängigen Signalwege beginnen mit der Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung eines spezifischen extrazellulären Agonisten, worauf eine konformative Änderung der intrazellulären Domäne des Rezeptor resultiert, die dann wiederum intrazelluläre Proteine erkennen können [7]. Obwohl mehr und mehr aktivierte GPCRs gefunden werden, die in der Lage

sind direkt mit dem cytoplasmatischen Effektorproteinen zu interagieren [8], sind die häufigsten signaltransduzierenden Proteine die heterotrimeren G-Proteine [9]. Signalwege, die über heterotrimere G-Proteine vermittelt werden, sind klassische, an sieben-Transmembranrezeptoren (7TM-Rezeptoren) gekoppelte Transduktionskaskaden [10, 11]. Im Zuge des GPCR-katalysierten Nucleotidaustausches (GDP gegen GTP) in der α -Untereinheit des G-Proteins, dissoziiert das heterotrimere G-Protein in $G_{t\alpha}$ -GTP und den heterodimeren $\beta\gamma$ -Komplex ($G_{t\beta\gamma}$), die beiderseits auf Effektoren nachgeschalteter 2nd-Messenger-Moleküle einwirken können [11, 12]. Als intrazelluläre Effektorproteine der G-Protein vermittelten Signaltransduktion konnten u.a. Phospholipasen, Phosphodiesterasen, Adenylcyclasen, Phosphatidylinositolkinasen und Ionen Kanäle identifiziert werden. Obwohl heterotrimere G-Protein-Signalsysteme primär durch Zellmembranrezeptoren (GPCRs) aktiviert werden, wurden vor einiger Zeit auch Membranrezeptor-unabhängige, durch heterotrimere G-Proteine bzw. durch deren Untereinheiten $G_{t\alpha}$ und $G_{t\beta\gamma}$ vermittelte Signalwege beschrieben (siehe Übersichtsartikel [13-15]).

Nahezu alle GPCRs konnten als Substrate für G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (G-protein coupled receptor kinases, GRKs) identifiziert werden, dabei werden sie an ihren Serin- und Threoninresten der C-terminalen intrazellulären Domäne in unterschiedlicher Anzahl und Reihenfolge phosphoryliert [16, 17]. Diese enzymatische Phosphorylierung stellt ein Schlüsselereignis in der Regulation der Signaleigenschaften der GPCRs dar [18]. Der kombinierte Prozess der konformativen Änderung (hervorgerufen durch die Interaktion mit den GRKs) und der posttranslationalen Modifikation (Phosphorylierung) der GPCRs erlaubt nun weitere Interaktionen mit Proteinen, die zuvor nicht möglich waren [18]. Aus einer Vielzahl von GPCR interagierenden Proteinen [4, 19], ist die Familie der Arrestine besonders intensiv untersucht worden und stellt den archetypischen phosphorylierungsabhängigen Interaktionspartner dieser Rezeptoren dar.

1.1. Die Signaltransduktion der Photorezeptorzelle

Photorezeptorzellen von Vertebraten sind hochgradig polarisierte und spezialisierte Neurone, die sowohl morphologisch als auch funktionell in klar definierte, unterschiedliche zelluläre Kompartimente untergliedert sind. Die beiden Photorezeptortypen, Stäbchen und Zapfen, zeichnen sich durch ein lichtempfindliches Außensegment aus, welches über ein nicht-motiles Verbindungscilium mit einem Innensegment verbunden ist. In beiden Zelltypen sind die molekularen Komponenten der visuellen Transduktionskaskade mit den Membranstapeln, den so genannten „disks“, im Außensegment assoziiert, wohingegen das Innensegment alle für eukaryotische Zellen typischen Organellen enthält und für die Prozesse der Synthese und des Metabolismus zuständig ist. In den Außensegment-disks aktiviert Licht das visuelle Pigment Rhodopsin und induziert damit die Aktivierung einer heterotrimeren G-Protein-Signalkaskade, die zur Spaltung von cGMP und zur Schließung cGMP-gesteuerter Kanäle führt [20, 21]. Dieser Signalweg stellt sich im Wesentlichen als einzeln und unverzweigt dar, da er sich nur aus jeweils einem Rezeptor (Rhodopsin), einem Übermittler (G-Protein, Transducin) und einem Effektor (cGMP-Phosphodiesterase, (PDE6)) zusammensetzt. Im folgenden Abschnitt sollen diese drei wichtigsten Komponenten der Aktivierung der visuellen Kaskade kurz charakterisiert werden.

Rhodopsin ist ein integrales GPCR-Membranprotein (siehe Abschnitt 2) und setzt sich aus dem kürzlich strukturell aufgeklärten Apoprotein Opsin [22] und einer, über eine Schiff Base kovalent an Lys-296 gebundenen lichtempfindlichen prosthetischen Gruppe, dem 11-*cis*-Retinal, zusammen. Es zählt zu den am besten charakterisierten Membranproteinen und dient als Beispiel der größten der drei bisher klassifizierten GPCR-Familien [1, 23, 24]. Weiterhin zeichnet sich das Rhodopsin dadurch aus, dass es bisher das einzige Protein der GPCR-Familie ist, dessen Kristallstruktur gelöst werden konnte [25]. Als Besonderheit des Rhodopsins kann die Art der Aktivierung des Moleküls angesehen werden, da der oben beschriebene Chromophor, das 11-*cis*-Retinal, einen inversen Agonisten darstellt, der erst durch die Absorption eines Lichtquants in einen Agonisten umgewandelt wird. Dieser Vorgang wird als *cis/trans*-Isomerisierung bezeichnet und stellt den initialen Schritt in der visuellen Signaltransduktion dar [26-28]. Die

lichtinduzierte *cis/trans*-Isomerisierung bewirkt, dass im Rhodopsin verschiedene kurzlebige Intermediate mit definierten spektralen Absorptionseigenschaften durchlaufen werden [29-31], die in ein pH- und temperaturabhängiges Gleichgewicht der beiden Photoprodukte Metarhodopsin I (Meta I) und Metarhodopsin II (Meta II) münden [32]. Für die Ausbildung der aktiven Rezeptorkonformation, dem Meta II, ist eine Reihe von intramolekularen Umstrukturierungen notwendig. Neben der Deprotonierung der Schiff-Base und der Protonierung des entsprechenden Gegenions Glu-113 [31] ist eine weitere Protonenaufnahme durch die Aminosäure Glu-134 [33, 34] und damit einhergehend eine räumliche Änderung der sechsten Helix des Rhodopsinmoleküls entscheidend [26, 35, 36]. Neueste kristallographische Untersuchungen zeigen, dass schon die Liganden freie Form des Rhodopsins, das Opsin unter saueren Bedingungen eine aktive Konformation annehmen kann. Diese so genannte Ops* Konformation bindet eine Mutante der $G_t\alpha$ -Untereinheit und kann somit als aktiver Interaktionspartner mit dem Transducin angesehen werden [37].

Transducin, das zur großen Klasse der heterotrimeren G-Proteine gehört, bindet an die aktive Konformation des Rhodopsins (Meta II) [38-41] und vermutlich, wie oben beschrieben bereits an Ops* [37]. Dieses, aus einer Guaninnukleotid bindenden α -Untereinheit und einem undissoziierbaren $\beta\gamma$ -Komplex bestehende Protein, liegt unter physiologischen Bedingungen im inaktiven Zustand als membrangebundenes Heterotrimer vor. Die Aktivierung des Transducins erfolgt durch den katalytischen Nukleotidaustausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) [42], was wiederum zur Dissoziation der nun aktiven $G_t\alpha$ -Untereinheit vom verbleibenden $\beta\gamma$ -Komplex führt [43]. Detaillierte röntgenkristallographische und biochemische Untersuchungen zeigen, dass sowohl der C-Terminus der $G_t\alpha$ - als auch der farnesylierte C-Terminus der $G_t\beta\gamma$ -Untereinheit an der Bindung beteiligt sind und beide Bindungsstellen in zwei zeitlich getrennten Schritten mit dem aktivierten Rezeptor interagieren (*two-sites sequential fit* Modell) [44-46]. Diese Interaktion stellt den ersten Schritt in der Signalverstärkung der visuellen Kaskade dar, wobei die Höhe des

Verstärkungsgrades, insbesondere unter physiologischen Bedingungen zurzeit noch kontrovers diskutiert wird [20, 47-50].

Das Effektormolekül der visuellen Signaltransduktion, die cGMP-Phosphodiesterase 6 (PDE6, EC 3.1.4.17, im Folgenden als PDE bezeichnet) welche zur großen Familie der Klasse I PDE Enzyme gehört [51-53], wird durch die aktive $G_{t\alpha}$ -GTP-Untereinheit des Transducins deinhibiert. Die PDE ist ein heterotrimeres Protein, welches im inaktiven Zustand aus zwei sehr ähnlichen katalytischen Untereinheiten ($PDE_{\alpha\beta}$) besteht, deren enzymatische Aktivität durch jeweils zwei weitere kleinere Untereinheiten (PDE_{γ}) stark unterdrückt wird [54]. Durch die Bindung von zwei $G_{t\alpha}$ -GTP Molekülen an die PDE entsteht ein $G_{t\alpha}$ -GTP-PDE Komplex wodurch das Enzym aktiviert wird [55]. Dabei wird der „second messenger“, das cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP), durch die nun katalytisch aktive PDE zu 5'-Guanosinmonophosphat (5'GMP) hydrolysiert [56], dies verringert die freie cGMP-Konzentration im Cytoplasma was zur Schließung der in der Plasmamembran lokalisierten cGMP abhängigen Ionenkanäle (cyclic nucleotide-gated (CNG) channels) [57, 58] führt und damit letztlich zur Hyperpolarisation der Stäbchenzelle beiträgt [21].

1.2. Deaktivierung der visuellen Kaskade

Um eine zeitlich abgestufte Zellantwort zu gewährleisten, sind Mechanismen notwendig, die die drei oben genannten Hauptkomponenten der visuellen Signalweiterleitung effektiv und schnell deaktivieren, damit sie nach anschließender Regeneration erneut der Signaltransduktion zur Verfügung stehen. In Photorezeptorzellen wird jede signalgebende Komponente durch jeweils einen separaten und unterschiedlichen Mechanismus deaktiviert.

Aktives $G_{t\alpha}$ -GTP besitzt eine intrinsische GTPase Aktivität, bei der das gebundene GTP zu GDP und organisches Phosphat hydrolysiert wird. Für eine schnelle und damit effektive Deaktivierung ist die alleinige enzymatische Aktivität der isolierten $G_{t\alpha}$ -GTP Untereinheit zu langsam (mehrere Sekunden bis Minuten) [59]. Um die Hydrolyisierungsgeschwindigkeit deutlich zu erhöhen, interagiert die $G_{t\alpha}$ -GTP

Untereinheit mit einem aus drei Komponenten bestehenden Komplex, dessen Hauptbestandteil das RGS9 (regulator of G-protein signaling) ist, welches zur Familie der GAPs (GTPase activating proteins) gehört [48, 60, 61]. Der Verlust des Phosphates bewirkt, dass die $G_{i\alpha}$ -GDP Untereinheit ihre Affinität zum Effektor (PDE) verliert, wodurch die katalytische Aktivität des Enzyms inhibiert wird. Als Folge wird die cGMP-Hydrolyse unterbrochen und damit letztlich die Blockierung der CNG Kanäle in der Plasmamembran wieder aufgehoben. Das inaktive $G_{i\alpha}$ -GDP interagiert seinerseits wieder mit der $G_{i\beta\gamma}$ Untereinheit, und steht als Holoprotein, dem Transduktionszyklus erneut zur Verfügung. Das entstandene 5'GMP wird in einem drei Schritt-Prozess enzymatisch wieder zum cGMP regeneriert [62, 63].

Der wohl effektivste Mechanismus die visuelle Kaskade abzuschalten, ist die direkte Deaktivierung des photoaktivierten Rezeptors. Der spontane Zerfall der aktiven Konformation des Rhodopsins, dem Meta II, ist deutlich zu langsam um eine schnelle und sichere Abschaltung zu gewährleisten [31, 55]. Um das lichtaktivierte Rhodopsin (Rh^*) der oben beschriebenen Enzymkaskade zu entziehen, können zwei weitere Proteine mit Rh^* interagieren, eine spezifische G-Protein-Rezeptorkinase (G-protein-receptor-kinase, GRK), die Rhodopsinkinase (RK, oder GRK1) und das Arrestin. Unter skotopischen Bedingungen (Leuchtdichte $< 0,03 \text{ cd/m}^2$, physiologischer Wirkungsbereich der Stäbchenzelle) stellt die enzymatische Phosphorylierung des Rh^* durch die RK den initialen Schritt der Deaktivierung dar, wobei die Anzahl und die Präferenz der *in vivo* übertragenen Phosphatreste noch kontrovers diskutiert wird [64-66]. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Krzysztof Palczewski (Department of Pharmacology, School of Medicine, Case Western Reserve University, USA) konnten wir zeigen, dass *in vitro* die RK direkt an Rh^* bindet und damit den ersten Schritt in der Signalverstärkung, die Transducinaktivierung (siehe Abschnitt 2.1) unterbrechen kann (siehe Pulvermüller et al. (1993), Ref. [67]*)¹. Da die RK in der Stäbchenzelle ca. 100-mal geringer konzentriert ist, als das Transducin, können viele Transducinmoleküle aktiviert werden, bevor ein RK-Molekül binden kann. Dies hat zur Folge, dass die RK allein den aktivierten Rezeptor nicht endgültig abschalten kann. Um dies zu gewährleisten verringert sich die Rezeptoraffinität des

¹ Im Text sind Eigenzitate durch einen Stern [Zitat]* gekennzeichnet

Transducins mit steigendem Phosphorylierungsgrad, während die des Arrestins verstärkt wird [68]. Da Arrestin mindestens genauso häufig wie Transducin in der Photorezeptorzelle vorkommt, vervollständigt die hochaffine Bindung des Arrestins an den phosphorylierten Rezeptor die Blockade des Transducins und damit die Deaktivierung der Signaltransduktion [69].

Der Regenerationprozess des belichteten Rezeptors, der einhergeht mit der Dissoziation des Arrestins, erfolgt durch die Hydrolyse der Schiff Base Bindung des *all-trans*-Retinals, gefolgt von dessen Dissoziation vom aktiven Zentrum [70]*. Der detaillierte Mechanismus, der die Bindungsstellen, die Freisetzung des *all-trans*-Retinals und die Aufnahme des *11-cis*-Retinals am Opsin beschreibt, wird zurzeit kontrovers diskutiert. Dabei wurde das klassische Regenerationsmodell durch ein „retinal channeling“ Modell erweitert [71, 72], wobei beide Modelle den mehrphasigen dynamischen Prozess der Rhodopsinregeneration nicht vollständig erklären können (siehe Übersichtsartikel Ref. [73]). Die nachgeschaltete Reduktion des Chromophors zu *all-trans*-Retinol durch die Retinol-Dehydrogenase (RDH, EC 1.1.1.105) ist ebenfalls noch nicht vollständig entschlüsselt. Das „retinal channeling“ Modell postuliert, dass die RDH den Chromophor in der so genannten „exit site“ im Opsin reduziert [72]. Auf der Basis der Kristallstruktur des Opsins in seiner aktiven Ops* Konformation wurde kürzlich diese Modell erweitert. Dabei zeigt sich, dass zwei miteinander verbundene Öffnungen im Opsin Molekül vorhanden sind, die für die Abgabe und Aufnahme des Retinals verantwortlich sind [74]. Im klassischen Modell reagiert der Chromophor zunächst im intradiskalen Raum mit Phosphatidylethanolamin (PE) zu N-Retinylden-PE, wird dann durch den ABCR-Transporter, der als Flippase fungiert, ins Cytoplasma geschleust, beim Transport durch die Diskmembran wieder hydrolysiert und anschließend durch die RDH reduziert [75]. Die weitere Regeneration des Chromophors erfolgt nicht mehr in der Photorezeptorzelle, sondern in den apikal liegenden Zellen des Pigmentepithels (RPE). Hierbei durchläuft der Chromophor vielfältige enzymatische Reaktionen, wobei das *all-trans*-Retinol wieder zu *11-cis*-Retinal regeneriert wird (siehe Übersichtsartikel [76] und Zitate darin). Allerdings ist der detaillierte Mechanismus des auch als Retinoidzyklus bezeichneten Kreislaufs des Chromophors, insbesondere der Retinaltransport noch nicht verstanden [76, 77]. Das chromophorlose phosphorylierte Apoprotein Opsin wird durch die

Proteinphosphatase 2A dephosphoryliert und mit dem enzymatisch regenerierten und ins Stäbchenaußensegment transportierten 11-*cis*-Retinal zu neuem Rhodopsin rekombiniert [76, 78]. Nachfolgend sollen die beiden wichtigen Komponenten der Deaktivierung der visuellen Kaskade, die RK und das Arrestin kurz charakterisiert werden.

