

Fehlfunktion der Guanylatzyklase Aktivität im visuellen System

Zur Erlangung des Grades und Titels eines Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

angenommene Dissertation

an der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

von Farina Vocke geboren am 07.11.1985 in Osnabrück

1. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch
2. Gutachter: Prof. Dr. Janssen-Bienhold

Tag der Disputation: 16.06.2017

Inhaltsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis	iv
III Tabellenverzeichnis	v
IV Abkürzungsverzeichnis	vi
V Abstract	x
VI Zusammenfassung	xi
1. Einleitung	1
1.1 Der Aufbau der Wirbeltierretina	1
1.2 Die neuronalen Zellen der Retina	2
1.2.1 Photorezeptoren der Vertebraten	3
1.2.2 Der retinale Signalweg	5
1.3 Die Phototransduktion	7
1.3.1 Die Komponenten der biochemischen Phototransduktion	8
1.3.2 Die Wiederherstellung des Dunkelzustandes	10
1.4 Die Guanylatzyklasen (GC)	11
1.5 Guanylatzyklase-aktivierende Proteine (GCAPs)	13
1.5.1 Interaktion mit der GC	14
1.5.2 Struktur	15
1.5.3 GCAP Mutationen	18
1.5.3.1 Die GCAP1 Mutante L176F	20
1.5.3.2 Die GCAP1 Mutante D100E	22
1.6 Nanopartikel	22
1.6.1 CaF ₂ -Nanopartikel	24
2. Zielsetzung	25
3. Material und Methoden	26
3.1 Geräte	26
3.2 Verbrauchsmaterialien	28
3.3 Chemikalien	29
3.4 Verwendete Bakterienstämme	31
3.5 Methodendurchführung	31
3.6 Klonierung	31
3.6.1 Verwendete Primer	31
3.6.2 Verwendete Vektoren:	32

3.6.3 Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit Protocol	32
3.6.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	34
3.6.5 Transformation	35
3.6.6 DNA Reinigung	35
3.6.7 Sequenzierung	36
3.6.8 Glycerolstocks herstellen	36
3.7 Expression und Reinigung der Proteine	37
3.7.1 Expression	37
3.7.2 Zellaufschluss	38
3.7.3 Dialyse	38
3.7.4 Ammoniumsulfat-Fällung	39
3.7.5 Chromatographische Trennung	40
3.7.5.1 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	40
3.7.5.2 Anionenaustausch-Chromatographie (AEC)	41
3.7.6 SDS (Sodium dodecyl sulfate)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.7.7 Coomassie-Färbung	43
3.7.8 Pufferwechsel	44
3.7.9 Proteinkonzentrationsbestimmung	45
3.7.10 Lyophilisierung	46
3.8 Bereitstellung von hGC-E	46
3.8.1 Anzucht stabiler Zelllinien	46
3.8.2 Behandlung mit CaF ₂	47
3.8.3 Ernte und Aufschluss	47
3.8.4 Nachweis von hGC-E	48
3.8.4.1 Westernblot	48
3.8.4.2 Immunchemischer Antigennachweis	48
3.8.4.3 Amidoblack	49
3.9 Strukturanalysen	51
3.9.1 Ca ²⁺ -shift Assay	51
3.9.2 Tryptophan-Messung	52
3.10 Bindungsstudien	53
3.10.1 Chelator-Assay	54
3.10.2 Isotherme Titrationskalorimetrie	55
3.10.2.1 Decalzifizierung von Puffern	56

3.10.2.2 Ca ²⁺ -Konzentrationsbestimmung (BAPTA)	57
3.11 Funktionalitätsstudien (GC-Assays)	58
3.11.1 übergreifende Testdurchführung:	59
3.11.2 IC ₅₀ -Messung	60
3.11.3 EC ₅₀ -Messung	61
3.11.4 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)	61
4 Ergebnisse	62
4.1 Projekt 1: Biochemische Untersuchung der GCAP1-Mutante L176F	62
4.1.1 Funktionalitätsstudien: IC ₅₀ -Wert	62
4.1.2 Funktionalitätsstudien: x-fache Aktivierung	63
4.1.3 Funktionalitätsstudien: EC ₅₀ -Werte	64
4.1.4 Funktionalitätsstudien: Chelator-Assay	65
4.1.5 Strukturanalysen: Ca ²⁺ -shift Assay	67
4.1.6 Strukturanalysen: Tryptophan-Fluoreszenz	68
4.2 Projekt 2: Einwirkungen von CaF ₂ auf das GCAP/GC System	71
4.2.1 Vorversuche (durchgeführt von Daniele Dell'Orco)	71
4.2.2 Einfluss von CaF ₂ auf HEK-293 Zellen	73
4.2.3 Stöchiometriebestimmung Nanopartikel und GCAP1/D100E	74
4.2.4 Funktionalitätsstudien: IC ₅₀ -Assay	76
4.2.5 Funktionalitätsstudien: EC ₅₀ -Assay	78
4.2.6 Einfluss der Nanopartikel auf die hGC-E Konzentration in stabilen Zelllinien	79
5. Diskussion	82
5.1 Biochemische Untersuchung der GCAP1-Mutante L176F	82
5.2 CaF ₂ -Nanopartikel als Wirkstoff-Transport-System für GCAPs	88
6 Literaturverzeichnis	97
7 Anhang	107
8 Publikationen, Abstracts, Vorträge	108
8.1 Publikationen	108
8.2 Abstracts und Poster	109
8.3 Vorträge	109
9 Erklärung	110
10 Lebenslauf	111
Danksagung	112

