

# 1 Einleitung

## 1.1 Die G-Protein gekoppelte Signalübertragung

Zu den Grundlagen des Lebens zählen die Fähigkeiten aller Lebewesen, ihre Aktivitäten auf allen biologischen Organisationsebenen zu koordinieren und auf Veränderungen ihrer Umgebung flexibel zu reagieren. Dies erfordert die Wahrnehmung und Verarbeitung äußerer Reize sowie in höheren Lebewesen die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen. In der eukaryontischen Signalübertragung spielen hierbei die G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine zentrale Rolle. Darunter versteht man membranständige Rezeptoren, die ihre Wirkung über Guanylnucleotid-bindende Proteine, den sogenannten G-Proteinen, entfalten. G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind an der Übertragung chemischer Signale wie Hormone, Neurotransmitter oder Duftstoffe, aber auch an der Wahrnehmung physikalischer Signale wie z.B. Licht verschiedener Wellenlängen beteiligt. Obwohl G-Protein gekoppelte Rezeptoren somit auf ein weitreichendes Spektrum völlig unterschiedlicher Signale reagieren, basiert die G-Protein gekoppelte Signalübertragung auf einem gemeinsamen molekularen Mechanismus, der mit der folgenden Modellvorstellung beschrieben werden kann:

G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind integrale Membranproteine und besitzen auf einer Seite der Membran eine Bindestelle für ein spezifisches Signalmolekül. Die Bindung des Signalmoleküls an den Rezeptor induziert eine Konformationsänderung, die über den Transmembranbereich an die Oberfläche des Rezeptors auf der anderen Seite der Membran weitergeleitet wird. Diese Veränderung ermöglicht die Bindung und Aktivierung des entsprechenden G-Proteins. G-Proteine wiederum sind Heterotrimerer, deren  $\alpha$ -Untereinheit in der inaktiven Form ein Molekül GDP bindet. Die Bindung an den aktivierten Rezeptor führt zum Austausch des GDP gegen GTP. Dadurch wird die Affinität zwischen Rezeptor und G-Protein wieder herabgesetzt. Das G-Protein löst sich vom Rezeptor und die  $G_{\alpha}$ -GTP-Untereinheit dissoziiert vom  $G_{\beta\gamma}$ -Komplex.  $G_{\alpha}$ -GTP stellt die aktive Komponente des G-Proteins dar und stimuliert oder inhibiert die Aktivität eines zellulären Effektorproteins. Hierbei handelt es sich entweder um Enzyme wie z.B. Adenylcyclase, Guanylylcyclase, cAMP-Phosphodiesterase, cGMP-Phosphodiesterase und Phospholipasen oder um selektive Ionenkanäle. Die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren führt somit zu Konzentrationsänderungen intrazellulärer sekundärer Signalmoleküle wie cAMP, cGMP, Inositoltrisphosphat,  $Ca^{2+}$ -,  $Na^{+}$ - oder  $K^{+}$  Ionen.

Die  $G_{\alpha}$ -Untereinheit verfügt über eine intrinsische GTPase-Aktivität und hydrolysiert schließlich das gebundene GTP. Der resultierende  $G_{\alpha}$ -GDP-Komplex dissoziiert von dem Effektorprotein ab und verbindet sich wieder mit  $G_{\beta\gamma}$  zum inaktiven G-Protein. Die Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors durch spezifische Rezeptorkinasen führt ebenfalls zur Deaktivierung bzw. Densensibilisierung der Signalübertragung, wobei die Modifikation des Rezeptors die Affinität zwischen Rezeptor und G-Protein herabsetzt (Conklin und Bourne, 1993; Strader et al., 1994; Wess et al., 1995; van Rhee und Jacobson, 1996).

Auf Grund ihrer ubiquitären Verbreitung steht die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion im Zentrum der medizinischen und pharmakologischen Forschung. Mittlerweile sind mehr als 500 verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren identifiziert worden; von einigen Rezeptoren existieren sogar zahlreiche gewebespezifische Subtypen (Strader et al., 1994). Das Spektrum der Signalmoleküle umfaßt relativ kleine Substanzen wie die biogenen Amine, kurzkettige Peptide wie Bradykinin bis hin zu größeren Polypeptiden wie das adrenocorticotrope Hormon ACTH. In Säugetieren kodieren mindestens 16 Gene Polypeptide für  $G_{\alpha}$ -, 4 Gene Polypeptide für  $G_{\beta}$ - und 7 Gene Polypeptide für  $G_{\gamma}$ -Untereinheiten. Die daraus resultierende Anzahl unterschiedlicher heterotrimerer G-Proteine eröffnet vielfältige Möglichkeiten zur Feinsteuerung der Signalübertragung (Birnbaumer, 1992; Conklin und Bourne,

1993). Trotz der Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren bzw. G-Proteine erfolgt die Signaltransduktion stets nach dem gleichen Prinzip. Daher müssen grundlegende strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zwischen den Mitgliedern der Rezeptorfamilie bzw. den verschiedenen G-Proteinen existieren. Das Verständnis der Signalübertragung auf molekularer Ebene erfordert daher die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- Worin bestehen die strukturellen bzw. funktionellen Gemeinsamkeiten der G-Protein gekoppelten Rezeptoren bzw. der G-Proteine?
- Was sind die molekularen Grundlagen für die Spezifität der Signalerkennung durch den jeweiligen Rezeptor?
- Welche molekularen Veränderungen charakterisieren die aktive Form des Rezeptors?
- Was sind die molekularen Grundlagen der spezifischen Bindung und Aktivierung des G-Proteins?
- Welche molekularen Modifikationen führen wiederum zur Inaktivierung des Systems?

Die Struktur von G-Proteinen konnte kürzlich mit atomarer Auflösung bestimmt werden (Noel et al., 1993; Lambright et al., 1996; Sondek et al., 1996). Auf Grund der großen Schwierigkeiten bei der Kristallisation integraler Membranproteine liegen dagegen bis heute keine Strukturdaten über G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit atomarer Auflösung vor, die einen detaillierten Einblick in den molekularen Aufbau bzw. den Mechanismus der Rezeptoraktivierung geben könnten. Wertvolle Beiträge zum Verständnis der G-Protein gekoppelten Rezeptoren stammen aus Untersuchungen des Photorezeptors Rhodopsin, das auf Grund seiner hohen Anreicherung in den Photorezeptorzellen der Netzhaut leicht in großen Mengen isoliert werden kann.

## **1.2 Der primäre Sehprozeß – ein Modellsystem für die G-Protein gekoppelte Signaltransduktion**

Der Sehsinn erlaubt die Aufnahme und Verarbeitung von Lichtinformationen. Im Auge von Vertebraten bildet der optische Apparat bestehend aus Hornhaut, Kammerwasser, Linse und Glaskörper Objekte der Umwelt auf der Netzhaut ab. Die Netzhaut liegt auf einem Pigmentepithel auf und ist aus drei Zellschichten aufgebaut. Die innere Schicht wird von hoch spezialisierten Photorezeptorzellen gebildet. Sie wandeln das einfallende Licht in Nervenimpulse um, die über die bipolaren Nervenzellen der zweiten Schicht an die großen Neuronen der dritten Schicht weitergeleitet werden. Die Axone dieser Neuronen bilden den Sehnerv, der die Lichtinformation schließlich ins Gehirn führt. Erstaunlich an dieser Anordnung ist, daß das Licht zunächst die äußeren beiden Schichten der Nervenzellen durchqueren muß, bevor es auf die Rezeptorzellen trifft. In Vertebraten kommen zwei Arten von Photorezeptorzellen vor, die wegen ihrer Form als Stäbchen bzw. Zapfen bezeichnet werden. Die Stäbchen sind relativ lang und dünn. Sie sprechen bereits auf schwaches Licht an und dienen dem Hell-Dunkel-Sehen. Die Zapfen sind deutlich kürzer und kegelförmig. Sie sind weniger lichtempfindlich und auf das Farbsehen spezialisiert (Hubel, 1990).

Der Aufbau der Photorezeptorzellen ist in Abbildung 1.1 schematisch am Beispiel einer Stäbchenzelle dargestellt. Die Komponenten des Zellstoffwechsels und der Proteinbiosynthese sind im inneren Segment lokalisiert. Der Synapsenkörper dient zur Übertragung der elektrischen Impulse an die nachgeschalteten Nervenzellen. Das besondere Merkmal der Zellen ist ihr Außensegment. Hier finden die Absorption des Lichts und die primäre visuelle Signaltransduktion statt. Das Außensegment einer Stäbchenzelle ist nahezu vollständig von einem dichten Stapel scheibenförmiger Membranvesikel ausgefüllt, die als Diskmembranen (engl.: disk membranes) bezeichnet werden. Die Diskmembranen enthalten das Sehpigment Rhodopsin, die primäre lichtempfindliche Komponente des Sehprozesses.