1.2.1. Rhodopsinkinase

Die Unterdrückung der GPCR vermittelten Signalwege mittels Phosphorylierung kann durch grundsätzlich zwei unterschiedliche Typen von Serin/Threonin Protein Kinasen erzielt werden. Zum einen, durch die G-Protein-Rezeptor-Kinasen (GRKs, EC 2.7.1-) und zum anderen durch Kinasen, die durch einen „second messenger“ aktiviert werden (wie z.B. Protein Kinase A oder Protein Kinase C). Eine umfangreiche Darstellung bezüglich der verschiedenen Aspekte der Rezeptorphosphorylierung ist in den folgenden Übersichtsartikeln zu finden [79-85].

Bisher konnten sieben verschiedene Vertreter der GRKs in der Gruppe der Säugetiere nachgewiesen werden [86], [87]* Funktionell und aufgrund von Sequenzhomologien werden die GRKs in drei Unterfamilien eingeteilt. Die GRK1-Unterfamilie, bestehend aus der Rhodopsin Kinase (GRK1) und der Iodopsin Kinase (GRK7), die GRK2-Unterfamilie, bestehend aus den β -adrenergen Rezeptorkinasen β ARK-1 und -2 (GRK2 und GRK3), und die GRK4-Unterfamilie, bestehend aus den GRK4-6 [86, 88]. Die GRK2, GRK3 und GRK6 werden ubiquitär im Organismus exprimiert, wohingegen die GRK1, GRK7 (Photorezeptorzellen und Epiphyse), GRK4 (Gehirn und Testis) und die GRK5 (Lunge, Herz und Retina) gewebespezifisch vorliegen (siehe Übersichtsartikel Sokal et al. (2002), Ref. [87]*). Vor kurzem konnte die Kristallstruktur der RK (GRK1) gelöst werden [89]. Aufgrund dieser Strukturinformationen wurden zwei Schlüsselstrukturelemente der RK vorgeschlagen, die am Erkennungsmechanismus mit Rh* beteiligt sind. Zum einen am C-terminalen Ende der RK und zum anderen am extremen N-terminus mit den Aminosäuren 5 bis 30 [89]. Weiterhin konnten die Strukturen der GRK 2 [90-92] und der GRK6 [93]

kristallographisch gelöst werden. Dabei zeigen die kristallisierten GRK Strukturen der GRK2 und der GRK6, eine „offene“, inaktive Konformation, die möglicherweise durch die Rezeptorinteraktion geschlossen werden kann [93]. In diesem Zusammenhang spielt vermutlich der extreme N-terminus (die ersten 15-17 Aminosäuren) des Enzyms eine entscheidende Rolle [93].

Aufgrund der neusten Strukturinformation und einer Vielzahl von biochemischen und molekularbiologischen Arbeiten sind drei funktionelle Domänen der RK ableitbar (siehe Übersichtsartikel Ref. [66] und Zitate darin). Die N-terminale Domäne ist entscheidend für die Substraterkennung und somit für die Interaktion mit Rh* [89, 94, 95]. Darüber hinaus werden Bindungsstellen mit dem Calcium bindenden Proteinen Recoverin [96, 97] und eine RGS Regulationsdomäne diskutiert [98]. Die katalytische Domäne, die in der Mitte der Polypeptidkette aller GRKs liegt, ist die am höchsten konservierte Region des Enzyms. Diese Region beinhaltet unter anderem den so genannten „Glycin loop“ (GXGXXGX), an dem ATP bindet und die „D(L/M)G“ Signatur, die hochspezifisch für alle GRKs ist. Die regulatorische C-terminale Domäne ist die variabelste Region, hier sind die Autophosphorylierungsstellen (Ser-448 und Thr-489) und die Motive für die posttranslationalen Modifikationen lokalisiert. Allerdings deuten die neusten Untersuchungen von John J.G. Tesmer, Krzysztof Palczewski und Mitarbeiter darauf hin, dass diese Domäne, zumindest für die RK, auch eine Interaktionsstelle mit Rh* darstellen könnten [89].

Durch die wichtige Eigenschaft der RK sich selbst phosphorylieren zu können (Autophosphorylierung) [99], verliert das Enzym seine Affinität zum Rh*. Somit spielt diese Funktion eine wichtige Rolle in der Regulation des ersten Schrittes im Deaktivierungszyklus [66].

1.2.2. Arrestin

Bei Säugern konnten bisher vier verschiedene Arrestinproteine nachgewiesen werden. Zwei dieser Arrestine werden ausschließlich in den Photorezeptorzellen exprimiert, das Arrestin 1 in den Stäbchenzellen und das Arrestin 4 in den

Zäpfchen, wohingegen die zwei nicht visuellen Arrestine, das Arrestin 2 und 3 (β -Arrestin 1 und 2) ubiquitär vorkommen und mit hunderten von GPCR Subtypen interagieren können.

Noch vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass die Arrestine lediglich mit GPCRs interagieren können und für deren Deaktivierung zuständig sind. Neuere Studien belegen, dass immer mehr Arrestininteraktionspartner gefunden werden, die keine Rezeptoren darstellen, wie z.B. Bestandteile der Internalisationsmaschinerie und Proteine, die die GPCR Signalkaskade auf alternative Reaktionswege umschalten [100]. Einige dieser Proteine (ADP-Ribosilationsfaktor 6 (ARF6), ARF nukleotid Bindungsstellenöffner (ARNO) und PDE 4) interagieren sowohl mit freiem, als auch mit rezeptorgebundenem Arrestin [101-103], wohingegen die meisten Proteine (Clathrin, Adaptin 2, N-ethylmaleimide-sensitives Fusionsprotein (NSF), c-Src, extrazelluläre Signalregulierende Kinasen (ERK1,2), c-JUN N-terminale Kinase 3 (JNK3)) nur an aktiviertes Arrestin binden (z.B. Interaktion mit dem Arrestin-Rezeptor Komplex) [104-109]. All diese, nicht an der Blockierung der GPCR beteiligten, Interaktionen lassen die Arrestine in einem neuen und umfassenderen Licht erscheinen. Es ist durchaus möglich, dass die Arrestine ursprünglich eher als Signaladaptoren angelegt wurden, die die jeweiligen Rezeptorsignale auf bestimmte spezifische Stoffwechselwege umschalten, und erst später in der Evolution als Inhibitoren der lichtabhängigen Signaltransduktion in Erscheinung traten (siehe Übersichtsartikel [110]).

Arrestine stellen ubiquitäre Regulatoren der GPCRs dar (jede tierische Zelle besitzt mindestens ein Arrestintyp). Dabei binden sie an der cytoplasmatischen Seite des aktivierten und phosphorylierten Rezeptors, indem sie üblicherweise mit dessen C-terminalem Ende und mehreren cytoplasmatischen Schleifen (loops) interagieren (siehe Übersichtsartikel [110, 111] und Zitate darin). Dadurch wird der Rezeptor blockiert und damit die Signalweiterleitung unterbrochen. Drei der vier bekannten Arrestinsubtypen sind bisher kristallisiert worden: das Arrestin 1 aus Rinder-Stäbchenzellen [112, 113]; das ubiquitär vorkommende Rinder Arrestin 2 oder β -Arrestin 1 [114] und das Arrestin 4 aus Salamander-Zäpfchen [115]. All diese Strukturen zeigen im Grundzustand ein gestrecktes Molekül mit zwei

prominenten Domänen (N-terminal und C-terminal) und einem C-terminal verlängerten Ende, das einen stabilen Kontakt mit der N-terminalen Domäne eingeht.

Visuelles Arrestin, oder Arrestin 1, ist ein im Cytoplasma gelöstes Protein, das je nach Belichtungsverhältnissen, sowohl im Innen- als auch im Außensegment der Stäbchenzelle vorkommt. Die bisher gelösten Kristallstrukturen, unterscheiden sich im Wesentlichen in ihren C- und N-terminalen Enden [112, 113]. Am visuellen System konnten erstmals die grundlegenden Mechanismen der Arrestin-Rezeptor Interaktion ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass visuelles Arrestin mit auffallend hoher Selektivität an photoaktiviertes und phosphoryliertes Rhodopsin (P-Rh^{*}) bindet, wohingegen die Interaktion mit nicht belichtetem phosphoryliertem (P-Rh) oder photoaktiviertem unphosphoryliertem Rhodopsin (Rh^{*}) weitaus geringer und die Bindung an inaktives unphosphoryliertes Rhodopsin (Rh) nicht mehr messbar ist [116], [117, 118]*. Dies deutet darauf hin, dass dieser Bindemechanismus anspruchsvoller sein muss, als eine einfache kooperative Protein-Protein Wechselwirkung und impliziert darüber hinaus, dass eine signifikante Konformationsänderung beim Übergang vom freien zum rezeptorgebundenen Arrestin vorliegen muss. Biophysikalische Untersuchungen zeigten, dass wegen der ungewöhnlich hohen apparenten Aktivierungsenergie von 165-140 kJ/mol der Rhodopsin-Arrestin Wechselwirkung ebenfalls auf eine konformative Änderung im Arrestin und/oder Rhodopsin geschlossen werden kann [119], [120]*. Darüber hinaus konnte in der Arbeitsgruppe von Vsevolod V. Gurevich durch *in vitro* Interaktionsexperimente gezeigt werden, dass jedes Rhodopsinmolekül als Monomer sein eigenes Arrestin bindet [121]. Weitreichende mutagene Studien (siehe Übersichtsartikel [110, 122] und Zitate darin) und die zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen unterstützen ebenfalls diese Hypothese. Andererseits wurde aus geometrischen Gründen vorgeschlagen, dass ein Arrestinmolekül an einen dimerisierten Rezeptor binden kann und ein tertiärer Komplex entsteht [123, 124], [125]*. Diese Annahme basiert im Wesentlichen auf Modellrechnungen und wird zurzeit noch kontrovers diskutiert. Biochemische [126], eigene biophysikalische (Schröder et al. (2002), Ref. [118]*) und elektrophysiologische [127] Untersuchungen zeigten, dass die Arrestinbindung an P-Rh^{*} den Rezeptor vollständig blockiert und die für die Signaltransduktion

entscheidende Transducininteraktion und damit einhergehende Aktivierung nicht mehr zulässt (siehe Abschnitt 1.1).

Ein weiteres, bei der Abschaltung beteiligtes Protein, das so genannte p^{44} , konnte von K. Palczewski und Mitarbeitern aus dem Außensegment von Rinderstäbchenzellen isoliert und charakterisiert werden [128, 129]. Durch die Untersuchung der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) von p^{44} und Arrestin, die außer der am 3'-Ende nicht-codierenden Region und der Intron/Exon-Verknüpfung am Ser-396-Codon beim p^{44} identisch sind, konnte p^{44} als splice Variante des Arrestins identifiziert werden [129]. Die Aminosäuresequenz unterscheidet sich lediglich im C-terminalen Bereich von Arrestin, in dem die letzten 35 Aminosäuren durch ein einzelnes Alanin ersetzt sind. Da die splice Variante im Gegensatz zum Arrestin sowohl an P-Rh*, als auch an Rh* binden kann, nur im Außensegment lokalisiert ist, lediglich im Mengenverhältnis von 10 zu 1 (Arrestin: p^{44}) vorliegt und durch Belichtung nicht verschoben werden kann, wird dieses Molekül als eigentliches Abschaltprotein unter skotopischen Lichtverhältnissen in der Photorezeptorzelle diskutiert [118]*.

1.3 Translokationsprozesse der Photorezeptorzelle

Zeitlebens unterliegen die transduktiven Außensegmentmembranen einem außerordentlich schnellen und umfangreichen Membranumbau. Täglich werden ca. 10% des gesamten Außensegments erneuert. Basal werden ständig neue Membran-disks generiert, während apikal fortlaufend Membranpakete abgeschnürt und von Zellen des retinalen Pigmentepithels phagozytiert werden [130]. Die dafür nötigen Umbau- und Transportmechanismen konnten in den letzten Jahren zum Teil aufgeklärt werden. Zahlreiche Cytoskelettelemente konnten dabei identifiziert werden, die diesen metabolischen Transport durch ihre Interaktion mit speziellen Motorproteinen ermöglichen [131-134]. Die ebenso wichtigen, wie essentiellen bidirektionalen Translokationsprozesse von Komponenten der Transduktionskaskade, insbesondere von Arrestin und dem heterotrimeren visuellen G-Protein Transducin, die licht-abhängig erfolgen und möglicherweise im Dienste der Langzeitadaptation stehen [135, 136], sind dagegen weit weniger gut

erforscht. Diese, erstmals ende der 80-iger Jahre beschriebenen Vorgänge [137, 138], rückten vor einigen Jahren wieder ins wissenschaftliche Interesse [136, 139-143], [144, 145]*. Bislang konnten jedoch die molekularen Mechanismen dieser licht-abhängigen, bidirektionalen Translokation durch das Verbindungscilium, das zwischen dem Innen- und dem Außensegment vermittelt, noch nicht geklärt werden. In Zusammenarbeit mit dem Labor von Uwe Wolfrum (Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) konnten wir demonstrieren, dass zumindest die licht-abhängige Translokation von Transducin nicht auf den klassischen, intrazellulären Transportvorgängen (mittels molekularer Motoren entlang von Aktinfilamenten oder Mikrotubuli), sondern auf prinzipiell andersartigen Mechanismen beruht (siehe Pulvermüller et al. (2002) und Wolfrum et al. (2002), Ref. [144, 145]*). Unserer Hypothese nach wird die Translokation von Transducin durch das Photorezeptorcilium über die Interaktionen mit Centrinen in Abhängigkeit von Ca^{2+} reguliert [144-148]*. Nachfolgend soll dieses, für den Translokationsprozess wichtige Molekül kurz charakterisiert werden.