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fundusaufnahme des Auges	1
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Wirbeltierretina	3
Abbildung 3: Aufbau von Zapfen und Stäbchen.	4
Abbildung 4: Der Dunkelzustand eines Photorezeptors (Stäbchen)	9
Abbildung 5: Photoisomerisierung des Retinals	9
Abbildung 6: Lichtantwort des Photorezeptors (Stäbchen)	10
Abbildung 7: Wiederherstellung des Dunkelzustandes	11
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer GC; dargestellt als homologes Dimer	12
Abbildung 9: Kristallstruktur von myristyliertem GCAP1 aus Huhn	13
Abbildung 10: Schematische Darstellung des „Ca ²⁺ -relay“ Modells	15
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Calcium-Myristoyl-Tug	17
Abbildung 12: Bekannte GCAP1 Mutationen	20
Abbildung 13: Stammbaum der von L176F Mutante betroffenen Familien	21
Abbildung 14: Aufbau einer ITC	55
Abbildung 15: IC ₅₀ -Messung	63
Abbildung 16: x-fache Aktivierung	64
Abbildung 17: EC ₅₀ -Assay	65
Abbildung 18: Chelator-Assay	66
Abbildung 19: Ca ²⁺ -shift Assay	68
Abbildung 20: Tryptophan-Fluoreszenz ohne Mg ²⁺	69
Abbildung 21: Tryptophan-Fluoreszenz mit Mg ²⁺	70
Abbildung 22: Wachstumsanalyse HEK-293 Zellen ohne und mit CaF ₂ behandelt	74
Abbildung 23: Isotherme Titrationskalometrie von GCAP1 und D100E mit CaF ₂	75
Abbildung 24: IC ₅₀ -Assay	77
Abbildung 25: EC ₅₀ -Assay	78
Abbildung 26: Analysiertes Zelllysate stabiler hGC-E Zelllinien	79
Abbildung 27: Nachweis der hGC-E bindenden Wirkung von CaF ₂	80
Abbildung 28: Lage der Mutation L176F	83

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: GCAP1 Mutanten und ihre Dystrophien	19
Tabelle 2: Geräte	26
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 4: Chemikalien	29
Tabelle 5: Ansatz für PCR	33
Tabelle 6: Programm für PCR	33
Tabelle 7: Zusammensetzung KLD Ansatz	34
Tabelle 8: Zusammensetzung LB-Medium	34
Tabelle 9: Zusammensetzung Dialysepuffer	39
Tabelle 10: Zusammensetzung SEC- Puffer	39
Tabelle 11: Zusammensetzung AEC Puffer A	42
Tabelle 12: Zusammensetzung AEC Puffer B	41
Tabelle 13: Zusammensetzung Trenngel (12%)	43
Tabelle 14: Zusammensetzung Sammelgel	42
Tabelle 15: Zusammensetzung 4xSDS Probenpuffer	44
Tabelle 16: Zusammensetzung Elektrophorese-Laufpuffer	43
Tabelle 17: Zusammensetzung Coomassie-Färbelösung	45
Tabelle 18: Zusammensetzung Entfärberlösung	44
Tabelle 19: Zusammensetzung Aufschlusspuffer	48
Tabelle 20: Zusammensetzung Resuspensionspuffer	47
Tabelle 21: Zusammensetzung Transferpuffer	48
Tabelle 22: Zusammensetzung Tris-gepufferte NaCl-Lösung (TBST)	49
Tabelle 23: Zusammensetzung Amidoblack-Färbelösung	50
Tabelle 24: Zusammensetzung Entfärberlösung	50
Tabelle 25: Zusammensetzung Elutionslösung	50
Tabelle 26: Zusammensetzung Fluoreszenzpuffer	52
Tabelle 27: Pipettierchema Tryptophan-Messung	53
Tabelle 28: Zusammensetzung 2,5 x GC-Puffer	60
Tabelle 29: Zusammensetzung Resuspensionspuffer	59
Tabelle 30: Pipettierchema Testansätze IC ₅₀ -Messung	60
Tabelle 31: Auswertung des Chelator-Assays	67
Tabelle 32: Daten der ITC Auswertung für GCAP1 und D100E	76