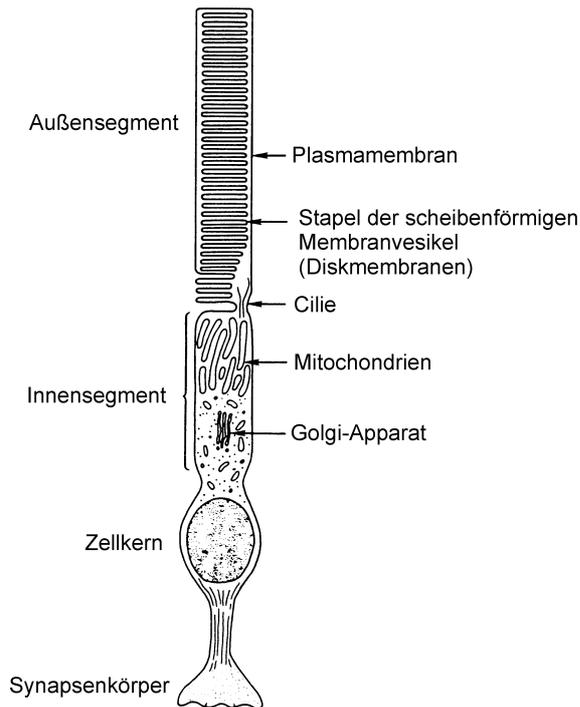


Abbildung 1.1: schematische Darstellung einer Stäbchenzelle modifiziert nach Hargrave und McDowell (1992). Das Außensegment enthält Stapel von Membranvesikeln, die sogenannten Diskmembranen. Das Außensegment ist über die Cilie mit dem Innensegment verbunden, das die Komponenten des Zellstoffwechsels wie z.B. Mitochondrien und den Golgi-Apparat beinhaltet. Durch die Ausschüttung von Neurotransmittern im Synapsenkörper wird die Lichtinformation an die nachgeschalteten Nervenzellen weitergeleitet.

Die Signaltransduktion erfolgt in Stäbchen und Zapfen nach dem gleichen Mechanismus (Stryer, 1988; Yau, 1994). Im Dunkeln sind die Photorezeptorzellen durch geöffnete cGMP-abhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle der Plasmamembran stark depolarisiert. Nach Absorption von Licht aktiviert Rhodopsin das visuelle G-Protein Transducin ( $G_T$ ). Der Austausch von GDP gegen GTP führt zur Dissoziation des Transducins und die  $G_{T\alpha}$ -GTP-Untereinheit stimuliert die cGMP-Phosphodiesterase. Der Abfall der cytoplasmatischen cGMP-Konzentration verursacht die Dissoziation von cGMP von den  $\text{Na}^+$ -Kanälen der Plasmamembran, die sich daraufhin schließen. Die resultierende Hyperpolarisation der Zelle führt zu einem verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom im Synapsenkörper, gefolgt von einer verminderten Freisetzung von Neurotransmittern. Die Übertragung der Lichtinformation an die nachgeschalteten Neuronen basiert somit auf der lichtinduzierten Aufhebung einer postsynaptischen Hemmung durch die Photorezeptorzellen.

Die Termination der Signalkaskade beruht neben der autokatalytischen Deaktivierung des Transducins durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $G_{T\alpha}$ -Untereinheit auf einer gezielten Deaktivierung des lichtaktivierten Rhodopsins ( $R^*$ ).  $R^*$  wird zunächst von der Rhodopsinkinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung senkt die Affinität von  $R^*$  zu Transducin und ermöglicht zusätzlich die Bindung von Arrestin, wodurch eine weitere Wechselwirkung mit Transducin blockiert wird. Die Deaktivierung von  $R^*$  und Transducin beendet die Stimulation der cGMP-Phosphodiesterase und stoppt den Abbau von cGMP. Auf Grund der cGMP-Synthese steigt die cGMP-Konzentration wieder an, worauf die Zelle durch das Öffnen der  $\text{Na}^+$ -Kanäle allmählich wieder in den depolarisierten Ausgangszustand zurückkehrt.

Durch die Summe der an der visuellen Signaltransduktion beteiligten Komponenten entsteht somit ein komplexes Reaktionsschema, dessen primäre Schritte in Abbildung 1.2 zusammengefaßt sind. Entscheidend für die Modulation der Lichtsignale im Synapsenkörper ist letztlich die cGMP-abhängige Polarisation der Plasmamembran und deren Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. An der Steuerung dieser physiologischen Regelgrößen sind vermutlich noch andere Prozesse beteiligt. Daher führt die Dauerbeleuchtung der Photorezeptorzellen nicht zu einem Sättigungszustand mit einer cGMP-Konzentration nahe Null, sondern zu einer Adaptation der Zellen an große Lichtmengen.

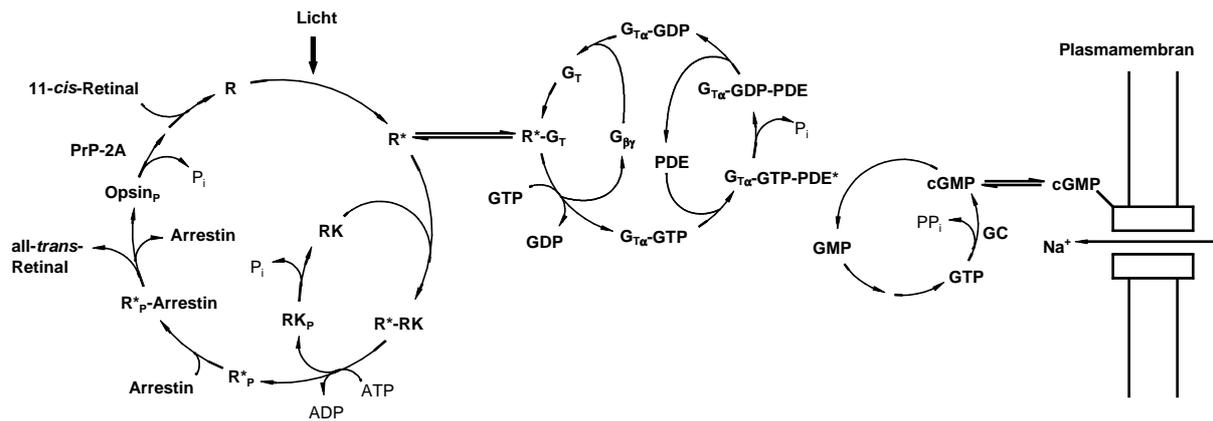


Abbildung 1.2: Reaktionsschema der primären Schritte der visuellen Signalkaskade im Außensegment der Stäbchenzelle. Abkürzungen:  $G_T$ : Transducin,  $G_{T\alpha}$ :  $\alpha$ -Untereinheit von Transducin,  $G_{T\beta\gamma}$ : Komplex der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit von Transducin, R: Rhodopsin,  $R^*$ : lichtaktivierter Zustand von Rhodopsin, RK: Rhodopsinkinase, PrP-2A: Proteinphosphatase 2A, PDE: cGMP-Phosphodiesterase, GC: Guanylylcyclase,  $P_i$ : Orthophosphat,  $PP_i$ : Pyrophosphat. Die einzelnen Vorgänge werden im Text näher erläutert.

### 1.3 Aufbau und Funktion der Photorezeptoren

Rhodopsin ist der Photorezeptor der vertebralen Stäbchenzelle. Das Protein (38 kDa) setzt sich aus dem Apoprotein Opsin und dem lichtempfindlichen Chromophor 11-*cis*-Retinal zusammen, der über eine protonierte Schiff-Base kovalent an eine Lysinseitenkette gebunden ist (Abbildung 1.3). Der Chromophor verleiht Rhodopsin ein breite Absorptionsbande mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 498$  nm. In Analogie zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren fungiert das 11-*cis*-Retinal in Rhodopsin als Antagonist und stabilisiert den inaktiven Grundzustand des Rezeptors. Die Absorption von Licht verursacht die Isomerisierung von 11-*cis* zu all-*trans*-Retinal. Der Chromophor wirkt jetzt als Agonist und leitet die Aktivierung des Rezeptors ein (Nathans, 1992; Hargrave und McDowell, 1992; Khorana, 1992; Sakmar, 1998).

Die Leistungsfähigkeit der Lichtdetektion ist bemerkenswert hoch: Das dunkel-adaptierte menschliche Auge registriert bereits Lichtmengen, die lediglich 5-7 Photoisomerisierungen hervorrufen. Grundlage hierfür ist die extrem niedrige Rate der Dunkelaktivierung durch thermische Isomerisierung des Retinals, die statistisch lediglich ca. einmal in 400 Jahren auftritt. Auf der anderen Seite kann sich das visuelle System an einen Bereich unterschiedlicher Lichtintensitäten anpassen, der sich über 6 Dekaden erstreckt (Sakmar, 1998).