1.3.1. Centrin

Centrine, in der Literatur auch als Caltractine bezeichnet [149], die der großen Parvalbumin-Überfamilie Ca^{2+} -bindender EF-Hand-Proteine [150, 151] angehören, wurden erstmals in einzelligen Grünalgen beschrieben [152]. Seit ihrer Entdeckung führten genetische Untersuchungen zur Identifikation einer Vielzahl von Centrin-Genen in verschiedenen eukaryotischen Organismen (siehe Übersichtsartikel Trojan et al. (2008), Ref. [153]*) In Vertebraten wurden Centrine zunächst als ubiquitäre Komponenten der Centriolen von Basalkörpern und Centrosomen sowie der Spindelpole mitotischer Zellen beschrieben [151, 154]. In Säugetieren konnten wir bislang 4 Centrin-„Isogene“ identifizieren, deren Expression und subzelluläre Lokalisation sowie zelluläre Funktion unterschiedlich sind (siehe Übersichtsartikel Trojan et al. (2008), Ref. [153]*, u.a. mit aktuellem phylogenetischen „Centrin tree“ und Zitate darin). Detaillierte Studien zeigen, dass Cen2p und Cen3p ubiquitär exprimiert werden, wohingegen die Expression von Cen1p und Cen4p auf Cilien-tragende Zellen beschränkt ist [153]*. Ebenfalls als gesichert gilt, dass Centrine an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind [155, 156]. So unterbleibt in

Säugetzellen die in der Mitose notwendige Duplikation der Centriolen bei „knock-down“-Experimenten mit Centrin 2 siRNA [157].

Neben der Ca^{2+} -Bindung, die unumstritten eine herausragende Rolle bei der Centrinregulation spielt, zeigte sich, dass auch die Phosphorylierung eine wichtige Modifikation des Centrinmoleküls hinsichtlich seiner Funktion darstellt [147, 153, 158]*. Erst kürzlich konnten wir die Proteinkinase CK2 (EC 2.7.11.1) als Hauptproteinkinase identifizieren, die an der lichtabhängigen Phosphorylierungsreaktion der Centrine beteiligt ist [158]*. Eine detaillierte Beschreibung dieser antagonistischen Regulation (Calcium einerseits und Phosphorylierung andererseits) ist in unserem Übersichtsartikel Trojan et al. (2008), Ref. [158]* gegeben.

Basierend auf einer Centrin-blot-Overlay-Strategie konnten wir zudem erstmals Polypeptide unterschiedlichen Molekulargewichts in der Säugetierretina identifizieren, die mit Ca^{2+} -aktiviertem Centrin-1 interagieren (siehe Pulvermüller et al, (2002) und Wolfrum et al. (2002), Ref. [144, 145]*). Bei der Validierung der Interaktionspartner lag bisher das Augenmerk auf dem visuellen G-Protein Transducin [144-146]*. Dabei konnte von uns gezeigt werden, dass die Centrin-Isoformen mit dem nicht-dissoziierbaren $\beta\gamma$ -Heterodimer von G-Proteinen interagieren. Diese Wechselwirkungen sollten nicht nur in der Regulation der Funktion des visuellen G-Proteins involviert sein, sondern dürften vielmehr auch in anderen G-Protein-gekoppelten Systemen für die Interaktion mit dem Cytoskelett von Bedeutung sein.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Deaktivierungsprozesse in der visuellen Kaskade

2.1.1. Mechanismen und biologische Rolle des Arrestins und seiner splice Varianten p⁴⁴ im Rezeptorabschaltungsprozess

Die Deaktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors ist auf die zeitgenaue Blockade durch das Arrestin angewiesen. Unter skotopischen Lichtbedingungen (siehe Abschnitt 1.2) ist nahezu das gesamte Arrestin im Stäbcheninnensegment lokalisiert, und die splice Variante p⁴⁴ (Arr^{1-370A}) stellt das Abschaltprotein der Rezeptordeaktivierung dar. Mittels Größenausschlusschromatographie und biophysikalischen Methoden, die membrangebundene Protein-Protein Interaktionen, Membranbindung und G-Protein Aktivierung beinhalteten, haben wir die Interaktionen von Arrestin und verschiedenen proteolytisch verdauten Arrestinen mit dem Rhodopsin untersucht. Durch Verdauung des Arrestins mit Hilfe von Trypsin und der anschließenden chromatographischen Trennung konnten wir zwei Arrestinfragmente herstellen, die sich durch die Länge des fehlenden C-Terminus unterscheiden. Arrestin³⁻³⁸² (Arr³⁻³⁸²) interagiert wie natives Arrestin ausschließlich mit phosphoryliertem Rhodopsin. Lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit und Affinität der Bindung wird durch die fehlenden Aminosäuren (383-404) etwas erhöht. Das zweite Fragment, Arrestin³⁻³⁶⁷ (Arr³⁻³⁶⁷), unterscheidet sich nur durch fünf Aminosäuren vom p⁴⁴ (Arr^{1-370A}) [128] und ist wie dieses in der Lage, auch mit unphosphoryliertem Rhodopsin zu interagieren. Darüber hinaus konnte von uns gezeigt werden, dass sowohl das p⁴⁴, als auch das Arr³⁻³⁶⁷ bereits im Dunkeln an phosphorylierte Membranen binden können. Die Bindung von Arr³⁻³⁶⁷ an phosphoryliertes Rhodopsin erfolgt im Vergleich zu Arrestin und Arr³⁻³⁸² mit einer höheren Geschwindigkeit und Affinität. Aufgrund der gewonnenen Daten haben wir einen Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die splice Variante p⁴⁴ vom inaktiven zum aktiven phosphorylierten Rhodopsin übergeben wird. Dieser Mechanismus eröffnet einen neuen Aspekt der Rezeptoralabschaltung unter skotopischen Lichtbedingungen in den Stäbchenzellen.

Seite 16 – 25: Schröder et al. (2002), *J. Biol. Chem.* 277, 43987-43996

2.1.2. Bindungsstellen des Arrestins mit dem photoaktivierten Rezeptor Rhodopsin

Um die Bindungsregionen des Arrestins, die mit dem Rezeptor Rhodopsin interagieren zu charakterisieren, verwendeten wir die Methode der spektrophotometrischen Peptid-Kompetition. Diese Methode basiert auf der Stabilisierung des aktiven Intermediates Metarhodopsin II (Meta II) bzw. des phosphorylierten Metarhodopsin II (P-Meta II) durch G_t und Arrestin, dem so genannten „extra MII Monitor“ [159]. Synthetische Arrestinpeptide können die Interaktion zwischen Arrestin und phosphoryliertem Rhodopsin beeinflussen. Die Unterdrückung der durch Arrestin induzierten Meta II-Stabilisierung durch die Arrestinpeptide deutet auf Bindungsstellen des Arrestins hin. Die durch Transducin induzierte Meta II-Stabilisierung wird ebenfalls durch Arrestinpeptide unterdrückt. Die Arrestinpeptide die gegen Arrestin kompetieren, kompetieren ebenfalls gegen Transducin und farnesyliertes $G_{t\gamma}$ -Peptid (50-71), was einen direkten Hinweis für die Interaktion der entsprechenden Arrestinregionen mit dem licht-aktivierten Rhodopsin darstellt. In dieser Arbeit konnten wir drei Regionen bestimmen, die eine sehr starke Kompetition aufweisen: Arr(11-30) und Arr(51-70) mit IC_{50} -Werten kleiner 100 μ M und Arr(231-250) bzw. Arr(241-260) mit IC_{50} -Werten kleiner 200 μ M. Diese Regionen sind in der N- und C-terminalen Domäne des Arrestins lokalisiert. Damit konnte gezeigt werden, dass beide Arrestindomänen an der festen Bindung mit Rhodopsin beteiligt sind.

Zusätzlich weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass sich die Bindungsstellen am Rhodopsin für Arrestin und Transducin am Rhodopsin teilweise überlappen. Die C-terminalen Peptide der α - und γ -Untereinheit des Transducins, denen eine Rolle bei der Interaktion mit Rhodopsin zugesprochen wird, sind in der Lage Meta II zu stabilisieren. Die kompetierenden Arrestinpeptide unterdrücken nur die durch das farnesylierte $G_{t\gamma}$ -Peptid induzierte Meta II-Stabilisierung, hingegen nicht die Meta II-Stabilisierung, induziert durch die $G_{t\alpha}$ -Peptide (340-350 und sein hochaffines Analogon). Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass sowohl die C-terminale, als auch die N-terminale Domäne des Arrestinmoleküls an der Interaktion mit dem aktivierten und phosphorylierten Rhodopsin beteiligt sind.

Seite 27 – 33: Pulvermüller et al. (2000), *J. Biol. Chem.* 275, 37679-37685

2.1.3. Funktionelle Unterschiede der Arrestin und p⁴⁴ Wechselwirkung mit dem Rezeptor Rhodopsin

Arrestin unterdrückt die Signaltransduktion der Stäbchenzelle, indem die durch das G-Protein (G_t) induzierte, katalytische Aktivität des photoaktivierten und phosphorylierten Rhodopsin blockiert wird. Eine splice Variante des Arrestins, das so genannte p⁴⁴, bei der die 35 letzten C-terminalen Aminosäuren (Position 370-404) durch ein einzelnes Alanin ersetzt sind [116, 129], wird ebenfalls in den Photorezeptorzellen exprimiert. Im Gegensatz zum Arrestin kann dieses Protein sowohl an den phosphorylierten, als auch an den nichtphosphorylierten aktivierten Rezeptor binden. In dieser Arbeit analysieren wir die Rhodopsin-p⁴⁴ Komplexbildung *in vitro*. Wie das Arrestin stabilisiert das p⁴⁴ ebenfalls das Meta II Photoprodukt des Rhodopsin gegenüber den Photoprodukten Meta I und Meta III. Es interagiert auch nicht messbar mit dem Apoprotein Opsin. Allerdings konnten wir einige bedeutsame funktionelle Unterschiede herausarbeiten. 1.) P⁴⁴ bindet an nichtphosphoryliertes Meta II mit einer weitaus geringeren Affinität (K_D = 0,24 µM) als an phosphoryliertes Meta II (K_D = 12 nM), wohingegen Arrestin lediglich an phosphoryliertes Meta II (K_D = 20 nM) bindet. 2.) P⁴⁴ kann ebenfalls mit trunkiertem Meta II (³²⁹G-Rh Meta II) [160], dem die Phosphorylierungsstellen fehlen interagieren. 3.) Die Aktivierungsenergie der Komplexbildung mit p⁴⁴ war sowohl für Meta II als auch für phosphoryliertes Meta II geringer, als die mit Arrestin (70 kJ/mol anstatt 140 kJ/mol). 4.) Inositol-6-phosphat (InsP₆) inhibiert die Interaktion von p⁴⁴ mit phosphoryliertem Meta II sehr schwach (IC₅₀ = 3600 µM), im Gegensatz zur Interaktion von Arrestin mit phosphoryliertem Meta II (IC₅₀ = 18 µM). Die Extrapolation der *in vitro* gemessenen on-Raten auf physiologische Bedingungen liefern die Reaktionszeiten für die Bindung des p⁴⁴ an aktiviertes Rhodopsin und damit erste Anhaltspunkte, wie schnell die Komplexbildung in der Zelle vonstatten geht. Die hier erhaltenen Daten zeigen deutlich, dass die splice Variante p⁴⁴ und das Arrestin unterschiedliche Rollen in der Phototransduktion spielen.

Seite 35 – 42: Pulvermüller et al. (1997), *Biochemistry* 36, 9253-9260

2.1.4 Interaktion zwischen photoaktiviertem Rezeptor Rhodopsin und seiner Kinase

Die Rhodopsinphosphorylierung ist ein Schlüsselereignis in der Deaktivierung dieses G-Protein gekoppelten Rezeptors. Diese Reaktion wird durch die Rhodopsinkinase (RK) vermittelt, in dem sie an spezifische zytoplasmatische Domänen, die so genannten „loops“, des Rhodopsin bindet und damit aktiviert wird. Diese Bindungsdomänen sind von den Phosphorylierungsstellen des Rhodopsins zu unterscheiden. In dieser Arbeit konnten wir die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen dem photoaktivierten Rhodopsin und der Rhodopsinkinase nachweisen und charakterisieren. Die lichtinduzierte Bindung der RK an eine Suspension von gewaschenen Diskmembranen konnte mit Hilfe eines Zentrifugationsassays und anschließender Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese demonstriert werden. Der direkte blitzlichtinduzierte Übergang der RK zur membrangebundenen Form konnte durch die Messung des zeitlichen Verlaufs der Lichtstreuänderung, im weiteren als LS-Bindungssignal (siehe Heck et al. (2000), Ref. [161]*), gezeigt werden. Folgende Eigenschaften des Komplexes konnten von uns ermittelt werden: 1.) Die on-rate der Kinasebindung an Rh*, die durch die Anfangssteigung des Bindungssignals bestimmt wurde, nimmt direkt proportional mit der Kinase oder der Rh* Konzentration zu. Die kinetische Analyse ergibt eine bimolekulare Ratenkonstante im Bereich von $k_{on} = 0,5 - 1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. 2.) Die ermittelte Dissoziationskonstante des Komplexes liegt im Bereich von $0,3 < K_D < 0,5$. Durch Zugabe von ATP nahm die Dissoziationskonstante mindestens um den Faktor 10 ab. Dies zeigt deutlich, dass die Phosphorylierung des Rhodopsins bzw. die Autophosphorylierung der Kinase zu einer Destabilisierung des Komplexes führen. 3.) Im Gegensatz zur Arrestin- und Transducinbindung, konnte die Bindung der RK an Rh* die Meta II Konformation nicht stabilisieren, jedoch war eine Unterdrückung der Transducin-Rhodopsin Wechselwirkung zu beobachten. Die Extrapolation der kinetischen Parameter auf zelluläre Bedingungen bei Raumtemperatur ergab, dass die Bindung der RK an Rh* den G-Protein-Aktivierungsprozess schon nach wenigen hundert katalytischen Zyklen stark unterdrücken kann.

Seite 44 – 50: Pulvermüller et al. (1993), *Biochemistry* 32, 14082-14088

2.2. Translokationsprozesse in der visuellen Kaskade

2.2.1. Centrine, Regulatoren im Verbindungscilium retinaler Photorezeptorzellen

In diesem Übersichtsartikel fokussieren wir uns auf die Mitglieder einer hochkonservierten Untergruppe, die zu der Parvalbumin Überfamilie von Ca^{2+} -bindenden EF-Hand Proteinen in den Photorezeptorzellen der Vertebratenretina gehört, den Centrinen. Diese Proteine sind häufig mit centrosomalen Strukturen der Zellen assoziiert. In den Photorezeptorzellen der Säugetiere werden alle vier Centrin-Isoformen als bedeutende Komponenten des Verbindungsciliums exprimiert (siehe 2.2.4.). Unsere Daten demonstrieren, dass die Ca^{2+} -aktivierten Centrin Isoformen mit dem visuellen heterotrimeren G-Protein Transducin interagieren und einen stabilen Komplex bilden (siehe 2.2.4.). Detailliertere Untersuchungen zeigten, dass dabei die $\beta\gamma$ -Untereinheit des Transducins den entscheidenden Bindungspartner der Centrine darstellt (siehe 2.2.4. und 2.2.5.). Darüber hinaus konnten wir aus kürzlich gewonnenen Daten schließen, dass die Transducin-Centrin Interaktion durch die CK2 vermittelte Phosphorylierung reziprok reguliert wird (siehe 2.2.2.). Der von uns gefundene Centrin-Transducin Komplex stellt einen neuen Aspekt in der Regulation der Translokationsprozesse in sensorischen Zellen dar und kann allgemein als potentielle Verbindung zwischen der Signaltransduktion und dem molekularen Transport der Signalproteine aufgefasst werden.

