

Abstract

Intermolecular transduction of the light signal in rods is initiated by the interaction of the photoreceptor, rhodopsin, with the G protein transducin (G_t). In recent years, research on the rhodopsin/ G_t -system has contributed substantially towards our understanding of G protein-coupled signal transduction. Aim of the proposed project is to explore the mechanism of receptor activation and the detailed investigation of the interface between receptor and G protein involved in nucleotide exchange catalysis by biophysical techniques.

In the previous work in the Institut für Medizinische Physik und Biophysik it has been studied on how transitory states of the catalytic process, including GDP release, formation of the 'empty site'-complex, and GTP-uptake can be regulated in detail. By applying evanescent field techniques like surface plasmon resonance (SPR / BIAcore analysis) it was possible to monitor the interaction between G_t and rhodopsin and the activation of G_t . For these measurements solubilized rhodopsin from rod diskmembranes was chemically modified and immobilized onto the surface of a sensor chip (Bieri et al., 1999).

In this thesis recombinant techniques were applied to produce rhodopsins, which are further biotinylated enzymatically at a single, unique site. We intend to purify the rhodopsin via this biotin-tag and to immobilize the protein through a NeutrAvidin linker in a specific orientation onto a sensor surface. This would then allow to measure the interactions between G_t and recombinant rhodopsin, and perhaps opens the door to chip based assays of interactions between G-proteins and G-protein coupled receptors in general.

In our approach we translationally fused a 13 amino acid acceptor peptide, which is recognized by the *E. coli* biotin ligase (BirA protein) to the N-terminus of rhodopsin. Attempts have been made to biotinylate the fused peptide substrate enzymatically in vitro by using recombinant biotin ligase.

Western blot techniques were used to detect successful transfer of biotin to the recombinant receptor. After purification, the biotinylated rhodopsin was characterized spectroscopically and its capability to catalyze nucleotide exchange in transducin was determined with established fluorescence assays.

Finally, the activation of G_t was monitored using evanescent field techniques (SPR/resonant mirror), Rhodopsin was successfully reconstituted into supported lipid bilayers (SLB) and the coupling reactions with transducin closely resemble those of the native system, indicating that the functionality of rhodopsin was restored in the SLB. Immobilized rhodopsin can be regenerated with 11-*cis*-retinal, yielding flash-induced activities similar to native rhodopsin. The reconstituted rhodopsin- G_t system was remarkably stable, and repeated activation/deactivation cycles could be monitored readily.

This approach may be extended to rhodopsin mutants and the interaction of rhodopsin with other proteins of the visual cascade. Also this approach may be applicable to other G protein coupled receptors.

Zusammenfassung

Die intermolekulare Transduktion des Lichtsignals wird in Stäbchenzellen durch die Interaktion des Photorezeptors Rhodopsin mit dem G-Protein Transducin (G_t) ausgelöst. Aktuelle Forschungen am Rhodopsin/ G_t -System tragen substantiell zu unserem Verständnis der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion bei. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufdeckung der Mechanismen der Rezeptoraktivierung sowie die detaillierte Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und G-Protein und die damit verbundene Nukleotidaustauschreaktion mit biophysikalischen Methoden.

Frühere Arbeiten am Institut für Medizinische Physik und Biophysik befaßten sich mit der Aufklärung, wie die Übergangszustände des katalytischen Prozesses -einschließlich GDP-Freisetzung-, die Bildung des sogenannten „Empty-Site-Komplexes“ sowie die Aufnahme von GTP im Einzelnen reguliert werden.

Durch die Verwendung der Evaneszentfeld-Technik, wie die Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance* –SPR/BIAcore analysis), war es möglich, die Interaktion zwischen G_t und Rhodopsin und die Aktivierung von G_t darzustellen. Für diese Messungen wurde lösliches Rhodopsin aus Membranen von Stäbchenaußensegmenten chemisch modifiziert und auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert (Bieri et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit rekombinanten Techniken Rhodopsin hergestellt werden, das an einer einzigen, definierten Stelle enzymatisch biotinyliert ist. Wir beabsichtigten dabei, Rhodopsin über den Biotin-tag aufzureinigen und das Protein über eine NeutrAvidin-Verbindung in spezifischer Orientierung auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren. Dieses Verfahren würde es dann erlauben, die Interaktion zwischen G_t und rekombinantem Rhodopsin zu messen und vielleicht die Möglichkeit eröffnen, chipbasierend die Interaktion zwischen G-Proteinen und G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Allgemeinen zu messen.

In unserem Ansatz wurde der N-Terminus von Rhodopsin translational mit einem 13mer Aminosäureakzeptorpeptid fusioniert, das durch die *E.coli* biotin ligase (BirA Protein) erkannt wird. Es wurden Versuche unternommen, unter Verwendung einer rekombinanten Biotinligase in vitro das Fusionspeptidsubstrat enzymatisch zu biotinylieren.

Der erfolgreiche Biotintransfer auf den rekombinanten Rezeptor wurde mit Western Blot Verfahren bestätigt. Nach der Aufreinigung wurde das biotinylierte Rhodopsin spektroskopisch charakterisiert und seine Fähigkeit, den Nucleid austausch von Transducin zu katalysieren, konnte mit etablierten Fluoreszenztechniken bestätigt werden.

Anschließend wurde die Transducin-Aktivierung unter Verwendung der Evaneszentfeld-Technik (SPR/Resonant Mirror) aufgezeichnet, Rhodopsin wurde erfolgreich auf den unterliegenden Lipidbilayer (*supported lipid bilayer*, SLB) aufgebracht, wobei die Kopplungsreaktion mit Transducin der des nativen Systems ähnelte. Dies ist ein Hinweis darauf, daß in der SLB-Schicht funktionsfähiges Rhodopsin generiert wurde. Immobilisiertes Rhodopsin kann mit 11-*cis*-Retinal regeneriert werden und es erreicht blitzlichtinduzierte Aktivitäten, vergleichbar denen des nativen Rhodopsins. Das rekonstruierte Rhodopsin-G_t-System ist bemerkenswert stabil und wiederholte Aktivierungs-/Deaktivierungszyklen sind leicht meßbar.

Dieser Ansatz kann auf Rhodopsinmutanten und die Rhodopsininteraktion mit weiteren Proteinen der Visuellen Kaskade ausgedehnt werden. Ebenso kann diese Methode auf andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren angewendet werden.