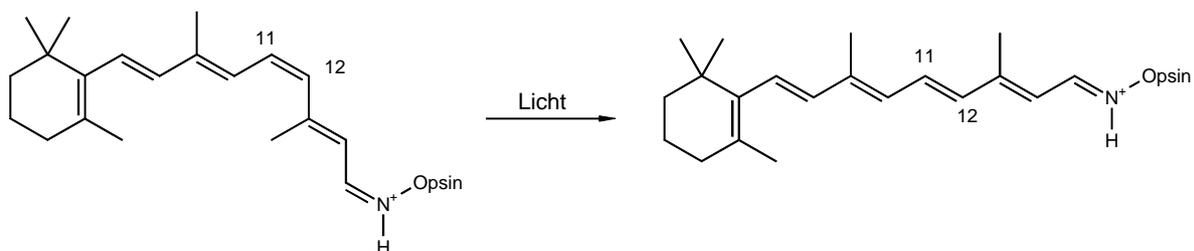


Abbildung 1.3: Photokonversion von 11-*cis*-Retinal (links) zu all-*trans*-Retinal (rechts).

Das Farbsehen der Zapfen basiert ebenfalls auf Opsinen, die kovalent gebundenes 11-*cis*-Retinal als Chromophor verwenden. Nach Merbs und Nathans (1992) liegen die Absorptionsmaxima der drei menschlichen Zapfenpigmente im Wellenlängenbereich von blauem, grünem und rotem Licht ( $\lambda_{\text{max}} = 426 \text{ nm}$ ,  $530 \text{ nm}$  und  $552$  bzw.  $557 \text{ nm}$  für zwei polymorphe Genvarianten). Beim Menschen sind die Aminosäuresequenzen der Zapfenpigmente zu 41 % identisch mit Rhodopsin. Das grüne und rote Opsin weisen mit 96 % Übereinstimmung eine nahezu identische Primärsequenz, sind aber lediglich zu 43 % identisch mit dem blauen Opsin (Sakmar, 1998). Alle bislang bekannten Sehpigmente arbeiten nach dem gleichen Prinzip und unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre spektralen Eigenschaften.

### 1.3.1 Die Photointermediate von Rhodopsin

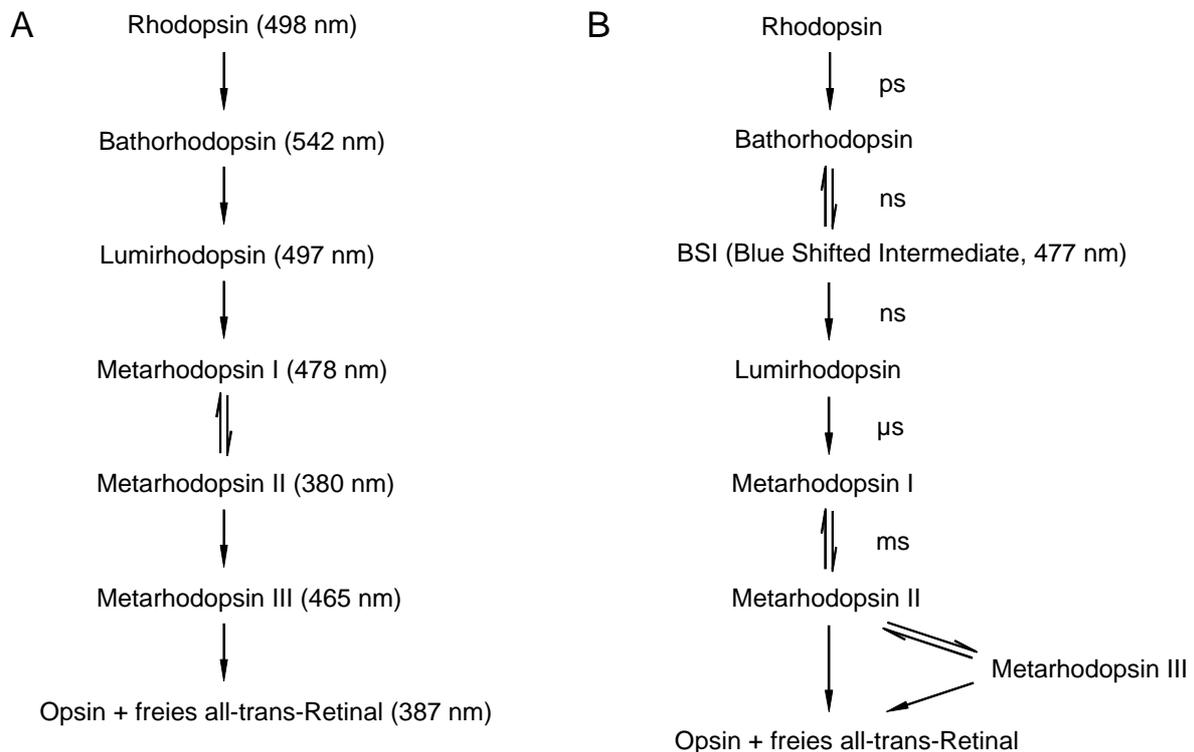


Abbildung 1.4: Reaktionsschema der Photolyse von Rhodopsin nach Kliger und Lewis (1995) ermittelt durch Einfangen der Intermediate bei niedrigen Temperaturen (A) bzw. durch zeitaufgelöste Spektroskopie (B). Die Isomerisierung von 11-*cis* zu all-*trans*-Retinal erfolgt während des Übergangs von Rhodopsin zu Bathorhodopsin. Die Angaben der Wellenlängen beziehen sich auf die Absorptionsmaxima der jeweiligen Intermediate, die Zeitangaben geben die Größenordnung des Zeitbereichs an, in dem die Intermediate nach Lichtabsorption entstehen. Der Zerfallsweg von Metarhodopsin II zu Opsin und freiem Retinal sowie die Bedeutung von Metarhodopsin III sind nicht eindeutig geklärt.

Als Folge der Lichtabsorption durchläuft Rhodopsin eine Serie von spektroskopisch unterscheidbaren Zuständen (Abbildung 1.4). Bei niedrigen Temperaturen konnten einige dieser Photointermediate eingefangen und spektroskopisch charakterisiert werden. Kurzzeitspektroskopische Techniken ermöglichten dagegen die Untersuchung der Photolyse unter physiologischeren Bedingungen und führten mit BSI ("blue shifted intermediate") zur Entdeckung eines weiteren frühen Intermediats (Kliger und Lewis, 1995). Die Lichtanregung verursacht zunächst die Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals im ps-Zeitbereich. Das rotverschobene Bathorhodopsin zerfällt anschließend über BSI im ns-Zeitbereich zu Lumirhodopsin. Bis

zu dieser Stufe sind die Übergänge durch lokale Änderungen am Chromophor oder dessen direkter Umgebung gekennzeichnet.

Rhodopsin erreicht ca. 1 ms nach Belichtung ein Gleichgewicht zwischen Metarhodopsin I (MI,  $\lambda_{\max} = 478$  nm) und Metarhodopsin II (MII,  $\lambda_{\max} = 380$  nm). Im Übergang von MI nach MII wird die Schiff-Base deprotoniert, was die starke Blauverschiebung von über 100 nm gegenüber dem Grundzustand erklärt. MII zerfällt schließlich über Metarhodopsin III (MIII,  $\lambda_{\max} = 465$  nm) oder direkt zu Opsin und freiem all-trans-Retinal ( $\lambda_{\max} = 387$  nm). Bislang konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob MIII tatsächlich ein eigenständiges Photointermediat oder lediglich ein Produkt der Anlagerung des freigesetzten Retinals an die Oberfläche des Opsins darstellt (Kliger und Lewis, 1995). Der MII-Zustand ist die lichtaktivierte Form  $R^*$  des Rhodopsins und aktiviert das G-Protein Transducin (Hofmann et al., 1995; Kliger und Lewis, 1995; Sakmar, 1998). Daher stellt der MI/MII-Übergang ein zentrales Element im Mechanismus der Rezeptoraktivierung dar. Zahlreiche Beobachtungen deuten jedoch darauf hin, daß die MII-Bildung in mehreren Schritten verläuft und mindestens zwei MII-Subzustände existieren, die spektroskopisch nicht zu unterscheiden sind. In der Literatur findet man unterschiedliche Bezeichnungen für diese isospektralen Zustände wie  $MII^{\text{slow}}/MII^{\text{fast}}$  (Straume et al., 1990),  $MII_a/MII_b$  (Arnis und Hofmann, 1993) oder  $MI_{380}/MII$  (Thorgeirsson et al., 1993).