Seite 52 – 74: Trojan et al. (2008), *Prog Ret. Eye Res.* 27, 237-259

2.2.2. Lichtabhängige CK2-vermittelte Phosphorylierung der Centrine reguliert die Komplexbildung mit dem visuellen G-Protein

Der relativ langsame Prozess der Transducin Translokation zwischen den Zellkompartimenten des Photorezeptors wird als ein neuartiges Paradigma in der Lichtadaptation dieser Zellen angesehen (siehe Abschnitt 1.3.). In dieser Arbeit zeigen wir, dass die spezifische Phosphorylierung der Centrine direkt die Transducininteraktion beeinflusst und somit eine neuartige Regulation in den Photorezeptorzellen darstellt. Die Centrine werden während der Dunkeladaptation des Photorezeptors unterschiedlich phosphoryliert. Durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren konnten wir die Proteinkinase CK2 als Hauptproteinkinase identifizieren, die an den Phosphorylierungsreaktionen der Centrin-Isoformen Cen1p, Cen2p und Cen4p, jedoch nicht an Cen3p beteiligt ist. Die CK2 ist ebenfalls im Verbindungscilium des Photorezeptors kolokalisiert. Weiterhin konnten wir in dieser Arbeit die genauen Phosphorylierungsstellen an den Centrinmolekülen identifizieren. Da eine direkte Bindung der CK2 an den Centrinen nicht nachgewiesen werden konnte, stellt die direkte Bindung der CK2 und die erstmals von uns gezeigte Bindung der Centrine an ciliäre Mikrotubuli möglicherweise eine räumliche Nähe der beiden Proteine für eine Enzym-Substrat Interaktion im Cilium dar. Mit Hilfe der kinetischen Lichtstreuung konnten wir zeigen, dass die Bindungsaffinität von phosphorylierten Centrinen im Vergleich zu den nichtphosphorylierten Kontrollen deutlich verringert ist. Weiterhin konnten wir demonstrieren, dass durch die Phosphorylierung eine deutliche Verringerung der Ca^{2+} Bindungsaffinität an den Centrinen vorliegt. Diese Daten beschreiben einen neuen Regulationsmechanismus, bei dem eine stimulusabhängige Aufteilung der Signalmoleküle durch eine reziproke Regulation vorliegt.

Seite 76 – 88: Trojan et al. (2008), *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1248-1260

2.2.3 Interaktion von Centrin Isoformen mit visuellem G-Protein Transducin in Photorezeptorzellen

Die Photoisomerisierung von Rhodopsin aktiviert eine heterotrimere G-Protein Kaskade, die zur Schließung der cGMP-gesteuerten Kanäle und letztlich zur Hyperpolarisation der Photorezeptorzelle führt. Die massive, licht-abhängige Translokation des heterotrimeren visuellen G-Proteins Transducin zwischen dem Außen- und Innensegment steht im Dienste der Langzeitadaptation der Photorezeptorzelle. Durch die Ca^{2+} -abhängige Bildung des Centrin-Transducin Komplexes im Verbindungscilium der Photorezeptorzelle wird aller Wahrscheinlichkeit nach die Translokation des Transducins reguliert. In dieser Arbeit demonstrieren wir, dass alle vier bekannten und eng verwandten Centrin-Isoformen (Cen1p bis Cen4p) in Säugerretinen exprimiert werden. Mittels biochemischer (Größenausschlusschromatographie) und biophysikalischer (kinetische Lichtstreuung) Methoden konnten wir für alle vier Centrin-Isoformen eine Interaktion mit dem heterotrimeren G-Protein nachweisen. Wie unter 2.2.4. für das Centrin 1 beschrieben, konnten wir in dieser Arbeit darüber hinaus zeigen, dass die Centrin-Isoformen 3 bis 4 ebenfalls nur mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit des Transducins ($G_t\beta\gamma$) interagieren können. Die hohe Bindungsaffinität der Centrin-Isoformen 1 und 2 zum $G_t\beta\gamma$ und die räumliche, subzelluläre Kollokalisierung im Lumen des Verbindungsciliums deuten stark auf einen Centrin-Transducin Komplex und damit auf einen Regulationsmechanismus der Transducin Translokation im Inneren des Verbindungsciliums hin. Die gefundenen Interaktionen von Cen2p und Cen4p zu $\beta\gamma$ -Untereinheiten von nicht visuellen G-Proteinen können möglicherweise G-Proteine, die in den Centrosomen und im Basalkörper vorhanden sind, regulieren.

Seite 90 – 99: Gießl et al. (2004), *J. Biol. Chem.* 279, 51472-51481

2.2.4. Calcium abhängige Bildung des Centrin-G-Protein Komplexes in Photorezeptorzellen

Der lichtinduzierte Austausch von visuellem G-Protein Transducin zwischen dem Außen- und Innensegment der Photorezeptorzelle erfolgt einzig über das schmale Verbindungscilium. In dieser Arbeit demonstrieren wir das erste Mal, dass das Transducin mit dem Ca^{2+} -bindenden Protein Centrin 1 in einem ganz spezifischen Kompartiment des Verbindungsciliums, der inneren Oberfläche des Axonems, kolokalisiert ist. Mittels Coimmunoprecipitations-, Zentrifugations-, Centrin-Blot-Overlay-, Größenausschlusschromatographie- und kinetischen Lichtstreuexperimenten konnten wir zeigen, dass Ca^{2+} -aktiviertes Centrin 1 mit hoher Affinität und Spezifität an Transducin binden kann. In detaillierten Untersuchungen konnten wir darüber hinaus zeigen, dass der Komplex des Centrin 1 nur mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit des Transducins gebildet wird. Diese Ca^{2+} -abhängige Assemblierung des Transducin mit Centrin stellt einen völlig neuartigen Regulationsmechanismus von molekularen Translokationen dar und dürfte über die speziellen Photorezeptorzellen hinaus von weit reichender Bedeutung sein.

Seite 101 – 110: Pulvermüller et al. (2002), *Mol. Cell. Biol.* 22, 2194-2203

3. Diskussion

Im Wesentlichen sind heute die grundlegenden Prozesse der Generierung, Translokation und Funktion der Signalproteine in sensorischen Zellen aufgeklärt. Dennoch ist erstaunlich, wie wenig über die molekulare Dynamik dieser Prozesse bekannt ist. Die Faktoren, welche die Deaktivierung und Translokation und damit zum Teil die adaptive Regulation der Reizantwort bestimmen, sind weder in ihrer molekularen Kinetik noch in ihrem Zusammenwirken verstanden. Die Zielsetzung der hier vorgelegten Arbeit besteht darin, am Beispiel der visuellen Kaskade die Teilreaktionen der Abschaltung, sowie der Translokation zu analysieren und soweit wie möglich zu vervollständigen, um daraus die Reizantwort der Rezeptorzelle zu rekonstruieren.

Der initiale Schritt der Deaktivierung des Rezeptors wird mit der Bindung und nachfolgenden Phosphorylierung des Rhodopsins durch seine spezifische Kinase (GRK1, RK) eingeleitet [160], [67]*. Dabei konnten wir mit spektroskopischen Methoden zeigen, dass die RK mit mikromolarer Affinität, im Gegensatz zum Transducin und/oder Arrestin, bereits an die Meta I Form des photoaktivierten Rhodopsins bindet (siehe Pulvermüller et al. (1993), Ref. [67]*). Die höchste Affinität zueinander erzielen dabei die Bindungspartner, wenn beide im unphosphorylierten Zustand vorliegen. Sobald die sequenzielle Phosphorylierung des aktivierten Rhodopsins sowie die Autophosphorylierung der RK eintritt, dissoziiert der Komplex [67]*. Eine detaillierte Charakterisierung der enzymatischen Reaktion und der zu Grunde liegenden kinetischen Parameter der RK-Rhodopsin Interaktion sind in unseren methodischen Arbeiten (Sokal et al (2002) und Heck et al. (2000), Ref. [87, 161]*) zu finden. Bereits ein übertragenes Phosphat an den Rezeptor bewirkt eine signifikante Verringerung der Transducin-Affinität und gleichzeitig eine deutliche Erhöhung der Arrestin-Affinität zum Rhodopsin [68, 162].

Vom biologischen Standpunkt aus, ist die zeitliche Regulation der Arrestinbindung an den Rezeptor und die nachfolgende Dissoziation von größter Bedeutung. Beide Ereignisse werden durch die hohe Selektivität des Arrestins für den

phosphorylierten und photoaktivierten Rezeptor (P-Rh*) beeinflusst. Mit inaktivem unphosphoryliertem Rhodopsin konnten wir keine Arrestinbindung nachweisen und nur eine geringe Bindung zum unphosphorylierten aktivierten (Rh*) und phosphorylierten nicht aktivierten Rhodopsin (P-Rh), wohingegen eine ausgeprägte starke Interaktion mit P-Rh* zu beobachten war [70, 118, 120]*. Die hochaffine Bindung des Arrestins an P-Rh* weist auf mehr als eine Arrestinbindungsstelle hin. Um die Selektivität des Arrestins mit P-Rh* zu erklären, wird in der Literatur ein Reaktionsmodell der sequenziellen Mehrfachbindung vorgeschlagen [122, 163]. In diesem Reaktionsmodell wird angenommen, dass die Komplexbildung sequentiell in zwei Schritten abläuft:

1. Die Erkennung des phosphorylierten Rhodopsins durch spezifische Stellen im Arrestinmolekül, durch die dann der nachfolgende Konformationswechsel vom inaktiven zum aktiven Arrestin induziert wird.
2. Die eigentliche Bindung des Arrestins mit den durch den Konformationswechsel exponierten Bindungsstellen an das phosphorylierte Rhodopsin.

Die direkte Beteiligung der durch die Phosphorylierung entstandenen negativen Ladungen der Rezeptoroberfläche, konnten wir durch die Unterdrückung der Arrestinbindung am Rezeptor mittels Heparin demonstrieren (siehe Palczewski et al (1991), Ref. [164]*). Durch detaillierte Untersuchungen der Arrestinsequenz konnten wir darüber hinaus erstmals zeigen, dass eine stark kationische hochkonservierte Region (Aminosäuren 163-182) nahe dem Zentrum von Arrestin für die Erkennung der negativ geladenen phosphorylierten Stellen des Rhodopsins oder des Heparins verantwortlich sein muss [164]*. Spätere Mutationsstudien bestätigten, dass eine spezifische Aminosäure in der oben aufgeführten Sequenz, das Arg-175, eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Rhodopsin spielt [165, 166]. Die Ende der 90iger Jahre gelöste Kristallstruktur identifizierte das Arg-175 als Teil eines Netzwerkes aus fünf interagierenden geladenen Aminosäuren im Zentrum des Arrestinmoleküls, den so genannten „polar core“ [112-114]. Diese und eine weitere, aus drei Molekülelementen (C-terminus, β -Strang I und α -Helix I) bestehende, Interaktionsstelle [113, 114, 167], halten das Arrestinmolekül in seinem inaktiven

Grundzustand. Beide dieser intramolekularen Wechselwirkungen sind in allen Säugerarrestinen konserviert (siehe Übersichtsartikel [110, 122]. Eine Destabilisierung einer dieser intramolekularen Interaktionen durch Mutagenese führt zu phosphorylierungsunabhängigen Arrestinmutanten, die sowohl an Rh* als auch an P-Rh* mit hoher Affinität binden können. Der wesentliche Unterschied der bisher verfügbaren Arrestin Kristallstrukturen besteht in der Interpretation der beiden Termini. Der in der zuerst von Granzin et al. (1989) veröffentlichten Kristallstruktur als N-terminus interpretierte Teil [112], wurde später von Hirsch et al. (1999) mit einer etwas höheren Auflösung als C-terminus gedeutet [113]. Diese unterschiedliche strukturelle Interpretation des Arrestinmoleküls hatte unter anderem zur Konsequenz, dass der initiale Aktivierungsmechanismus kontrovers diskutiert wurde. Erste Hinweise für die Richtigkeit der von Hirsch et al. (1999) vorgeschlagenen Struktur wurden mit Hilfe von Mutationsstudien erbracht, bei denen die einzelnen am *polar core* beteiligten Aminosäuren ausgetauscht wurden [168]. In diesen Studien wurde gezeigt, dass die Salzbrücke zwischen den Aminosäuren Arg-175 und Asp-296 das wesentliche Stabilisierungselement im *polar core* darstellt und dass die Aminosäuren Asp-30, Asp-303 und Arg-382 (Teil des *polar core* nach Hirsch et al. (1999)) ebenfalls an der Stabilität beteiligt sind, wohingegen Lys-2 (Teil des *polar core* nach Granzin et al. (1989)) keinen Effekt hatte [168].

Da Arg-175 im Grundzustand des Arrestins nicht exponiert ist und somit nicht zugänglich für die Phosphate des phosphorylierten Rhodopsins ist, liegt es nahe, dass die Phosphate zuerst mit anderen Elementen interagieren und dann zum Arg-175 weitergeleitet werden. Die reichlich vorhandenen positiven Ladungen an der N-terminalen Arrestinoberfläche sind bestens für die Phosphatinteraktion des Rezeptors geeignet. Durch Mutationsstudien, die diese Ladungen sukzessive eliminierten, wurden die Aminosäuren Lys-14 und Lys-15 als primäre, phosphatbindende Stellen im Arrestinmolekül vorgeschlagen [167]. Die anschließend notwendige Weiterleitung der Phosphate zum *polar core* beinhaltet eine Vielzahl intramolekularer Umordnungen, die im Detail noch nicht verstanden sind [122].

Weiterhin konnte von uns gezeigt werden, dass Inositolphosphate ebenfalls die Arrestin-Rhodopsin Wechselwirkung beeinflussen können [169]*. Diese Interaktion ist sehr spezifisch und konnte mit der Rhodopsinkinase nicht beobachtet werden. Neben dem rein methodischen Nutzen, den die Inositolphosphate als spezifische Liganden des Arrestins spielen, ist vorstellbar, dass durch die Interaktion mit Arrestin der zelluläre Inositolpool lichtabhängig beeinflusst werden kann. Ob ein regulatorischer Weg existiert, der durch die lichtabhängige Freigabe der an Arrestin gebundenen Inositolphosphate entsteht, bleibt noch zu untersuchen.

Um den Struktur/Funktions-Zusammenhang der Arrestin und p^{44} Wechselwirkung mit dem Rezeptor Rhodopsin mittels spektroskopischen Methoden zu untersuchen, wurden von uns zwei proteolytische Arrestinfragmente hergestellt, die sich durch die Länge des fehlenden C-terminus unterscheiden (siehe Schröder et al. (2002), Ref. [118]*). Dabei konnten wir zeigen, dass das Fragment Arrestin³⁻³⁸² (Arr³⁻³⁸²) wie natives Arrestin nur mit P-Rh* interagiert. Lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit und die Affinität der Bindung werden durch die fehlenden Aminosäuren (383-404) etwas erhöht. Das zweite Fragment, Arrestin³⁻³⁶⁷ (Arr³⁻³⁶⁷), unterscheidet sich durch fünf Aminosäuren von der Arrestin splice Variante p^{44} (Arr^{1-370A}) [128] und ist wie diese in der Lage, auch unphosphoryliertes Metarhodopsin II zu stabilisieren und bereits im Dunkeln an phosphorylierte Membranen zu binden [118]*. Bei der Interaktion von Arrestin mit P-Rh* durchläuft Arrestin einen Konformationswechsel, der durch die negativ geladenen Phosphate des Rhodopsins induziert wird [164]*. Arr³⁻³⁶⁷ und p^{44} interagieren ebenfalls mit unphosphoryliertem Rhodopsin, was eine Konformation in beiden Spezies vermuten lässt, die der aktiven Konformation des Arrestins ähnlich ist. Da Arr³⁻³⁸² nicht dieses Bindungsmuster aufweist, liegt es nahe, dass die Aminosäuren 368-382 und nicht die beiden ersten N-terminalen Aminosäuren für die Stabilisierung der inaktiven Konformation verantwortlich sind. Diese Resultate bestätigen die oben beschriebenen Mutationsstudien und zeigen in aller Klarheit, dass das von Granzin et al. (1989) [112] vorgeschlagene Lys-2 nicht als ein Teil des *polar core* angesehen werden kann, sondern Arg-382 diese Rolle übernimmt [113] (siehe Schröder et al. 2002, Ref. [118]*).