Das Auftreten der isospektralen MII-Zustände kann mit unterschiedlichen Protonierungszuständen des Rhodopsins erklärt werden. Trotz Deprotonierung der Schiff-Base im Übergang zu MII wird das MI/MII-Gleichgewicht mit abnehmendem pH-Wert auf die Seite von MII verschoben. Diese Beobachtung legt bereits die Vermutung nahe, daß die MII-Bildung neben der Deprotonierung der Schiff-Base von einer zusätzlichen Protonenaufnahme an einer anderen Gruppe begleitet ist. Arnis und Hofmann (1993) konnten durch Vergleich der Photolyse von Rhodopsin in n-Dodecylmaltosid-Mizellen mit lichtabhängigen pH-Messungen in der wäßrigen Bulk-Phase diese Protonenaufnahme direkt nachweisen. Die Analyse der MII-Bildung in der nativen Membrenumgebung mit zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie bei einzelnen Wellenlängen (Straume et al., 1990) bzw. mit optischen Mehrkanaltechniken (Thorgeirsson et al., 1993) führte bislang allerdings noch zu keinem einheitlichen Reaktionsschema zwischen Lumirhodopsin, MI und den verschiedenen MII-Zuständen.

### 1.3.2 Lipidzusammensetzung der ROS-Membran

Membranpräparationen des Außensegments von Stäbchenzellen werden allgemein als ROS-Membranen (engl.: rod outer segment membranes) bezeichnet. Die Diskmembranen bilden mit ca. 95 % den Hauptbestandteil der ROS-Membranen. Auf die Plasmamembran entfallen lediglich ca. 5 %. Der Lipid- bzw. Proteinanteil der ROS-Membranen beträgt jeweils ca. 50 % des Trockengewichts. Rhodopsin stellt mit ca. 80-90 % die Hauptproteinkomponente des Außensegments dar (Kamps et al., 1982). Phospholipide bilden mit ca. 80 % (w/w) bezogen auf den Gesamtlipidgehalt die Hauptkomponente des Lipidanteils. Der übrige Anteil setzt sich aus Glycolipiden (10 % w/w), Cholesterin (4-6 % w/w) und weiteren neutralen Lipiden zusammen (Fliesler und Anderson, 1982; Daemen, 1973; Dreyfus et al., 1982). Das molare Verhältnisse zwischen Phospholipiden und Rhodopsin in der ROS-Membran beträgt ca. 62 % (Kamps et al., 1982). Die Lipidzusammensetzung variiert allerdings stark in Abhängigkeit von der Ernährungssituation, der durchschnittlichen Lichtintensität und dem Gesundheitszustand (Lamba et al., 1994). Ein wesentliches Merkmal der ROS-Membran ist der große Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die mit ca. 50 % (mol/mol) den Hauptbestandteil aller vorkommenden Fettsäuren bilden. Tierversuche ergaben, daß dieser Anteil unter Entzug der essentiellen Vorläufer der Arachidonsäure (20:4) bzw. der all-*cis*- $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ -Docosahexaensäure (22:6) im Außensegment nahezu unverändert bleibt, während der Anteil ungesättig-

tiger Fettsäuren in anderen Geweben drastisch sinkt (Daemen, 1973; Fliesler und Anderson, 1982). Die Gegenwart der ungesättigten Fettsäuren ist allerdings für die Funktion des Rhodopsins nicht unbedingt erforderlich, die Zusammensetzung der Lipidumgebung beeinflusst allerdings die Lage des MI/MII-Gleichgewichts (Mitchell et al., 1991; Brown, 1994).

### 1.3.3 Die Struktur von Rhodopsin

Rhodopsin aus Stäbchenzellen des Rinderauges war der erste G-Protein gekoppelte Rezeptor, dessen Aminosäuresequenz auf Protein- und DNA-Ebene bestimmt werden konnte (Ovchinnikov et al., 1983; Hargrave et al., 1983; Nathans und Hogness, 1983). Die Analyse der Primärsequenz (348 Aminosäuren) sowie zahlreiche spektroskopische und biochemische Untersuchungen führten zu einem Sekundärstrukturmodell, das allgemein als die gemeinsame strukturelle Basis der G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Rhodopsinfamilie angesehen wird (Nathans, 1992; Hargrave und McDowell, 1992; Khorana, 1992; Strader et al., 1994, Wess et al., 1995).

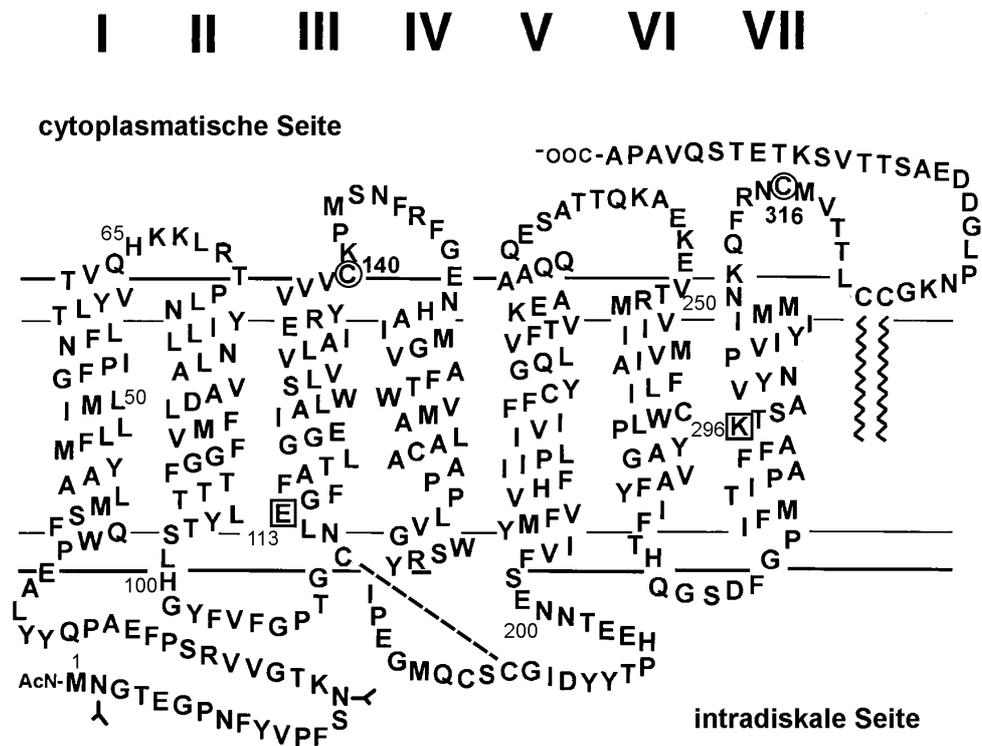


Abbildung 1.5: Sekundärstrukturmodell von Rhodopsin modifiziert nach Yang et al. (1996a). Die Polypeptidkette des Proteins ist mit sieben  $\alpha$ -Helices in der Diskmembran verankert, die über Loopbereiche unterschiedlicher Länge verbunden sind. Die waagerechten Linien repräsentieren den Verlauf der Membran-Wasser Grenzfläche. Der acetylierte N-Terminus ist auf der intradiskalen Seite der Membran lokalisiert. In der N-terminalen Region befinden sich zwei Oligosaccharidseitenketten an N2 bzw. N15 und eine für die Stabilität des Rezeptors essentielle Disulfidbrücke zwischen C110 und C187 (gestrichelte Linie). Die Palmitoylierung der C-terminalen Cysteine C322 und C323 führt zur Ausbildung einer vierten cytoplasmatischen Loopstruktur. Der Retinalchromophor ist über eine protonierte Schiff-Base an K296 in Helix 7 gebunden; als Gegenion im Grundzustand fungiert E113 in Helix 3. Die für die hier vorliegende Arbeit besonders wichtigen cytoplasmatischen Cysteinreste C140 und C316 sind durch Kreise hervor gehoben.

Rhodopsin ist mit sieben  $\alpha$ -helikalen Segmenten in der Membran verankert, die über Loopbereiche unterschiedlicher Länge verbunden sind (Abbildung 1.5). Der N-Terminus befindet sich auf der intradiskalen, der C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Die Palmitoylreste der C-terminalen Cysteine 322 und 323 sind vermutlich ebenfalls in der Membran verankert und führen zur Ausbildung einer weiteren cytoplasmatischen Loopstruktur zwischen Helix 7 und den Palmitoylierungsstellen (Ovchinnikov et al., 1988). Das Retinal ist mit K296 in Helix 7 verknüpft. In der N-terminalen Region befinden sich zwei N-glycosidische Oligosaccharidseitenketten an Asparagin 2 bzw. 15 (Fukada et al., 1979). Eine große Bedeutung für die Stabilität des Rezeptors nimmt die Disulfidbrücke zwischen C110 und C187 auf der intradiskalen Seite der Membran ein (Karnik et al., 1988; Karnik und Khorana, 1990). Zahlreiche Serin- und Threoninreste der C-terminalen Region des Rhodopsins werden nach Aktivierung des Rezeptors reversibel phosphoryliert (Wilden und Kühn, 1982). Die Tatsache, daß die hier erwähnten strukturell bzw. funktionell bedeutenden Aminosäuren neben anderen in allen Photorezeptoren und darüber hinaus auch in den meisten G-Protein gekoppelten Rezeptoren hoch konserviert sind, ist ein weiterer Beleg für die Gemeinsamkeiten innerhalb der Rezeptorfamilie (Nathans, 1992; Khorana, 1992; Strader et al. 1994).

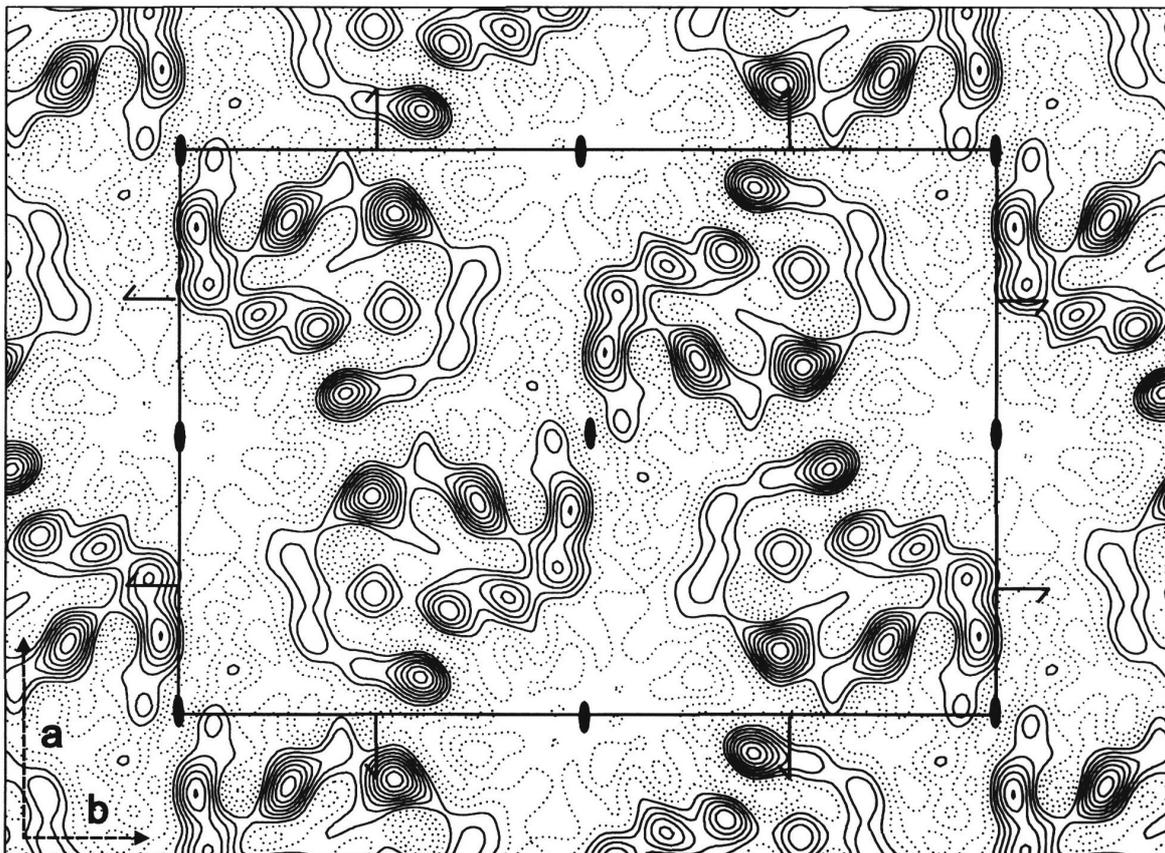


Abbildung 1.6: Elektronendichteverteilung von 2D-Kristallen des Rinderrhodopsins mit einer Auflösung von 5 Å. Das eingezeichnete Rechteck kennzeichnet die Grenzen der Einheitszelle (Gitterparameter:  $a = 60,6 \text{ \AA}$ ,  $b = 86,3 \text{ \AA}$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ). Ebenfalls dargestellt sind Symmetrieelemente des  $p22_1$ -Gitters, die zweifache Rotationsachse und die beiden zweifachen Schraubenachsen entlang der  $a$  und  $b$ . In der Einheitszelle befinden sich vier Rhodopsinmoleküle. Die gepunkteten Linien entsprechen den negativen Höhenlinien des Konturplots. Die Abbildung wurde aus Krebs et al. (1998) entnommen.

Schertler et al. (1993) konnten mit Hilfe von kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen an zweidimensionalen Kristallen (2D-Kristallen) von Rinderrhodopsin erstmals die zweidimensionale Struktur der Transmembranregion des Photorezeptors bei einer Auflösung von 9 Å bestimmen. Aufnahmen gekippter 2D-Kristalle ermöglichten die Berechnung eines dreidimensionalen Strukturmodells mit einer Auflösung von 9,5 Å in der Membranebene und 47 Å senkrecht zur Membran (Unger und Schertler, 1995). Ähnliche Verfahren ermöglichten die Strukturbestimmung von Rhodopsin aus Froschaugen (Schertler und Hargrave, 1995; Unger et al., 1997) bzw. Tintenfischaugen (Davies et al., 1996) bei ebenfalls niedriger Auflösung. Nach Optimierung des Kristallisationsverfahrens konnte kürzlich die zweidimensionale Struktur von Rinderrhodopsin mit einer Auflösung von 5 Å berechnet werden (Krebs et al., 1998). Diese Daten bestätigen die Position von drei nahezu senkrecht zur Membran stehenden  $\alpha$ -Helices (Helix 4, 6 und 7). Die übrigen Helices sind stark geneigt und erscheinen in der 2D-Projektion der Elektronendichte als ein bogenförmiges Motiv (Abbildung 1.6). Auf der Basis der vorliegenden Strukturdaten von Rhodopsin konnte in Kombination mit vergleichenden Analysen der Aminosäuresequenz mehrerer hundert G-Protein gekoppelter Rezeptoren ein allgemeines Modell der Transmembranregion der Rezeptorfamilie abgeleitet werden (Baldwin, 1993; Baldwin et al., 1997). Zusätzlich geben dreidimensionale Computermodelle wertvolle Hinweise auf mögliche Struktur-Funktionsbeziehungen (Pogozheva et al., 1997; Herzyk und Hubbard, 1998). Kürzlich wurde in der Literatur erstmals ein Verfahren zur Herstellung von dreidimensionalen Rhodopsinkristallen beschrieben (Okada et al., 2000). Die Autoren konnten mit Hilfe dieser Kristalle Röntgendiffraktionsdaten mit einer Auflösung von bis zu 3,5 Å aufnehmen, aber noch keine Phasenbestimmung durchführen, die zur Berechnung der Struktur erforderlich ist.

Bis heute sind daher keine direkten Strukturdaten über die Umgebung des Retinals und die Loopbereiche außerhalb der Membran verfügbar. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Struktur der cytoplasmatischen Oberfläche, an der die Bindung und Aktivierung des Transducins erfolgt. Die gegenwärtigen Kenntnisse über die Aktivierung von Rhodopsin und die Wechselwirkungen mit Transducin und anderen Proteinen der visuellen Signalkaskade basieren somit bislang auf indirekten biochemischen, biophysikalischen und molekularbiologischen Methoden.