Über diese mechanistischen Eigenschaften hinaus konnte aus unseren gewonnenen Daten eine physiologische Rolle des p^{44} abgeleitet werden. Aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass unter skotopischen Lichtbedingungen (Bedingungen unter denen das Stäbchenaußensegment arbeitet) lediglich p^{44} im Außensegment vorhanden ist. Arrestin, welches unter diesen Bedingungen ausschließlich im Innensegment vorkommt und erst bei hohen Lichtintensitäten über Minuten in das Außensegment transportiert wird, kann somit nicht an der Abschaltung bei geringen Lichtverhältnissen beteiligt sein. Aufgrund der gewonnenen Daten wird von uns ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem die splice Variante p^{44} vom inaktiven zum aktiven phosphorylierten Rhodopsin übergeben wird (eine detaillierte Beschreibung ist in Schröder et al. (2002), Ref. [118]* zu finden). Somit wäre das p^{44} und nicht Arrestin an der Deaktivierung des Rhodopsins bei geringen Lichtstärken beteiligt.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war es, die primären Bindungsstellen von Arrestin an P-Rh* zu bestimmen und ein Bindungsmodell des Arrestin-Rhodopsin-Komplexes zu entwerfen. Die originäre Frage dabei war, ob bei der Komplexbildung eine große konformative Änderung oder nur eine lokale Bewegung im Arrestinmolekül stattfindet. Das anfänglich präsentierte Modell, in dem lediglich die N-terminale Domäne des Arrestinmoleküls an der Bindung mit dem P-Rh* beteiligt sein soll, konnte aufgrund der Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen ausgeschlossen werden [117, 125]*, [170-173]). Um zu untersuchen, welche Arrestinsequenzen bei der Interaktion zwischen Arrestin und P-Rh* beteiligt sind, wurden von uns Kompetitionsmessungen mit synthetischen Arrestinpeptiden durchgeführt. Dabei konnten wir drei Regionen der Arrestinsequenz ermitteln, die eine sehr hohe Konkurrenz aufweisen und somit Bindungsstellen mit P-Rh* darstellen (eine detaillierte Darstellung der Arrestinbindungsstellen ist in Pulvermüller et al. 2000, Ref.[117]* gegeben). In dieser Studie demonstrieren wir zum ersten Mal, dass sowohl die C-terminale als auch die N-terminale Domäne des Arrestinmoleküls an der Interaktion mit dem P-Rh* beteiligt sind [117]*. Das Arrestin beim Binden an P-Rh* eine größere konformative Änderung seiner Molekülgestalt durchläuft, wurde erstmals von Schleicher et al. (1989) [119] aufgrund der hohen Aktivierungsenergie bei dieser Interaktion vorgeschlagen. Diese Hypothese wurde durch eine Vielzahl von

indirekten Hinweisen erhärtet [113, 114, 163, 165, 167, 168, 174-177] und galt als einer der Meilensteine des sequenziellen Mehrfachbindungsmodells. Da bis zum heutigen Zeitpunkt die Struktur des Arrestin-Rezeptor Komplexes nicht bekannt ist, fehlt jedoch ein direkter Beweis für dieses Modell. Ein alternatives Modell, bei dem das Arrestin lediglich durch kleine konformative Umordnungen im Molekül aktiviert werden soll, wurde erstmals von Granzin et al. (1998) und danach von Shilton et al. (2002) aufgrund vergleichender Röntgenkristallstudien mittels SAXS (small-angle X-ray scattering) Experimenten am Arrestin 2 vorgeschlagen [112, 178]. Allerdings kann dieses Modell einige experimentell gefundene Fakten nicht erklären: 1.) Bei der C-terminal verkürzten Form des Arrestins, dem p⁴⁴, welches schon am unphosphorylierten Rezeptor bindet und somit eine pre-aktivierte Form darstellt, wird die Aktivierungsbarriere nicht völlig beseitigt, sondern lediglich auf ca. 50% des Wertes von nativen Arrestin reduziert [120]*. Diese Beseitigung müsste jedoch erwartet werden, wenn p⁴⁴ selbst die aktive Konformation darstellen sollte. 2.) In derselben Studie konnten wir durch kinetisch-stöchiometrische Untersuchungen, in denen die Meta II Stabilisierung mit unterschiedlichen Arrestin-Konzentrationen titriert wurden, zeigen, dass sich ein Arrestin-Rhodopsin-Komplex im Verhältnis 1:1 ausbildet (die detaillierte Analyse der kinetischen Parameter ist in Pulvermüller et al. 1997, Ref. [120]* zu finden). 3.) Die konstitutiv aktiven Mutanten oder die splice Varianten vom Arrestin binden nicht wahllos an alle funktionellen Formen des Rezeptors (dies müsste man erwarten, wenn Arrestin im vollaktivierten Zustand wäre), sondern benötigen vom Rezeptor eine weitere wohl definierte Interaktionsfläche um ein vollständig aktiviertes Arrestin auszubilden [129, 165, 176, 177, 179, 180], [120]*. 4.) Um eine Bindung des Arrestins an P-Rh* auszubilden, muss die, die beiden Domänen verbindende Region (*hinge region*) mehr als zehn Aminosäurereste besitzen, wobei jedoch sowohl ihre exakte Länge als auch ihre Sequenz nicht von Bedeutung für die Interaktion ist [174]. Dieses Ergebnis zeigt, dass zum einen eine direkte Rezeptorinteraktion dieser Region ausgeschlossen werden kann und dass zum anderen eine größere relative Bewegung der beiden Domänen zueinander anzunehmen ist. Das bis dato stärkste Argument, dass nach der Rezeptoraktivierung eine große konformative Änderung des Arrestinmoleküls eintritt und jedes Rhodopsinmolekül als Monomer sein eigenes Arrestin bindet, liefern die *in vitro* Interaktionsexperimente von Hanson et al. (2007) [121]. In diesem sequenziellen Mehrfachbindungsmodell wird

deutlich, dass eine wesentliche Funktion der signifikanten Konformationsänderung darin besteht, dass Arrestin eine sehr selektive hochaffine Interaktion lediglich mit dem phosphorylierten licht-aktivierten Rezeptor eingehen kann.

Arrestin liegt im Grundzustand als gestrecktes zwei-Domänen-Molekül mit einer Spannweite von ca. 70 Å vor, dies entspricht in etwa der doppelten Größe der cytoplasmatischen Oberfläche vom Rhodopsin. Da Rezeptorbindungsstellen an den konkaven Seiten der N-terminalen, und der C-terminalen Domäne identifiziert wurden, müssen entweder beide Domänen relativ zueinander bewegt werden, um alle Bindungsstellen simultan mit dem Rezeptor in Kontakt zu bringen [110, 174], oder Rhodopsin bindet als Dimer an ein Arrestinmolekül [123, 124]. Mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM, atomic force microscopy) konnte gezeigt werden, dass, unter den bei dieser Methode verwendeten Versuchsbedingungen, fast alle Rhodopsinmoleküle in der Diskmembran als Dimere bis hin zu Oligomeren vorliegen [181, 182]. Diese Ergebnisse unterstützen das alternative Modell, indem Rhodopsin als Dimer an ein Arrestinmolekül bindet und damit lediglich eine geringfügige Konformationsänderung im Arrestinmolekül zu erwarten ist. Trotz der Vielzahl von Studien konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt werden, welches der beiden existierenden Modelle zutrifft. Die Mehrzahl der Ergebnisse spricht jedoch für das sequenzielle Mehrfachbindungsmodell, bei dem jeweils ein Arrestinmolekül an ein Rhodopsinmolekül bindet. Um den Prozess der konformativen Änderungen im Arrestinmolekül bei der Aktivierung zu verstehen und die Frage der Stoichiometrie zwischen Rhodopsin und Arrestin im Komplex zu klären, wäre die Röntgenkristallstruktur dieses und die des Rhodopsin-p⁴⁴-Komplexes von größtem Nutzen.

Zurzeit arbeiten wir daran, in Kooperation mit Hui-Woog Choe (Department of Chemistry, College of Natural Science, Chonbuk National University, Chonju, South Korea) diese Komplexe zu kristallisieren und strukturell zu lösen.

Während ihrer molekularen Lebensdauer interagieren die Proteine der visuellen Signaltransduktion in höchst unterschiedlicher Weise mit ihren Rezeptor- bzw. Effektormolekülen. Dabei haben die unterschiedlichen Lichtverhältnisse, denen die Stäbchenzellen ausgesetzt werden, den wohl größten Effekt auf die Protein-

Protein Wechselwirkungen und somit auf die transduktiven Prozesse. Diese Prozesse sind ausschließlich auf das lichtempfindliche Außensegment der Stäbchenzelle beschränkt. Die Signalproteine werden jedoch im metabolisch aktiven Innensegment synthetisiert und müssen ins Außensegment transportiert werden. Die dafür notwendigen intensiven intrazellulären Transportvorgänge sind bisher nur lückenhaft bekannt [131-134]. Insbesondere sind die bidirektionalen Translokationsprozesse von Arrestin und dem heterotrimeren G-Protein Transducin im Detail nicht verstanden. Durch Kombination von histologischen, immunologischen, biochemischen und biophysikalischen Methoden konnten wir erstmals demonstrieren, dass zumindest die lichtabhängige Translokation von Transducin in der Stäbchenzelle nicht mit Hilfe molekularer Motoren entlang von Filamenten erfolgt, sondern einem prinzipiell anderen Mechanismus gehorcht [144, 145]*. Dabei konnten wir erstmals durch Einsatz eines Spektrums von biochemischen und biophysikalischen Protein-Protein-Interaktions-Assays zeigen, dass das Transducin mit Maus Centrin 1 (ein Mitglied der EF-Hand Superfamilie von Calcium bindenden Proteinen) interagiert und dadurch vermutlich die Translokation des Transducins durch das Photorezeptorcilium Ca^{2+} -abhängig reguliert wird (siehe Pulvermüller et al. (2002), Ref. [144]*). Diese Protein-Protein Interaktion ist hoch spezifisch. Selbst das nächst verwandte Protein des Centrins, das Calmodulin, bindet etwa 15-mal schwächer an Transducin und die Photorezeptor spezifischen Ca^{2+} -bindenden Proteine Recoverin und Guanylatcyklase aktivierendes Protein 1 (guanylate cyclase-activating protein 1, GARP 1) zeigen keinerlei detektierbare Interaktion mit Transducin. Darüber hinaus bindet das Maus Centrin 1 an keinem anderen Protein der visuellen Transduktionkaskade, weder an Arrestin, Rhodopsinkinase, dem Rezeptor selbst, noch beeinflusst es die Aktivität des Effektormoleküls, der PDE [144, 145, 153]*. Detaillierte Untersuchungen des Bindungsverhaltens zeigten, dass sowohl die $\beta\gamma$ -Untereinheit, als auch das gesamte heterotrimere G-Protein, jedoch nicht die G_{α} -Untereinheit an der Interaktion mit allen bisher bekannten Centrin-Isoformen beteiligt sind [144, 146]*. Diese Ergebnisse schränken die putativen Bindungsstellen der Centrine an das Transducin erheblich ein. Eine Interaktion, wie sie für den Phosducin- $G_{\beta\gamma}$ -Komplex kristallographisch gezeigt wurde (hier interagiert das Phosducin mit nahezu den gleichen $G_{\beta\gamma}$ -Bindungsstellen wie die G_{α} -Untereinheit [183]), kann ausgeschlossen werden, da es, wie oben schon

erwähnt, eine robuste Interaktion mit dem heterotrimeren G-Protein gibt. Ebenfalls kann eine Interaktion der Centrine mit den Rezeptorinteraktionsflächen des G-Proteins ausgeschlossen werden, da der gesamte Centrin-G-Protein-Komplex an den Rezeptor bindet und eine direkte Interaktion der Centrine mit dem Rezeptor ausgeschlossen werden kann (eine detaillierte Analyse des Centrin-Transducin Bindungsverhaltens ist in Pulvermüller et al. (2002), Ref. [144]* und Gießl et al. (2004), Ref. [146]* zu finden). Zusammenfassend zeigte sich Folgendes:

1. Alle vier Centrine interagieren mit Transducin, wobei die Isoform Centrin 3 die geringste Affinität zum Transducin zeigt.
2. Die Centrine binden sowohl an das isolierte $G_t\beta\gamma$ -Heterodimer, als auch an den heterotrimeren G_t -Protein-Komplex, nicht aber an die α -Untereinheit des Transducins.
3. Die Bildung der Centrin-G-Protein-Komplexe ist strikt Ca^{2+} -abhängig.

Zurzeit erarbeiten wir mit Hilfe von synthetischen Peptiden aus der Centrin- und Transducinsequenz die primären Bindungsstellen beider Proteine zueinander, um anschließend den Komplex modellieren zu können. Parallel dazu arbeiten wir daran diesen Komplex zu kristallisieren zu strukturell zu lösen.

Antikörper, die mit allen Centrin-Isoformen (siehe Einleitung) reagieren (Pan-Centrin-Antikörper), zeigen, dass Centrine in allen bislang untersuchten Vertebratenretinae exprimiert werden [184] [145]*. Mittels RT-PCR-Analysen mit Isoform-spezifischen Primer-Sets konnte erstmals gezeigt werden, dass die Centrin-Isoformen 1 und 2 im selben Gewebe koexprimiert werden [184]. In weiterführenden Untersuchungen konnten wir mit derselben Methode die Expression aller vier Centrin-Isoformen in den Retinae adulter Rodenten nachweisen [146, 147]*. Aufgrund der hohen Konservierung der Centrin-Isoformen, gestaltete sich allerdings die Herstellung von Antikörpern, die zwischen allen vier Centrin-Isoformen diskriminieren, als äußerst schwierig (siehe auch [185, 186]). Der Durchbruch gelang uns durch Vorabsättigung der Antiseren mit rekombinant exprimierten Centrin-Proteinen, dadurch war es erstmals möglich

zwischen den Centrin-Isoformen zu differenzieren und somit die Expression aller vier Centrin-Isoformen in der Säugetierretina zu demonstrieren (siehe Gießl et al. (2004), Ref. [146]*).

Immunocytochemische Untersuchungen an den Retinae der bislang untersuchten Vertebratenspezies zeigten einheitlich, dass Centrine in zwei prinzipiell unterschiedlichen subzellulären Strukturen konzentriert sind [184, 187] [145]*. Zum einen sind sie, wie in anderen eukaryotischen Zellen auch, an den Centriolen von Centrosomen und Basalkörpern zu finden und zum anderen sind Centrine ebenfalls im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen lokalisiert [184, 187, 188] [144-146]*. Darüber hinaus gelang es uns mit Hilfe der Immunoelektronenmikroskopie die Centrin-Lokalisation der subciliären Domäne an der Innenseite des Axonems aufzulösen [144, 146]*. In den Photorezeptorzellen sind die Centrin-Isoformen 1 bis 3 im Verbindungscilium lokalisiert. Während die Centrin-Isoformen 2 und 3 auch im Basalkörper exprimiert werden, bleibt das Centrin 1 auf das Cilium beschränkt. Demgegenüber ist das Centrin 4 nur im Basalkörper zu finden. In den Nicht-Photorezeptorzellen der Retina sind die Isoformen 2 und 3 zudem in den Centriolen der Centrosome lokalisiert. Mit diesen Daten konnten wir erstmals zeigen, dass alle Centrin-Isoformen in ein und derselben Zelle, der Photorezeptorzelle, koexprimiert werden und dabei in den subzellulären Bereichen partiell kolokalisieren (eine detaillierte Beschreibung der Lokalisation der Centrin Isoformen ist in unserem Übersichtsartikel Trojan et al. (2008), Ref. [153]* und in unserer Originalarbeit Gießl et al (2004), Ref. [146] zu finden).

Transducin und die Centrine 1 bis 3 sind, wie oben ausgeführt, in einer Subdomäne des Verbindungsciliums, der einzigen intrazellulären Brücke zwischen dem Innen- und dem Außensegment der Photorezeptorzellen, kolokalisiert [144, 146]. Demnach sollte das G-Protein gerade bei der Passage durch das Cilium mit Centrinen interagieren. In unseren Arbeiten diskutieren wir die Bedeutung der Assemblierung der Centrin-G-Protein-Komplexe bei der Regulation der licht-abhängigen Translokation von Transducin durch das Verbindungscilium und stellen erstmals ein Modell dieses Mechanismus auf [144-147]*. Dieser neuartige Regelmechanismus von molekularen Translokationen ist

außergewöhnlich und dürfte über die speziellen Photorezeptorzellen hinaus von weit reichender Bedeutung sein.

Centrine werden in ihrer zellulären Funktion nicht nur durch Ca^{2+} -Bindung, sondern auch durch Phosphorylierungen reguliert [155, 189, 190]. Die Aminosäure-Sequenzen der bisher bekannten Centrin-Isoformen weisen mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Protein-Kinasen auf. *In vitro*-Phosphorylierungs-Ansätze an rekombinant exprimierten Centrin-Polypeptiden zeigten, dass die isolierten Protein-Kinasen PKA, PKC und Protein-Kinase CK2 alle Centrin-Isoformen differentiell phosphorylieren können. Nach umfangreichen methodischen Entwicklungsarbeiten konnten wir Versuchsbedingungen erarbeiten, mit Hilfe derer die Phosphorylierung von Centrinen in der Säugetierretina erfasst werden konnte. Dabei konnten wir erstmals zeigen, dass die Inkubation von Centrin-Isoformen mit Proteinextrakten aus hell- und dunkel-adaptierten Rinder- und Rattenretinae und radioaktiv-markiertem ATP zu einer drastischen Erhöhung der Phosphorylierung von Centrinen in den Proben mit dunkel-adaptierten Retinae führt. Durch anschließende Zugabe verschiedener Kinase-Inhibitoren konnte die Proteinkinase CK2 als die entscheidende Kinase bei der Phosphorylierung von Centrinen in der Retina identifiziert werden [158]*. Darüber hinaus konnten wir durch immunocytochemische Untersuchungen erstmals zeigen, dass die CK2 ebenfalls im Cilienapparat, sowohl im Basalkörper als auch im Verbindungscilium, der Photorezeptorzellen lokalisiert ist und dort mit den Centrin-Isoformen kolokalisiert vorliegt. Mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen ist es uns gelungen, die genauen Phosphorylierungsstellen der verschiedenen Centrin-Isoformen zu identifizieren. Dabei zeigte sich, dass alle Centrin-Isoformen äußerst spezifisch jeweils nur an einer Aminosäure phosphoryliert werden, wohingegen das Centrin 3 nicht phosphoryliert wird [158]*. Durch die Phosphorylierung verringert sich die Ca^{2+} -Sensitivität der Centrine, was wiederum zu einer verringerten Bindefähigkeit mit dem Transducin führt und somit als ein antagonistischer Regulationsmechanismus des Centrin-Transducin-Komplexes aufgefasst werden kann (die detaillierte Beschreibung der Centrinphosphorylierung ist in Trojan et al. 2008, Ref.[158]* zu finden). Die vorliegenden Ergebnisse zur Phosphorylierung von Centrinen in der Retina sind einzigartig und spektakulär. Centrine sind die ersten Cytoskelettkomponenten, deren Phosphorylierungsgrad

licht-abhängig moduliert wird. Unsere Ergebnisse weisen auf die Existenz eines Signalweges zwischen der visuellen Signaltransduktionskaskade und der Regulation der Centrin-Aktivität hin. Welche Rolle die Centrin-Phosphorylierung bei der Regulation der Interaktion mit Centrin-Bindepartnern spielt und ob sie beispielsweise auch an der Steuerung der lichtabhängigen Transducin-Translokation beteiligt ist, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

4. Zusammenfassung

Seit Jahren gilt die G-Protein vermittelte Signaltransduktion der Vertebraten Photorezeptorzelle als Paradigma für die Funktion sensorischer Zellen. Die vorliegende Schrift beschäftigt sich mit zwei grundlegenden Prozessen der visuellen Signaltransduktion: zum einen mit dem Mechanismus der Rezeptordeaktivierung der visuellen Kaskade durch die beteiligten Proteine Rhodopsinkinase (RK), Arrestin und p^{44} , zum anderen mit dem licht-induzierten intrazellulären Transport des G-Proteins durch das Verbindungscilium der Photorezeptorzelle.

Die Interaktion des Photorezeptors der Stäbchenzelle, Rhodopsin, mit dem G-Protein Transducin (G_t), initiiert die intermolekulare Transduktion des Lichtsignals. Um die Signalzustände des Photorezeptors wieder in den Grundzustand zurückzuführen, müssen das belichtete Rhodopsin (Rh^*) und das aktivierte Transducin abgeschaltet bzw. deaktiviert werden. Die Deaktivierung wird durch die Interaktion der Rhodopsinkinase (RK) mit Rh^* eingeleitet. Sie führt zur Aktivierung des Enzyms und zur Phosphorylierung des Rezeptors. Der phosphorylierte, aktive Rezeptor wird von Arrestin erkannt, dessen feste Bindung die Weiterleitung des Signals zum Transducin unterbindet. Schon die Bindung der RK hat im Zeitbereich der Reizantwort eine abschaltende Wirkung (sog. Prä-Arrestin). Die Untersuchung der sich daraus ergebenden komplexen Reaktionsfolge der Deaktivierung des Rezeptors und die erfolgreiche Messung der Teilreaktionen konnten einen substantiellen Beitrag zur Aufklärung auf diesem Forschungsgebiet leisten. Das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen RK, Arrestin und seiner splice-Variante (p^{44}) mit dem Rezeptor konnte durch die hier vorgelegten Ergebnisse entscheidend erweitert werden. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass sowohl die C-terminale als auch die N-terminale Domäne des Arrestinmoleküls an der Rezeptorinteraktion beteiligt sind. Weiterhin konnten die funktionellen Unterschiede der Arrestin und p^{44} Wechselwirkung mit dem Rezeptor Rhodopsin analysiert und eine physiologische Rolle des p^{44} im Stäbchenaußensegment abgeleitet werden.

Die massive licht-induzierte Translokation des visuellen G-Proteins Transducin (G_t) zwischen dem lichtsensitiven Außensegment und dem Innensegment der Photorezeptorzelle trägt zur Langzeit-Adaptation der Signaltransduktion bei. Die hier erstmals beschriebene Ca^{2+} -induzierte Bildung eines Komplexes aus G_t und Centrinen dürfte an der Regulation dieser Translokation beteiligt sein. In Säugerzellen sind vier Centrin-Isoformen bekannt, die mit Centriolen von Centrosomen, Spindelkörpern und Basalkörpern assoziiert sind. Darüber hinaus werden alle vier Isoformen in den Photorezeptorzellen der Säugetierretina exprimiert und zeigen deutliche Interaktionen mit $G_t\beta\gamma$ Heterodimeren. Die hochaffine Bindung zum $G_t\beta\gamma$ und die spezifische Lokalisation der Centrin-Isoformen Centrin 1 und 2 im Verbindungscilium weisen darauf hin, dass diese Isoformen zur Transducin-Centrin-Komplexbildung beitragen und an der Regulation des Transducintransportes durch das Cilium beteiligt sind. Nicht nur Ca^{2+} reguliert die Funktion der Centrin-Isoformen, sondern ebenfalls die Phosphorylierung bestimmter Stellen im Molekül. *In vitro* und *ex vivo* Untersuchungen zeigen, dass Centrine lichtabhängig spezifisch phosphoryliert werden können. Durch den Einsatz von Kinaseinhibitoren konnte die Proteinkinase CK2 als ein möglicher Kandidat der lichtabhängigen Centrinphosphorylierung identifiziert werden. Da die Phosphorylierung der Centrine die Bindefähigkeit mit dem Transducin verringert, kann auf einen antagonistischen Regulationsmechanismus des Centrin-Transducin-Komplexes geschlossen werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Pierce, K. L., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2002) Signalling: Seven-transmembrane receptors, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 639-650.
2. Gether, U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors, *Endocr. Rev.* 21, 90-113.
3. Schöneberg, T., Schulz, A. and Gudermann, T. (2002) The structural basis of G-protein-coupled receptor function and dysfunction in human diseases, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 144, 143-227.
4. Kristiansen, K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G protein-coupled receptors: Molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function, *Pharmacol. Ther.* 103, 21-80.
5. Maudsley, S., Martin, B. and Luttrell, L. M. (2005) The origins of diversity and specificity in G protein-coupled receptor signaling, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 485-494.
6. Kobilka, B. K. (2007) G protein coupled receptor structure and activation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1768, 794-807.
7. Hunyady, L., Vauquelin, G. and Vanderheyden, P. (2003) Agonist induction and conformational selection during activation of a G protein-coupled receptor, *Trends. Pharmacol. Sci.* 24, 81-86.
8. Brady, A. E. and Limbird, L. E. (2002) G protein-coupled receptor interacting proteins: Emerging roles in localization and signal transduction, *Cell Signal* 14, 297-309.
9. Hamm, H. E. (1998) The many faces of G protein signaling, *J. Biol. Chem.* 273, 669-672.
10. Gilman, A. G. (1987) G proteins: Transducers of receptor-generated signals, *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
11. Offermanns, S. (2003) G proteins as transducers in transmembrane signalling, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 83, 101-130.
12. Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1997) Receptor-regulated ion channels, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 155-160.
13. Cismowski, M. J., Takesono, A., Bernard, M. L., Duzic, E. and Lanier, S. M. (2001) Receptor-independent activators of heterotrimeric G-proteins, *Life Sci.* 68, 2301-2308.
14. Knust, E. (2001) G protein signaling and asymmetric cell division, *Cell* 107, 125-128.
15. Goldstein, B. (2003) Asymmetric division: AGS proteins position the spindle, *Curr. Biol.* 13, R879-880.
16. Kohout, T. A. and Lefkowitz, R. J. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization, *Mol. Pharmacol.* 63, 9-18.
17. Penn, R. B., Pronin, A. N. and Benovic, J. L. (2000) Regulation of G protein-coupled receptor kinases, *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 81-89.
18. Tobin, A. B. (2008) G protein-coupled receptor phosphorylation: Where, when and by whom, *Br. J. Pharmacol.* 153, S167-S176.
19. Milligan, G. and White, J. H. (2001) Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 513-518.

20. Pugh, E. N. J. and Lamb, T. (2000) Phototransduction in vertebrate rods and cones: Molecular mechanism of amplification, recovery and light adaptation, in *Molecular Mechanism in visual transduction* (Stavenga, D. G., DeGrip, W. J., and Pugh, E. N. J., Eds.), pp 183-255, Elsevier science Publisher BV, Amsterdam.
21. Molday, R. S. and Kaupp, U. B. (2000) Ion channels of vertebrate photoreceptors, in *Molecular Mechanism in visual transduction* (Stavenga, D. G., DeGrip, W. J., and Pugh, E. N. J., Eds.), pp 143-182, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
22. Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W. and Ernst, O. P. (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin, *Nature* 454, 183-187.
23. Filipek, S., Teller, D. C., Palczewski, K. and Stenkamp, R. (2003) The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G Protein-coupled receptors, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 110601.142520.
24. Mirzadegan, T., Benko, G., Filipek, S. and Palczewski, K. (2003) Sequence analyses of G protein-coupled receptors: Similarities to rhodopsin, *Biochemistry* 42, 4310.
25. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, *Science* 289, 739-745.
26. Okada, T., Ernst, O. P., Palczewski, K. and Hofmann, K. P. (2001) Activation of rhodopsin: New insights from structural and biochemical studies, *Trends Biochem. Sci.* 26, 318-324.
27. Ernst, O. P. and Bartl, F. J. (2002) Active states of rhodopsin, *Chem. Bio. Chem.* 3, 968-974.
28. Sakmar, T. P., Menon, S. T., Marin, E. P. and Awad, E. S. (2002) Rhodopsin: Insights from recent structural studies, *Annu. Rev. of Biophys. Biomol. Struct.* 31, 443-484.
29. Kliger, D. S. and Lewis, J. W. (1995) Spectral and kinetic characterization of visual pigment photointermediates, *Isr. J. Chem.* 35, 289-307.
30. Siebert, F. (1995) Application of FTIR spectroscopy to the investigation of dark structures and photoreactions of visual pigments, *Isr. J. Chem.* 35, 309-323.
31. Hofmann, K. P. (2000) Late photoproducts and signaling states of bovine rhodopsin, in *Molecular Mechanism in visual transduction* (Stavenga, D. G., DeGrip, W. J., and Pugh, E. N. J., Eds.), pp 91-142, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
32. Parkes, J. H. and Liebman, P. A. (1984) Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions, *Biochemistry* 23, 5054-5061.
33. Fahmy, K., Sakmar, T. P. and Siebert, F. (2000) Transducin-dependent protonation of glutamic acid 134 in rhodopsin, *Biochemistry* 39, 10607-10612.
34. Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K. P. and Ernst, O. P. (2003) Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2290-2295.

35. Knierim, B., Hofmann, K. P., Ernst, O. P. and Hubbell, W. L. (2007) Sequence of late molecular events in the activation of rhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 20290-20295.
36. Knierim, B., Hofmann, K. P., Gartner, W., Hubbell, W. L. and Ernst, O. P. (2008) Rhodopsin and 9-demethyl-retinal analog: Effect of a partial agonist on displacement of transmembrane helix 6 in class A G protein-coupled receptors, *J. Biol. Chem.* 283, 4967-4974.
37. Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauss, N., Choe, H. W., Hofmann, K. P. and Ernst, O. P. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation, *Nature* 455, 497-502.
38. König, B., Arendt, A., McDowell, J. H., Kahlert, M., Hargrave, P. A. and Hofmann, K. P. (1989) Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6878-6882.
39. Franke, R. R., König, B., Sakmar, T. P., Khorana, H. G. and Hofmann, K. P. (1990) Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transducin, *Science* 250, 123-125.
40. Franke, R. R., Sakmar, T. P., Graham, R. M. and Khorana, H. G. (1992) Structure and function in rhodopsin. Studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin, *J. Biol. Chem.* 267, 14767-14774.
41. Khorana, H. G. (1992) Rhodopsin, photoreceptor of the rod cell. An emerging pattern for structure and function, *J. Biol. Chem.* 267, 1-4.
42. Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E. and Sigler, P. B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein, *Nature* 379, 311-319.
43. Bennett, N. and Dupont, Y. (1985) The G-protein of retinal rod outer segments (transducin). Mechanism of interaction with rhodopsin and nucleotides, *J. Biol. Chem.* 260, 4156-4168.
44. Unger, V. M., Hargrave, P. A., Baldwin, J. M. and Schertler, G. F. (1997) Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices, *Nature* 389, 203-206.
45. Kisselev, O. G., Meyer, C. K., Heck, M., Ernst, O. P. and Hofmann, K. P. (1999) Signal transfer from rhodopsin to the G protein: Evidence for a two-site sequential fit mechanism., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4898-4903.
46. Herrmann, R., Heck, M., Henklein, P., Henklein, P., Kleuss, C., Hofmann, K. P. and Ernst, O. P. (2004) Sequence of interactions in receptor-G protein coupling, *J. Biol. Chem.* 279, 24283-24290.
47. Lamb, T. D. and Pugh, E. N. J. (1992) A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors, *J. Physiol.* 449, 719-758.
48. Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D. and Pugh, E. N. J. (2002) G proteins and phototransduction, *Annu. Rev. Physiol.* 64, 153-187.
49. Heck, M. and Hofmann, K. P. (2001) Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin catalyzed transducin activation: Initial rate analysis based on a double displacement mechanism, *J. Biol. Chem.* 276, 10000-10009.
50. Leskov, I. B., Klenchin, V. A., Handy, J. W., Whitlock, G. G., Govardovskii, V. I., Bownds, M. D., Lamb, T. D., Pugh, E. N. J. and Arshavsky, V. Y. (2000) The gain of rod phototransduction: Reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements, *Neuron* 27, 525-537.