### 1.3.4 Die Lichtaktivierung von Rhodopsin

Zahlreiche Experimente belegen, daß der Retinalchromophor innerhalb der Transmembrandomäne des Rhodopsins eingebettet ist und seine Lage sowie die spektralen Eigenschaften durch spezifische Wechselwirkungen mit den umgebenden Aminosäureseitenketten bestimmt werden. Im Grundzustand fungiert die deprotonierte Seitenkette von E113 in Helix 3 als Gegenion zur protonierten Schiff-Base zwischen K296 und 11-*cis*-Retinal (Sakmar et al., 1989; Fahmy et al., 1993). Mit Fourier-transformierter Infrarotspektroskopie (FTIR) konnte zudem gezeigt werden, daß E113 im Zuge der lichtinduzierten MII-Bildung protoniert wird und als Protonenakzeptor der Schiff-Base dient (Jäger et al., 1994). Die Salzbrücke zwischen E113 und der Schiff-Base trägt somit entscheidend zur Stabilität des Grundzustands bei, was sich in der Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes der Schiff-Base auf ca. 16 gegenüber einem Wert von ca. 7 in wäßriger Lösung ausdrückt. Ferner ist die Schiff-Base im Grundzustand für Hydroxylamin nicht zugänglich, wohl aber nach Ersatz von E113 durch neutrale Aminosäuren oder im MII-Zustand (Sakmar et al., 1989). Bemerkenswert ist allerdings, daß die kovalente Verknüpfung des Chromophors mit K296 nicht essentiell für die Funktion des Rezeptors ist. Die Opsinmutante K296G bildet mit der künstlichen Schiff-Base aus *n*-Butylamin und 11-*cis*-Retinal ein funktionsfähiges Pigment, welches lichtabhängig Transducin aktivieren kann (Zhukovsky et al., 1991). Dies ist ein wichtiger Beleg für die Analogie

zwischen den Photorezeptoren mit kovalent gebundenem Retinal und den übrigen liganden-abhängigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

Die vorliegenden Modellstrukturen postulieren eine Orientierung des  $\beta$ -Iononrings in Richtung der konservierten aromatischen Aminosäuren W126 in Helix 3 und F261, W265 bzw. T268 in Helix 6 (Baldwin et al., 1997; Pogozheva et al., 1997; Herzyk und Hubbard, 1998). Untersuchungen der Photolyse von Rhodopsin mittels UV-Differenzspektroskopie weisen auf eine Verschiebung von W126 und W265 in eine polarere Umgebung während der Rezeptoraktivierung hin (Lin und Sakmar, 1996). NMR-Experimente deuten auf sterische Wechselwirkungen zwischen der 9-Methylgruppe der Polyenkette des Retinals mit G121 in der Mitte der Helix 3 (Han und Smith, 1995). Der Austausch von G121 gegen voluminösere Aminosäuren (A, S, T, V, V, I bzw. W) führt mit zunehmender Größe zu einer zunehmenden Blauverschiebung des Absorptionsmaximums, einer erhöhten Affinität zu all-*trans*-Retinal und einer verminderten Stabilität der rekombinanten Rhodopsine (Han et al., 1996a). Interessanterweise kann eine zusätzliche Mutation von F261 in Helix 6 diese Effekte teilweise kompensieren: Die Doppelmutante G121L/F261A weist Eigenschaften zwischen Wildtyp Rhodopsin und der Mutante G121L auf (Han et al., 1996b).

Sheikh et al. (1996) konnten durch Einführung von Bindestellen für Metallionen in Helix 3 und 6 die Notwendigkeit einer Bewegung der beiden Helices für die Rhodopsinaktivierung nachweisen. Nach Einführung von Histidinresten in den Positionen 138 und 251 bzw. 141 und 251 wird die Aktivierung von Transducin in Gegenwart, nicht aber in Abwesenheit von  $Zn^{2+}$ -Ionen blockiert. ESR-Untersuchungen an rekombinanten Cysteinmutanten zeigten ein übereinstimmendes Ergebnis. Die Einführung von Cysteinresten an den cytoplasmatischen Enden der Helices 3 (V139C) bzw. 6 (E247C bis R252C) und deren Derivatisierung mit seitenkettenspezifischen Spin-reaktiven Markern führt zu Veränderungen der ESR-Signale in Folge der Rhodopsinaktivierung, die eine relative Bewegung der Helices untermauern. Eine künstliche Disulfidbrücke zwischen Helix 3 und 6 verhindert diese Bewegung und damit auch die Transducinaktivierung (Farrens et al., 1996).

Diese und zahlreiche weitere Beispiele bestätigen enge sterische Wechselwirkungen zwischen dem 11-*cis*-Retinal und den Aminosäureseitenketten der Chromophorbindungstasche sowie die Kopplung der Retinalisomerisierung an strukturelle Veränderungen in der Transmembranregion. Die Bindung und Aktivierung des G-Proteins erfolgt aber an der cytoplasmatischen Oberfläche. Die lichtinduzierten Änderungen der Transmembranregion müssen demnach im aktiven MII-Zustand spezifische Veränderungen an der Oberfläche des Rezeptors hervorrufen. Ein mögliches Bindeglied zwischen der Transmembranregion und der cytoplasmatischen Oberfläche stellen dabei die Bewegungen der Transmembranelices dar. Das Auftreten derartiger Konformationsänderungen ist möglicherweise das Schlüsselement im Aktivierungsmechanismus der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die hoch konservierten Elemente in der Aminosäuresequenz der unterschiedlichen Rezeptoren können daher entweder gemeinsame Merkmale des Grundzustands oder der aktiven Rezeptorform darstellen (Baldwin et al., 1997).

Dennoch ist die Natur des „molekularen Schalters“ zwischen der aktiven und inaktiven Form des Rezeptors bis heute noch nicht vollständig verstanden. Opsinmutanten wie z.B. E113Q zeigen auch in Abwesenheit des Retinalchromophors eine konstitutive Aktivierung von Transducin und werden mit krankhaften Veränderungen des Sehprozesses wie der congenitalen Nachtblindheit in Verbindung gebracht (Rao und Oprian, 1996). Die Regeneration von E113Q und anderer konstitutiver Opsine mit 11-*cis*-Retinal führt dabei häufig zur Ausbildung einer stabilen inaktiven Rezeptorform und hebt die konstitutive Aktivierung wieder auf. Andererseits wurden Rezeptormutanten gefunden, die nach Photolyse keinen für die aktive Form charakteristischen MII-Zustand bilden, aber dennoch Transducin aktivieren. Die Belichtung der Doppelmutante E113Q/A117E, bei der das Gegenion der Schiff-Base um eine Helixwindung verschoben ist, führt beispielsweise zur Bildung eines MI-ähnlichen

Photointermediats ( $\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$ ), das trotz protonierter Schiff-Base Transducin aktiviert (Fahmy et al., 1994). Dies deutet darauf hin, daß die cytoplasmatische Oberfläche der aktiven Rezeptorform durchaus kompatibel mit verschiedenartigen Zuständen in der Retinalumgebung der Transmembranregion ist (Sakmar, 1998).

### 1.3.5 Struktur und lichtinduzierte Veränderungen der cytoplasmatischen Oberfläche

Die Struktur der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins ist nicht bekannt. Die Strukturdaten aus der Elektronenmikroskopie und die darauf basierenden Modellstrukturen vermitteln lediglich ein Bild von der Übergangsregion zwischen der Transmembrandomäne und den Loopbereichen außerhalb der Membran. Mit Hilfe von Kompetitionsstudien unter Verwendung synthetischer Peptide mit der Aminosäuresequenz von Ausschnitten der Rhodopsinoberfläche konnte gezeigt werden, daß die Loopbereiche zwischen den Helices 3 und 4, den Helices 5 und 6 sowie der Abschnitt zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen an der Wechselwirkung mit Transducin beteiligt sind (König et al., 1989; Franke et al., 1992). Selbst der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb dieser Loopbereiche kann die Transducinaktivierung beeinträchtigen oder gar völlig blockieren (zur Übersicht siehe Hofmann et al., 1995; Sakmar, 1998).

Eine besondere Bedeutung nimmt hierbei das Ladungspaar E134/R135 am Ende der Helix 3 ein, das in nahezu allen G-Protein gekoppelten Rezeptoren hoch konserviert ist. E134 wird im Verlauf der Rhodopsinaktivierung protoniert (Fahmy und Sakmar, 1993). Die Protonierung von E134 findet nach Photolyse von Rhodopsin in n-Dodecylmaltosid-Mizellen während des Übergangs von MII<sub>a</sub> nach MII<sub>b</sub> statt und ist vermutlich ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal der isospektralen MII-Zustände (Arnis und Hofmann, 1993; Arnis et al., 1994). Erst diese Protonierung nahe der cytoplasmatischen Oberfläche ermöglicht die Aktivierung von Transducin. Möglicherweise sind auch weitere geladene bzw. protonierbare Gruppen wie H65 oder H152 an den lichtinduzierten Veränderungen der Oberfläche beteiligt (Weitz und Nathans, 1993).