51. Beavo, J. A. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms, *Physiol. Rev.* 75, 725-748.
52. Omori, K. and Kotera, J. (2007) Overview of PDEs and their regulation, *Circ. Res.* 100, 309-327.
53. Conti, M. and Beavo, J. (2007) Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: Essential components in cyclic nucleotide signaling, *Annu. Rev. Biochem.* 76, 481-511.
54. Cote, R. H. (2004) Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5, *Int. J. Impot. Res.* 16 Suppl 1, S28-33.
55. Hofmann, K. P. and Heck, M. (1996) Light-induced protein-protein interactions on the rod photoreceptor disc membrane, in *Biomembranes II* (Lee, A. G., Ed.), pp 141-198, JAI press, Greenwich.
56. Stryer, L. (1986) Cyclic GMP cascade of vision, *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 87-119.
57. Kaupp, U. B. and Seifert, R. (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels, *Physiol. Rev.* 82, 769-824.
58. Higgins, M. K., Weitz, D., Warne, T., Schertler, G. F. and Kaupp, U. B. (2002) Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: The arrangement of the cytoplasmic domains, *EMBO J.* 21, 2087-2094.
59. Antonny, B., Otto Bruc, A., Chabre, M. and Vuong, T. M. (1993) GTP hydrolysis by purified alpha-subunit of transducin and its complex with the cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor, *Biochemistry* 32, 8646-8653.
60. He, W., Cowan, C. W. and Wensel, T. G. (1998) RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction, *Neuron* 20, 95-102.
61. Ross, E. M. and Wilkie, T. M. (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 69, 795-827.
62. Hall, S. W. and Kuhn, H. (1986) Purification and properties of guanylate kinase from bovine retinas and rod outer segments, *Eur. J. Biochem.* 161, 551-556.
63. Pugh, E. N., Jr., Duda, T., Sitaramayya, A. and Sharma, R. K. (1997) Photoreceptor guanylate cyclases: A review, *Biosci. Rep.* 17, 429-473.
64. Ohguro, H., Van Hooser, J. P., Milam, A. H. and Palczewski, K. (1995) Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 270, 14259-14262.
65. Mendez, A., Burns, M. E., Roca, A., Lem, J., Wu, L. W., Simon, M. I., Baylor, D. A. and Chen, J. (2000) Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites, *Neuron* 28, 153-164.
66. Maeda, T., Imanishi, Y. and Palczewski, K. (2003) Rhodopsin phosphorylation: 30 years later, *Prog. Ret. Eye Res.* 22, 417-434.
67. Pulvermüller, A., Palczewski, K. and Hofmann, K. P. (1993) Interaction between photoactivated rhodopsin and its kinase: Stability and kinetics of complex formation, *Biochemistry* 32, 14082-14088.
68. Gibson, S. K., Parkes, J. H. and Liebman, P. A. (2000) Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G Protein and arrestin, *Biochemistry* 39, 5738-5749.
69. Wilden, U., Hall, S. W. and Kühn, H. (1986) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 1174-1178.

70. Hofmann, K. P., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Van Hooser, P. and Palczewski, K. (1992) The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin, *J. Biol. Chem.* 267, 15701-15706.
71. Schädel, S. A., Heck, M., Maretzki, D., Filipek, S., Teller, D. C., Palczewski, K. and Hofmann, K. P. (2003) Ligand Channeling within a G-protein-coupled Receptor: The entry and exit of retinals in native opsin, *J. Biol. Chem.* 278, 24896-24903.
72. Heck, M., Schädel, S. A., Maretzki, D. and Hofmann, K. P. (2003) Secondary binding sites of retinoids in opsin: characterization and role in regeneration, *Vision Res.* 43, 3003-3010.
73. Navid, A., Nicholas, S. C. and Hamer, R. D. (2006) A proposed role for all-trans retinal in regulation of rhodopsin regeneration in human rods, *Vision Res.* 46, 4449-4463.
74. Hildebrand, P.W., Scheerer, P., Park, J.H., Choe, H.W., Piechnick, R., Ernst, O.P., Hofmann, K.P., Heck M. (2009) A ligand channel through the G protein coupled receptor opsin., *PLoS ONE.* 4, e4382.
75. Weng, J., Mata, N. L., Azarian, S. M., Tzekov, R. T., Birch, D. G. and Travis, G. H. (1999) Insights into the function of rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice, *Cell* 98, 13-23.
76. Lamb, T. D. and Pugh, E. N. J. (2004) Dark adaptation and the retinoid cycle of vision, *Prog. Ret. Eye Res.* 23, 307-380.
77. McBee, J. K., Palczewski, K., Baehr, W. and Pepperberg, D. R. (2001) Confronting complexity: The interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina, *Prog. Ret. Eye Res.* 20, 469-529.
78. Vinos, J., Jalink, K., Hardy, R. W., Britt, S. G. and Zuker, C. S. (1997) A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function, *Science* 277, 687-690.
79. Palczewski, K. and Benovic, J. L. (1991) G protein-coupled receptor kinases, *Trends Biochem. Sci.* 16, 387-391.
80. Inglese, J., Freedman, N. J., Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J. (1993) Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases, *J. Biol. Chem.* 268, 23735-23738.
81. Haga, T., Haga, K. and Kameyama, K. (1994) G protein-coupled receptor kinases, *J. Neurochem.* 63, 400-412.
82. Premont, R. T., Inglese, J. and Lefkowitz, R. J. (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors, *FASEB J.* 9, 175-182.
83. Lohse, M. J., Bluml, K., Danner, S. and Krasel, C. (1996) Regulators of G-protein-mediated signalling, *Biochem. Soc. Trans.* 24, 975-980.
84. Chuang, T. T., Iacovelli, L., Sallese, M. and De Blasi, A. (1996) G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications, *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 416-421.
85. Pitcher, J. A., Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J. (1998) G protein-coupled receptor kinases, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653-692.
86. Premont, R. T. and Gainetdinov, R. R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins, *Annu. Rev. Physiol.* 69, 511-534.
87. Sokal, I., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Hofmann, K. P. and Palczewski, K. (2002) Rhodopsin and its kinase, *Methods Enzymol.* 343, 578-600.

88. Premont, R. T., Macrae, A. D., Aparicio, S. A., Kendall, H. E., Welch, J. E. and Lefkowitz, R. J. (1999) The GRK4 subfamily of G protein-coupled receptor kinases. Alternative splicing, gene organization, and sequence conservation, *J. Biol. Chem.* 274, 29381-29389.
89. Singh, P., Wang, B., Maeda, T., Palczewski, K. and Tesmer, J. J. (2008) Structures of rhodopsin kinase in different ligand states reveal key elements involved in G protein-coupled receptor kinase activation, *J. Biol. Chem.* 283, 14053-14062.
90. Lodowski, D. T., Barnhill, J. F., Pitcher, J. A., Capel, W. D., Lefkowitz, R. J. and Tesmer, J. J. (2003) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and G $\beta_1\gamma_2$, *Acta Crystallogr D* 59, 936-939.
91. Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T. and Tesmer, J. J. (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: The G α_q -GRK2-G $\beta\gamma$ complex, *Science* 310, 1686-1690.
92. Lodowski, D. T., Barnhill, J. F., Pyskadlo, R. M., Ghirlando, R., Sterne-Marr, R. and Tesmer, J. J. (2005) The role of G $\beta\gamma$ and domain interfaces in the activation of G protein-coupled receptor kinase 2, *Biochemistry* 44, 6958-6970.
93. Lodowski, D. T., Tesmer, V. M., Benovic, J. L. and Tesmer, J. J. (2006) The structure of G protein-coupled receptor kinase (GRK)-6 defines a second lineage of GRKs, *J. Biol. Chem.* 281, 16785-16793.
94. Palczewski, K., Buczylko, J., Lebioda, L., Crabb, J. and Polans, A. (1993) Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin, *J. Biol. Chem.* 268, 6004-6013.
95. Yu, Q. M., Cheng, Z. J., Gan, X. Q., Bao, G. B., Li, L. and Pei, G. (1999) The amino terminus with a conserved glutamic acid of G protein-coupled receptor kinases is indispensable for their ability to phosphorylate photoactivated rhodopsin, *J. Neurochem.* 73, 1222-1227.
96. Levay, K., Satpaev, D. K., Pronin, A. N., Benovic, J. L. and Slepak, V. Z. (1998) Localization of the sites for Ca²⁺-binding proteins on G protein-coupled receptor kinases, *Biochemistry* 37, 13650-13659.
97. Higgins, M. K., Oprian, D. D. and Schertler, G. F. (2006) Recoverin binds exclusively to an amphipathic peptide at the N terminus of rhodopsin kinase, inhibiting rhodopsin phosphorylation without affecting catalytic activity of the kinase, *J. Biol. Chem.* 281, 19426-19432.
98. Siderovski, D. P., Hessel, A., Chung, S., Mak, T. W. and Tyers, M. (1996) A new family of regulators of G-protein-coupled receptors?, *Curr. Biol.* 6, 211-212.
99. Buczylko, J., Gutmann, C. and Palczewski, K. (1991) Regulation of rhodopsin kinase by autophosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2568-2572.
100. Perry, S. J. and Lefkowitz, R. J. (2002) Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation, *Trends Cell Biol.* 12, 130-138.
101. Hunzicker-Dunn, M., Gurevich, V. V., Casanova, J. E. and Mukherjee, S. (2002) ARF6: A newly appreciated player in G protein-coupled receptor desensitization, *FEBS Lett.* 521, 3-8.

102. Perry, S. J., Baillie, G. S., Kohout, T. A., McPhee, I., Magiera, M. M., Ang, K. L., Miller, W. E., McLean, A. J., Conti, M., Houslay, M. D. and Lefkowitz, R. J. (2002) Targeting of cyclic AMP degradation to β 2-adrenergic receptors by β -arrestins, *Science* 298, 834-836.
103. Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2001) β -Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and β 2-adrenergic receptor endocytosis, *J. Biol. Chem.* 276, 42509-42513.
104. Goodman, O. B., Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1996) β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor, *Nature* 383, 447-450.
105. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Zhang, J., Holt, J. A., Ferguson, S. S. G., Caron, M. G. and Barak, L. S. (1999) The β 2-adrenergic receptor / β -arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3712-3717.
106. McDonald, P. H., Cote, N. L., Lin, F. T., Premont, R. T., Pitcher, J. A. and Lefkowitz, R. J. (1999) Identification of NSF as a β -arrestin1-binding protein. Implications for β 2-adrenergic receptor regulation, *J. Biol. Chem.* 274, 10677-10680.
107. Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1999) β -Arrestin-dependent formation of β 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes, *Science* 283, 655-661.
108. Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2449-2454.
109. McDonald, P. H., Chow, C. W., Miller, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F. T., Davis, R. J. and Lefkowitz, R. J. (2000) β -Arrestin 2: A receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3, *Science* 290, 1574-1577.
110. Gurevich, V. V. and Gurevich, E. V. (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors, *Pharmacol. Ther.* 110, 465-502.
111. Gurevich, E. V. and Gurevich, V. V. (2006) Arrestins: Ubiquitous regulators of cellular signaling pathways, *Genome Biol.* 7, 236.
112. Granzin, J., Wilden, U., Choe, H. W., Labahn, J., Krafft, B. and Büldt, G. (1998) X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments, *Nature* 391, 918-921.
113. Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V. and Sigler, P. B. (1999) The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: A model for arrestin's regulation, *Cell* 97, 257-269.
114. Han, M., Gurevich, V. V., Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B. and Schubert, C. (2001) Crystal structure of β -arrestin at 1.9 Å. Possible mechanism of receptor binding and membrane translocation, *Structure* 9, 869-880.
115. Sutton, R. B., Vishnivetskiy, S. A., Robert, J., Hanson, S. M., Raman, D., Knox, B. E., Kono, M., Navarro, J. and Gurevich, V. V. (2005) Crystal structure of cone arrestin at 2.3 Å: Evolution of receptor specificity, *J. Mol. Biol.* 354, 1069-1080.

116. Palczewski, K. (1994) Structure and functions of arrestins, *Protein Sci.* 3, 1355-1361.
117. Pulvermüller, A., Schröder, K., Fischer, T. and Hofmann, K. P. (2000) Interaction of metarhodopsin II: Arrestin peptides compete with arrestin and transducin, *J. Biol. Chem.* 275, 37679-37685.
118. Schröder, K., Pulvermüller, A. and Hofmann, K. P. (2002) Arrestin and its splice variant Arr^{1-370A} (p⁴⁴). *J. Biol. Chem.* 277, 43987-43996.
119. Schleicher, A., Kühn, H. and Hofmann, K. P. (1989) Kinetics, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein-rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II, *Biochemistry* 28, 1770-1775.
120. Pulvermüller, A., Maretzki, D., Rudnicka Nawrot, M., Smith, W. C., Palczewski, K. and Hofmann, K. P. (1997) Functional differences in the interaction of arrestin and its splice variant, p⁴⁴, with rhodopsin, *Biochemistry* 36, 9253-9260.
121. Hanson, S. M., Gurevich, E. V., Vishnivetskiy, S. A., Ahmed, M. R., Song, X. and Gurevich, V. V. (2007) Each rhodopsin molecule binds its own arrestin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3125-3128.
122. Gurevich, V. V. and Gurevich, E. V. (2004) The molecular acrobatics of arrestin activation, *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 105-111.
123. Park, P. S., Filipek, S., Wells, J. W. and Palczewski, K. (2004) Oligomerization of G Protein-coupled receptors: Past, present, and future, *Biochemistry* 43, 15643-15656.
124. Modzelewska, A., Filipek, S., Palczewski, K. and Park, P. S. (2006) Arrestin interaction with rhodopsin: Conceptual models, *Cell Biochem. Biophys.* 46, 1-15.
125. Skegro, D., Pulvermüller, A., Krafft, B., Granzin, J., Hofmann, K. P., Büldt, G. and Schlesinger, R. (2007) N-terminal and C-terminal domains of arrestin both contribute in binding to rhodopsin, *Photochem. Photobiol.* 83, 385-393.
126. Wilden, U., Wust, E., Weyand, I. and Kuhn, H. (1986) Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin, *FEBS Lett.* 207, 292-295.
127. Xu, J., Dodd, R. L., Makino, C. L., Simon, M. I., Baylor, D. A. and Chen, J. (1997) Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin, *Nature* 389, 505-509.
128. Palczewski, K., Buczylo, J., Ohguro, H., Annan, R. S., Carr, S. A., Crabb, J. W., Kaplan, M. W., Johnson, R. S. and Walsh, K. A. (1994) Characterization of a truncated form of arrestin isolated from bovine rod outer segments, *Protein Sci.* 3, 314-324.
129. Smith, W. C., Milam, A. H., Dugger, D., Arendt, A., Hargrave, P. A. and Palczewski, K. (1994) A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina, *J. Biol. Chem.* 269, 15407-15410.
130. Young, R. W. (1976) Visual cells and the concept of renewal, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 15, 700-725.
131. Tai, A. W., Chuang, J. Z., Bode, C., Wolfrum, U. and Sung, C. H. (1999) Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1, *Cell* 97, 877-887.