Umfangreiche Erkenntnisse über die Beschaffenheit der cytoplasmatischen Oberfläche konnten mit ESR-Untersuchungen an Cysteinmutanten gewonnen werden, deren Seitenketten mit sulfhydrylspezifischen Spin-reaktiven Markern (SDSL, engl.: site-directed spin labeling) modifiziert wurden. Die Unterschiede der ESR-Signale vor und nach Belichtung zeigen eine Verschiebung der Aminosäuren C140 und C316 während der MII-Bildung (Resek et al., 1993). Während die Bewegung von C140 am Ende der Helix 3 mit einer Bewegung der gesamten Helix erklärt werden könnte (Farrens et al. 1996), deutet die Bewegung der Position C316 zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen eher auf eine Bewegung des gesamten Loopsegments. Mit der gleichen Technik konnten Yang et al. (1996a) zeigen, daß nach gleichzeitiger Spinmarkierung von C316 und H65C am cytoplasmatischen Ende von Helix 1 die Marker ca.  $10 \text{ \AA}$  voneinander entfernt sind und sich dieser Abstand nach Lichtaktivierung um ca.  $5 \text{ \AA}$  vergrößert. Unter geeigneten experimentellen Bedingungen konnten die Autoren zudem eine Disulfidbrücke zwischen H65C und dem nativen Cysteinrest C316 nachweisen, was einem Abstand der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome von ca.  $7 \text{ \AA}$  nahelegt.

Mittlerweile wurden die gesamten cytoplasmatischen Bereiche von Rhodopsin systematisch auf der Basis von Cysteinmutanten untersucht. Hierzu wurden zunächst alle für die Faltung von Rhodopsin nicht essentiellen Cysteinreste entfernt und anschließend jede einzelne Position der Loopbereiche durch Cystein ersetzt. Die resultierenden rekombinanten Pigmente wurden an Hand der Absorptionsspektren, der MII-Bildung, der Transducinaktivierung und der Zugänglichkeit für sulfhydrylspezifische Reagenzien charakterisiert. Die SDSL-Methode ermöglichte zusätzlich systematische ESR-Messungen an der cytoplasmatischen Oberfläche (Bereich Helix 1→Helix 2, Position 55-75: Klein-Seetharaman et al., 1999; Altenbach et al., 1999a; Bereich Helix 3→Helix 4, Position 136-152: Ridge et al., 1995; Farahbakhsh et al.,

1995; Bereich Helix 5→Helix 6, Position 225-256: Yang et al., 1996b; Altenbach et al., 1996, Bereich Helix 7→C-terminale Palmitoylierungsstellen, Position 306-322: Cai et al., 1999; Altenbach et al., 1999b; restlicher C-terminaler Bereich ab den Palmitoylierungsstellen: Cai et al., 1997; Langen et al., 1999).

Diese umfangreichen experimentellen Daten bestätigen, daß die cytoplasmatische Oberfläche des Rhodopsins im Grundzustand mit Ausnahme der C-terminalen Region hinter den Palmitoylierungsstellen weitgehend strukturiert ist. Die Zugänglichkeit für sulfhydrylspezifische Reagenzien sowie die Kollisionsraten zwischen den Spinmarkern und hydrophilen bzw. hydrophoben paramagnetischen Substanzen geben Aufschluß über die Aminosäuren, die an der Grenze zwischen der Transmembranregion und der wäßrigen Umgebung liegen. Helix 3 beispielsweise durchstößt demzufolge diese Grenze ungefähr auf Höhe der Position V138, Helix 4 auf Höhe der Position H152 (Farahbakhsh et al., 1995) und Helix 7 auf Höhe der Position M309 (Altenbach et al., 1999b). Weiterhin ermöglicht die Periodizität dieser Parameter eine Aussage über den Verlauf der Polypeptidkette außerhalb der Membran. Diese Daten deuten z.B. auf eine  $\alpha$ -helikale Konformation der Sequenz 306-314 in Helix 7 (Altenbach et al., 1999b), wohingegen die Interpretation der elektronenmikroskopischen Daten lediglich eine Aussage über Helix 7 bis zur Höhe der Position K311 ermöglicht (Unger et al., 1997; Baldwin et al., 1997). Den ESR-Daten zur Folge ist Helix 7 demnach noch ca. eine Helixwindung länger und ragt etwas weiter aus der Membranregion heraus. Ferner zeigen die Daten signifikante Veränderungen im Zusammenhang mit der Photoaktivierung, die die Autoren als relative Bewegungen der Helices interpretieren. Relativ starken Veränderungen unterliegen Aminosäuren in der Nähe der Helices 3, 4, 6 und 7, während die Aminosäuren der Helices 1, 2 und 5 in der Regel nur geringe Änderungen zeigen.

NMR-Techniken wurden ebenfalls erfolgreich zur Untersuchung der cytoplasmatischen Oberfläche eingesetzt. Albert et al. (1997) konnten beispielsweise unter gleichzeitiger Verwendung von seitenkettenspezifischen Elektronenspinmarkern und  $^{31}\text{P}$  als Kernspinmarker den Abstand zwischen C140 und den C-terminalen Phosphorylierungsstellen an S338 bzw. S343 mit  $18 \pm 3 \text{ \AA}$  bestimmen. Peptide mit korrespondierenden Aminosäuresequenzen zu den cytoplasmatischen Loopbereichen wurden in wäßriger Lösung mit mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, daß die einzelnen Abschnitte bereits eine definierte Struktur einnehmen und die Strukturen der einzelnen Abschnitte zudem in die Modellstruktur der Transmembranregion eingepaßt werden konnten. Auf der Basis dieser Daten wurde kürzlich ein Modell der gesamten cytoplasmatischen Oberfläche vorgestellt (Yeagle et al., 1997). Ob dieses Modell allerdings tatsächlich die Struktur der Oberfläche realistisch widerspiegelt, kann nur durch eine Vielzahl experimentell ermittelter Abstandsbeziehungen in Rhodopsin bzw. durch die Aufklärung der gesamten Rezeptorstruktur geklärt werden.

### 1.3.6 Die Wechselwirkungen zwischen $\text{R}^*$ und Transducin

Wie bereits oben beschrieben sind die cytoplasmatischen Loopbereiche zwischen den Helices 3 und 4, den Helices 5 und 6 sowie der Abschnitt zwischen Helix 7 und den C-terminalen Palmitoylierungsstellen des Rhodopsins an der Wechselwirkung mit Transducin beteiligt (König et al., 1989; Franke et al., 1992). Mit Hilfe vergleichbarer Studien konnte gezeigt werden, daß die Aminosäureabschnitte 316-323 und 340-350 der  $\alpha$ -Untereinheit von Transducin ( $\text{G}_{\text{T}\alpha}$ ) eine besondere Bedeutung für die Interaktion mit dem lichtaktivierten Rhodopsin besitzen (Hamm et al., 1988). Die Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen ist jedoch äußerst komplex. Die Röntgenstrukturen der  $\text{G}_{\text{T}\alpha}$ -GDP bzw.  $\text{G}_{\text{T}\alpha}$ -GTP $\gamma$ S-Komplexe zeigen, daß in dem Protein nur eine Nucleotidbindestelle existiert, die von einem  $\alpha$ -helikalen Segment abgeschirmt wird, das in allen heterotrimeren G-Proteinen stark konserviert ist (Noel et al., 1993; Lambright et al., 1994). Diese Strukturdaten sowie zahlreiche Bindungsstudien

legen daher einen mehrstufigen Aktivierungsmechanismus nahe, der bei Hofmann et al. (1995) ausführlich diskutiert wird. Demnach erfolgt zunächst die Bindung des inaktiven Transducins ( $G_T \cdot \text{GDP}$ ) an die Oberfläche des aktivierten Rhodopsins ( $R^*$ ). Im zweiten Schritt wird das gebundene GDP freigesetzt. Daraus resultiert ein  $R^* \cdot G_T(\text{empty})$ -Komplex mit unbesetzter Nucleotidbindestelle. Im dritten Schritt erfolgt die Besetzung der leeren Bindestelle mit GTP, wodurch die Ablösung von  $R^*$  und die Dissoziation zu  $G_{T\alpha} \cdot \text{GTP}$  und  $G_{T\beta\gamma}$  eingeleitet wird.

Dieser Mechanismus wird von der Beobachtung gestützt, daß zahlreiche Rhodopsinmutanten zwar Transducin binden, nicht aber den Nucleotidaustausch vermitteln können. Besonders kritisch in Rhodopsin sind hierbei Mutationen des konservierten Ladungspaars E134/R135 am Ende der Helix 3 und die Reste T242 bzw. T243 im Loopbereich zwischen Helix 5 und 6, die zu einer signifikanten Absenkung der Transducinaktivierung führen (König et al., 1989; Franke et al., 1992). Punktmutationen, chemische Depalmitoylierung und andere Veränderungen in der C-terminalen Region des Rhodopsins dagegen verstärken die Aktivierung von Transducin (Hofmann et al., 1995). Rückschlüsse von der Beobachtung eines bestimmten Effekts auf die Rolle der entsprechenden Gruppe im Mechanismus der Rhodopsin-Transducin-Interaktion sind allerdings nur sehr eingeschränkt möglich. Die Ähnlichkeiten zwischen den dreidimensionalen Strukturen verschiedener G-Proteine deuten dabei allerdings auf einen gemeinsamen Mechanismus des Rezeptor-vermittelten Nucleotidaustausches in der Familie der heterotrimeren G-Proteine hin (Sondek et al., 1996; Hofmann et al., 1995).