132. Liu, X., Udovichenko, I. P., Brown, S. D., Steel, K. P. and Williams, D. S. (1999) Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium, *J. Neurosci.* 19, 6267-6274.
133. Wolfrum, U. and Schmitt, A. (2000) Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells, *Cell Motil. Cytoskeleton* 46, 95-107.
134. Marszalek, J. R., Liu, X., Roberts, E. A., Chui, D., Marth, J. D., Williams, D. S. and Goldstein, L. S. (2000) Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors, *Cell* 102, 175-187.
135. Hardie, R. (2002) Adaptation through translocation, *Neuron* 34, 3-5.
136. Sokolov, M., Lyubarsky, A. L., Strissel, K. J., Savchenko, A. B., Govardovskii, V. I., Pugh, E. N. J. and Arshavsky, V. Y. (2002) Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells. A novel mechanism of light adaptation, *Neuron* 34, 95-106.
137. Philp, N. J., Chang, W. and Long, K. (1987) Light-stimulated protein movement in rod photoreceptor cells of the rat retina, *FEBS Lett.* 225, 127-132.
138. Whelan, J. P. and McGinnis, J. F. (1988) Light-dependent subcellular movement of photoreceptor proteins, *J. Neurosci. Res.* 20, 263-270.
139. McGinnis, J. F., Matsumoto, B., Whelan, J. P. and Cao, W. (2002) Cytoskeleton participation in subcellular trafficking of signal transduction proteins in rod photoreceptor cells, *J. Neurosci. Res.* 67, 290-297.
140. Mendez, A., Lem, J., Simon, M. and Chen, J. (2003) Light-dependent translocation of arrestin in the absence of rhodopsin phosphorylation and transducin signaling, *J. Neurosci.* 23, 3124-3129.
141. Zhang, H., Huang, W., Zhu, X., Craft, C. M., Baehr, W. and Chen, C. K. (2003) Light-dependent redistribution of visual arrestins and transducin subunits in mice with defective phototransduction, *Mol. Vis.* 9, 231-237.
142. Sokolov, M., Strissel, K. J., Leskov, I. B., Michaud, N. A., Govardovskii, V. I. and Arshavsky, V. Y. (2004) Phosducin facilitates light-driven transducin translocation in rod photoreceptors: Evidence from the phosducin knockout mouse, *J. Biol. Chem.* 279, 19149-19156.
143. Calvert, P. D., Strissel, K. J., Schiesser, W. E., Pugh, E. N., Jr. and Arshavsky, V. Y. (2006) Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors, *Trends Cell. Biol.* 16, 560-568.
144. Pulvermüller, A., Gießl, A., Heck, M., Wottrich, R., Schmitt, A., Ernst, O. P., Choe, H. W., Hofmann, K. P. and Wolfrum, U. (2002) Calcium-dependent assembly of centrin-G-Protein complex in photoreceptor cells, *Mol. Cell. Biol.* 22, 2194-2203.
145. Wolfrum, U., Gießl, A. and Pulvermüller, A. (2002) Centrins, a novel group of Ca²⁺-binding proteins in vertebrate photoreceptor cells, *Adv. Exp. Med. Biol.* 514, 155-178.
146. Giessl, A., Pulvermüller, A., Trojan, P., Park, J. H., Choe, H.-W., Ernst, O. P., Hofmann, K. P. and Wolfrum, U. (2004) Differential expression and interaction with the visual G-protein transducin of centrin isoforms in mammalian photoreceptor cells, *J. Biol. Chem.* 279, 51472-51480.

147. Giessl, A., Trojan, P., Pulvermüller, A. and Wolfrum, U. (2004) Centrin, potential regulators of transducin translocation in photoreceptor cells, in *Photoreceptor cell biology and inherited retinal degenerations* (Williams, D. S., Ed.), pp 195-222, World Scientific Publishing, Singapore.
148. Giessl, A., Trojan, P., Rausch, S., Pulvermüller, A. and Wolfrum, U. (2006) Centrin, gatekeepers for the light-dependent translocation of transducin through the photoreceptor cell connecting cilium, *Vision Res.* 46, 4502-4509.
149. Huang, B., Mengersen, A. and Lee, V. D. (1988) Molecular cloning of cDNA for caltractin, a basal body-associated Ca^{2+} - binding protein: Homology in its protein sequence with calmodulin and the yeast CDC31 gene product, *J. Cell Biol.* 107, 133-140.
150. Kretsinger, R. H. (1976) Calcium-binding proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 45, 239-266.
151. Salisbury, J. L. (1995) Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 39-45.
152. Salisbury, J. L. and Floyd, G. L. (1978) Calcium-induced contraction of the rhizoplast of aquadriflagellate green algae, *Science* 202, 975-976.
153. Trojan, P., Krauss, N., Choe, H. W., Gießl, A., Pulvermüller, A. and Wolfrum, U. (2008) Centrin in retinal photoreceptor cells: Regulators in the connecting cilium, *Prog. Ret. Eye Res.* 27, 237-259.
154. Schiebel, E. and Bornens, M. (1995) In search of a function for centrin, *Trends Cell Biol.* 5, 197-201.
155. Lutz, W., Lingle, W. L., McCormick, D., Greenwood, T. M. and Salisbury, J. L. (2001) Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication, *J. Biol. Chem.* 276, 20774-20780.
156. Middendorp, S., Kuntziger, T., Abraham, Y., Holmes, S., Bordes, N., Paintrand, M., Paoletti, A. and Bornens, M. (2000) A role for centrin 3 in centrosome reproduction, *J. Cell Biol.* 148, 405-416.
157. Salisbury, J. L., Suino, K. M., Busby, R. and Springett, M. (2002) Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells, *Curr. Biol.* 12, 1287-1292.
158. Trojan, P., Rausch, S., Gießl, A., Klemm, C., Krause, E., Pulvermüller, A. and Wolfrum, U. (2008) Light-dependent CK2-mediated phosphorylation of centrin regulates complex formation with visual G-protein, *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 1248-1260.
159. Hofmann, K. P. (1986) Photoproducts of rhodopsin in the disc membrane, *Photobiochem. Photobiochem.* 13, 309-327.
160. Palczewski, K., Buczylo, J., Kaplan, M. W., Polans, A. S. and Crabb, J. W. (1991) Mechanism of rhodopsin kinase activation, *J. Biol. Chem.* 266, 12949-12955.
161. Heck, M., Pulvermüller, A. and Hofmann, K. P. (2000) Light scattering methods to monitor interactions between rhodopsin-containing membranes and soluble proteins, *Methods Enzymol.* 315, 329-347.
162. Hamer, R. D., Nicholas, S. C., Tranchina, D., Liebman, P. A. and Lamb, T. D. (2003) Multiple steps of phosphorylation of activated rhodopsin can account for the reproducibility of vertebrate rod single-photon responses, *J. Gen. Physiol.* 122, 419-444.

163. Gurevich, V. V. and Benovic, J. L. (1993) Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin, *J. Biol. Chem.* 268, 11628-11638.
164. Palczewski, K., Pulvermüller, A., Buczylo, J. and Hofmann, K. P. (1991) Phosphorylated rhodopsin and heparin induce similar conformational changes in arrestin, *J. Biol. Chem.* 266, 18649-18654.
165. Gurevich, V. V. and Benovic, J. L. (1995) Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin, *J. Biol. Chem.* 270, 6010-6016.
166. Gray Keller, M. P., Detwiler, P. B., Benovic, J. L. and Gurevich, V. V. (1997) Arrestin with a single amino acid substitution quenches light-activated rhodopsin in a phosphorylation-independent fashion, *Biochemistry* 36, 7058-7063.
167. Vishnivetskiy, S. A., Schubert, C., Climaco, G. C., Gurevich, Y. V., Velez, M. G. and Gurevich, V. V. (2000) An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation, *J. Biol. Chem.* 275, 41049-41057.
168. Vishnivetskiy, S. A., Paz, C. L., Schubert, C., Hirsch, J. A., Sigler, P. B. and Gurevich, V. V. (1999) How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin?, *J. Biol. Chem.* 274, 11451-11454.
169. Palczewski, K., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Gutmann, C. and Hofmann, K. P. (1991) Binding of inositol phosphates to arrestin, *FEBS Lett.* 295, 195-199.
170. Kieselbach, T., Irrgang, K. D. and Rüppel, H. (1994) A segment corresponding to amino acids Val170-Arg182 of bovine arrestin is capable of binding to phosphorylated rhodopsin, *Eur. J. Biochem.* 226, 87-97.
171. Ohguro, H., Palczewski, K., Walsh, K. A. and Johnson, R. S. (1994) Topographic study of arrestin using differential chemical modifications and hydrogen/deuterium exchange, *Protein Sci.* 3, 2428-2434.
172. Dinculescu, A., McDowell, J. H., Amici, S. A., Dugger, D. R., Richards, N., Hargrave, P. A. and Smith, W. C. (2002) Insertional mutagenesis and immunochemical analysis of visual arrestin interaction with rhodopsin, *J. Biol. Chem.* 277, 11703-11708.
173. Vishnivetskiy, S. A., Hosey, M. M., Benovic, J. L. and Gurevich, V. V. (2004) Mapping the arrestin-receptor interface: Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins *J. Biol. Chem.* 279, 1262-1268.
174. Vishnivetskiy, S. A., Hirsch, J. A., Velez, M. G., Gurevich, Y. V. and Gurevich, V. V. (2002) Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended Interdomain hinge, *J. Biol. Chem.* 277, 43961-43967.
175. Cerver, J., Vishnivetskiy, S. A., Chavkin, C. and Gurevich, V. V. (2002) Conservation of the phosphate-sensitive elements in the arrestin family of proteins, *J. Biol. Chem.* 277, 9043-9048.
176. Gurevich, V. V. (1998) The selectivity of visual arrestin for light-activated phosphorhodopsin is controlled by multiple nonredundant mechanisms, *J. Biol. Chem.* 273, 15501-15506.

177. Gurevich, V. V. and Benovic, J. L. (1992) Cell-free expression of visual arrestin. Truncation mutagenesis identifies multiple domains involved in rhodopsin interaction, *J. Biol. Chem.* 267, 21919-21923.
178. Shilton, B. H., McDowell, J. H., Smith, W. C. and Hargrave, P. A. (2002) The solution structure and activation of visual arrestin studied by small-angle X-ray scattering, *Eur. J. Biochem.* 269, 3801-3809.
179. Smith, W. C., Gurevich, E. V., Dugger, D. R., Vishnivetskiy, S. A., Shelamer, C. L., McDowell, J. H. and Gurevich, V. V. (2000) Cloning and functional characterization of salamander rod and cone arrestins, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2445-2455.
180. Gurevich, V. V. and Benovic, J. L. (1997) Mechanism of phosphorylation-recognition by visual arrestin and the transition of arrestin into a high affinity binding state, *Mol. Pharmacol.* 51, 161-169.
181. Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A. and Palczewski, K. (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes, *Nature* 421, 127-128.
182. Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D. A., Engel, A. and Palczewski, K. (2004) The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane, *FEBS Lett.* 564, 281-288.
183. Gaudet, R., Bohm, A. and Sigler, P. B. (1996) Crystal structure at 2.4 Å resolution of the complex of transducin $\beta\gamma$ and its regulator, phosducin, *Cell* 87, 577-588.
184. Wolfrum, U. and Salisbury, J. L. (1998) Expression of centrin isoforms in the mammalian retina, *Exp. Cell Res.* 242, 10-17.
185. Laoukili, J., Perret, E., Middendorp, S., Houcine, O., Guennou, C., Marano, F., Bornens, M. and Tournier, F. (2000) Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro, *J. Cell Sci.* 113, 1355-1364.
186. Gavet, O., Alvarez, C., Gaspar, P. and Bornens, M. (2003) Centrin4p, a novel Mammalian centrin specifically expressed in ciliated cells, *Mol. Biol. Cell* 14, 1818-1834.
187. Wolfrum, U. (1998) Unkonventionelle ciliäre Cytoskelettelemente in Sinneszelle von Vertebraten, Habilitationsschrift, Karlsruhe.
188. Wolfrum, U. (1995) Centrin in the photoreceptor cells of mammalian retinae, *Cell Motil. Cytoskeleton* 32, 55-64.
189. Salisbury, J. L., Baron, A., Surek, B. and Melkonian, M. (1984) Striated flagellar roots: Isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle, *J. Cell Biol.* 99, 962-970.
190. Martindale, V. E. and Salisbury, J. L. (1990) Phosphorylation of algal centrin is rapidly responsive to changes in the external milieu, *J. Cell Sci.* 96 (Pt 3), 395-402.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Peter Hofmann, der mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit gab, sie durch Anregungen und Diskussionen förderte und großzügig unterstützte und mir gleichzeitig die nötige wissenschaftliche Freiheit gewährt hat.

Besonders möchte ich allen danken, die als, Diplomanten, Doktoranden und wissenschaftliche Mitarbeiter zu meiner Gruppe gehört haben oder noch gehören und deren Beiträge in diese Arbeit eingeflossen sind. Dies sind: Dr. Thomas Fischer, Dr. Katrin Schröder, Dr. Gundula Meißner, Sebastian Rausch, Annette Berg, und Ines Woblick. Ohne derer aller Interesse, Können und Begeisterung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe Wolfrum, für die nun über sechsjährige intensive Kooperation, die meiner Forschungstätigkeit eine zusätzliche neue Richtung eröffnete.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich PD. Dr. Franz Josef Bartl, Dr. Eglof Ritter, Prof. Dr. Hui-Woog Choe, Dr. Peter Henklein, Dr. Kerstin Zimmermann, Katja Waterstradt und ganz besonders meinen Kollegen aus „alten Freiburger Tagen“, Dr. Martin Heck, und PD. Dr. Oliver Peter Ernst, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für die Unterstützung und Ratschläge in der Lehre möchte ich mich stellvertretend bei Herrn PD. Dr. Manfred Pohl bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Ingrid Semjonow, Jana Engelmann, Helena Seibel und Christine Koch für ihre technische Unterstützung bedanken. Darüber gilt mein Dank allen Mitarbeitern des IMPB für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ferner danke ich für die Zusammenarbeit mit den Laboren von Prof. Dr. Krzysztof Palczewski und Prof. Dr. Georg Büldt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Forschungsförderung der Charité möchte ich meinen Dank für die finanzielle Unterstützung der Arbeit aussprechen.

Einen besonderen Dank möchte ich meinem geschätzten Kollegen und Waidgenossen Andreas von Usedom für seine stets aufmunternde Art und weit über die Arbeit hinausgehende Hilfsbereitschaft aussprechen.

Zu guter letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie für die liebevolle Unterstützung und den starken Rückhalt bedanken.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

14.04.2009

.....

Datum

.....

Unterschrift