### 1.3.7 Wechselwirkungen zwischen Rhodopsin und anderen Proteinen der visuellen Signaltransduktion

Neben Transducin interagiert Rhodopsin auch mit anderen Proteinen der Sehkaskade wie der Rhodopsinkinase, Arrestin und der Proteinphosphatase 2A (Stryer, 1988; Yau, 1994; Hofmann et al., 1995). Der Zerfall des aktiven MII-Zustands erfolgt *in vitro* auch unter nativen Bedingungen sehr viel langsamer als die Termination der Sehkaskade in funktionsfähigen Stäbchenzellen. Weiterhin wird Rhodopsin nach der Lichtaktivierung phosphoryliert. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, daß es sich hier um einen gezielten Deaktivierungsprozeß handelt (Wilden et al., 1986). Die Rhodopsinkinase konkurriert dabei mit Transducin um die lichtaktivierte Form des Rhodopsins und phosphoryliert  $R^*$  an C-terminalen Serin- und Threoninresten, aber auch autokatalytisch sich selbst. Interessanterweise reagiert die Rhodopsinkinase sowohl mit MII als auch mit dem Vorläufer MI (Wilden und Kühn, 1982, Palczewski et al., 1991; Pulvermüller et al., 1993). Die Phosphorylierung senkt dabei die Affinität von  $R^*$  zu Transducin.

Den Hauptbeitrag zur Rezeptordeaktivierung leistet jedoch Arrestin: Das 48 kDa-Protein bindet sich selektiv an die phosphorylierte Form von  $R^*$  und verhindert eine weitere Wechselwirkung mit Transducin oder der Rhodopsinkinase. Darüber hinaus blockiert Arrestin zunächst auch die Dephosphorylierung von  $R^*$  durch die Proteinphosphatase 2A und verhindert somit die mögliche Rückkehr von  $R^*$  in den Transducin-Kreislauf (Wilden et al., 1986). Kürzlich wurde eine Spleißvariante von Rinderrhodopsin (P44) gefunden, die gegenüber Arrestin einen verkürzten C-Terminus aufweist. P44 bindet sowohl die phosphorylierte Form als auch die nicht phosphorylierte Form von  $R^*$  und inhibiert die Transducinaktivierung sogar noch stärker als Arrestin (Palczewski et al., 1994). Die genaue Funktion von P44 ist allerdings noch unklar. Arrestin bindet die phosphorylierte Form von  $R^*$  bis zur Freisetzung des *all-trans*-Retinals. Nach Dissoziation des Arrestins wird das resultierende Phosphopsin schließlich von der Proteinphosphatase A2 dephosphoryliert und mit 11-*cis*-Retinal zu Rhodopsin regeneriert. Die Reiseromerisierung des *all-trans*-Retinals zu 11-*cis*-Retinal erfolgt allerdings in den Zellen des Pigmentepithels (Rando, 1992).

Auch auf der Stufe des G-Proteins existiert ein gezielter Deaktivierungsmechanismus. Phosducin, ein 33 kDa-Protein, liegt im Dunkeln phosphoryliert vor und wird bei Lichteinwirkung dephosphoryliert. Yoshida et al. (1994) konnten zeigen, daß Phosducin in der dephosphorylierten Form die Bindung von Transducin an  $R^*$  unterbindet. Möglicherweise bindet sich Phosducin an die Bindestelle von  $G_{T\alpha}$ -GDP im  $G_{T\beta\gamma}$ -Komplex und verringert dadurch die Konzentration von verfügbarem Transducin. Dies könnte sowohl für die Deaktivierung als auch für die Lichtadaptation der Sehkaskade von Bedeutung sein.

Erst die Lichtaktivierung des Rhodopsins ermöglicht die Phosphorylierung und anschließende Bindung von Arrestin an der cytoplasmatischen Oberfläche des Rezeptors. Daher müssen die Wechselwirkungen dieser Proteine ähnliche molekulare Grundlagen wie die Interaktion zwischen Rhodopsin und Transducin besitzen. Kompetitionsstudien mit synthetischen Peptiden ergaben dementsprechend, daß die Aminosäuren 95-140 des Arrestins sowie die cytoplasmatischen Loopbereiche zwischen Helix 1 und 2 bzw. Helix 3 und 4 des Rhodopsins maßgeblich die Bindung beider Proteine beeinflussen (Hofmann et al., 1995; Smith et al., 1999). In Übereinstimmung mit diesen Experimenten konnten Raman et al. (1999) zeigen, daß bereits der Austausch einzelner Aminosäuren in diesen Abschnitten des Rhodopsins zu einer signifikanten Abnahme der Arrestinbindung führt.

Die Interaktion von Rhodopsin mit anderen Proteinen der visuellen Signaltransduktion basiert somit auf spezifischen Protein-Protein Wechselwirkungen, die erst durch die lichtinduzierten strukturellen Veränderungen des Rhodopsins ermöglicht werden. Das Verständnis der einzelnen Teilschritte erfordert daher detaillierte Kenntnisse über die Struktur der beteiligten Komponenten bzw. Zwischenzustände auf molekularer Ebene. Nach Transducin (Noel et al., 1993; Lambright et al., 1996; Sondek et al., 1996) konnte kürzlich auch die dreidimensionale Struktur von Arrestin geklärt werden (Granzin et al., 1998). Bislang sind aber keine vergleichbaren Strukturdaten von Rhodopsin oder sogar von einem Komplex zwischen der lichtaktivierten Form von Rhodopsin und einem anderen Protein der Sehkaskade verfügbar, die einen tieferen Einblick in diese molekularen Wechselwirkungen geben könnten.

## 1.4 Zielsetzung

Für das Verständnis der Lichtaktivierung des Rhodopsins und der nachfolgenden Aktivierung des G-Proteins Transducin auf molekularer Ebene sind die strukturellen Änderungen in der Chromophorbindungsdomäne und der cytoplasmatischen Oberfläche des Rezeptors von entscheidender Bedeutung. Bislang konnten allerdings weder die Struktur der Umgebung des Retinals noch die Loopbereiche außerhalb der Membranebene aufgelöst werden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Position einzelner Aminosäuren in der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins mit Hilfe von Röntgendiffraktionsmethoden. In der cytoplasmatischen Oberfläche von Rhodopsin kommen zwei native Cysteinreste vor. Nach den bislang vorliegenden Strukturinformationen und den darauf beruhenden Modellrechnungen befindet sich die Aminosäure C140 am Ende der Helix 3. Die Aminosäure C316 ist in der C-terminalen Region zwischen Helix 7 und den Palmitoylierungsstellen C322 bzw. C323 lokalisiert (vgl. Abbildung 1.5). Zur Bestimmung der Position der beiden Aminosäuren sollten die Seitenketten von C140 und C316 in 2D-Kristallen von Rhodopsin mit Schweratommarkern derivatisiert werden. Anschließend sollte die Position der Marker mit Röntgendiffraktion an multilamellaren Filmen von 2D-Kristallen in Kombination mit Fourier-Differenzverfahren ermittelt werden. Diese Experimente geben zum ersten Mal einen direkten Einblick in die Struktur der cytoplasmatischen Oberfläche eines G-Protein gekoppelten Rezeptors.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die lichtinduzierten Veränderungen der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsins mit der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie untersucht werden. Die Methode beruht auf der Anregung von Fluorophoren mit kurzen,

linear polarisierten Lichtpulsen, wodurch eine Photoselektion erzeugt wird, deren Abklingen auf Grund der Fluorophorbewegung zeitaufgelöst verfolgt wird. Zur Untersuchung der cytoplasmatischen Oberfläche des Rhodopsin sollten hierbei die nativen Cysteinreste C140 und C316 selektiv mit sulfhydrylspezifischen Fluoreszenzmarkern derivatisiert werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropiemessungen erhält man dabei Aufschluß über das dynamische Verhalten der Fluorophormoleküle an der Proteinoberfläche sowie über mögliche sterische Einschränkungen der Fluorophorbewegung durch die Proteinumgebung. Durch Vergleich der Fluoreszenzanisotropiekurven unterschiedlicher Photointermediate können hierbei unmittelbar Konformationsänderungen an der Oberfläche des Rhodopsins beobachten werden, die für die Bindung und Aktivierung des G-Proteins Transducin verantwortlich sind.