IV Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
μ	micro
AEC	Anionic Exchange Chromatography; Anionenaustausch-Chromatographie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
AU	Arbitrary units (z.B. bei Fluoreszenzintensität der Emission)
BAPTA	(1,2-bis (o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
BCVA	best correct distance visual acuity
BSA	Bovines Serumalbumin
BSI	back scattering interferometry
CaCl ₂	Calciumdichlorid
CD	Zapfen-Dystrophie
cGMP	Guanosin-3',5'-cyclisches Monophosphat
CM	Calcium-/Magnesium
CNG-Kanal	cyclisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DD	Dimerisierungsdomäne
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
ECD	extrazelluläre Domäne
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm

EtOH	Ethanol
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GC	Guanylatzyklase
GCAP	Guanylatzyklase-aktivierendes Protein
GCL	Ganglienzellschicht
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
Glu	Glutaminsäure
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'triphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser (zweifach destilliert)
HCl	Salzsäure
HCN-Kanal	hyperpolarisations-aktivierter und durch zyklische Nukleotide-modulierter Kanal
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIS	Histidin
HK	Hauptkultur
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICD	intrazelluläre Domäne
IDD	intradiskale Domäne
INL	innere Körnerschicht (inner nuclear layer)
IPL	innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	Innensegment
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
JMD	Juxtamembran Domäne
K ₂ H ₂ EGTA	Dikalium-dihydrogen Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure
KchIP	Kalium-(Kv) Kanal-interagierendes Protein
KCl	Kaliumchlorid
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	kiloDalton; 1000 g/mol

KHD	Kinase-Homologie-Domäne
LCA	Leber'sche kongentiale Amaurose
LB	Lennox Broth Medium; Komplexmedium
M	mol/l
m	Milli
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
myr	Myristyliert
MWCO	molecular weight cut off
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	neuronaler Calcium-Sensor
NH ₃	Ammoniak
nm	nicht-myristyliert
OD	optische Dichte oder oculus dexter
ONL	Äußere nucleäre Schicht (outer nuclear layer)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)
OS	Außensegment oder oculus sinister
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDE	Phosphodiesterase
PE	Pigmentepithel
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rec	Recoverin
Rho	Rhodopsin
Rho*	Metarhodopsin II
RK	Rhodopsinkinase
ROS	Rod outer segments (Stäbchenaußensegmente)
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute
RU	response Units

SEC	Size Exclusion Chromatography; Größenausschlusschromatographie
SPR	Surface Plasmon Resonance; Oberflächenplasmonresonanz
T	Transducin
TBS	Tris buffered saline; Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris buffered saline; Tris-gepufferte Saline + Tween
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Teramethylethylendiamin
TMD	Transmembran Domäne
Tyr	Tyrosin
U	Unit; 1 μmol Substrat pro Minute
UV/VIS	ultraviolett/Sichtbares Spektrum
v/v	Volumen/Volumen
VILIPs	Visin-ähnliche Proteine
VK	Vorkultur
WT	WT
w/v	Masse/Volumen
w/w	Masse/Masse
zGCAP	Zebrafisch Guanylatzyklase aktivierende Proteine
Δ	Differenz
ε	molarer Extinktionskoeffizient

V Abstract

Guanylate cyclase activating proteins (GCAPs) serve important functions in the phototransduction process. GCAPs are Ca^{2+} -sensor proteins, which regulate the guanylate cyclase (GC). GCAPs inhibit the GC under high Ca^{2+} concentration and activate the GC under low Ca^{2+} concentrations. Together, both proteins have an important impact on the regulation of the second messenger (Ca^{2+} and cGMP) concentrations in the photoreceptor cells. There are many retinal diseases like cone-rod dystrophy, which are caused by GCAP or GC mutants. In this work, the biochemical properties of a GCAP1 mutant (L176F), found in patients diagnosed with macula dystrophy, are described. Therefore, L176F was heterologously expressed and purified. The structural analysis based on tryptophan fluorescence indicates that the Ca^{2+} -depending conformational change of the protein is affected. This leads to a higher apparent GC affinity. L176F also showed a Ca^{2+} -dependent GC-activation at unphysiological high Ca^{2+} concentration and induces a higher cGMP production of GC than GCAP1. This influences the cGMP/ Ca^{2+} -homeostasis of a photoreceptor cell and causes eventually the macula dystrophy outbreak.

The second part deals with the biochemical investigation of CaF_2 nanoparticles, addressing the generally function as a GCAP-drug-delivery system. The Ca^{2+} -ions on the particle surface might serve in GCAP binding. Preliminary studies have shown, that GCAPs can bind and dissociate to CaF_2 . Isothermal titration calorimetry was applied to determine the stoichiometry of this binding to 16:1 (GCAP1: CaF_2 particles). The GCAP1 mutant D100E was also tested due to its low Ca^{2+} sensitivity for analyzing the binding properties to the nanoparticles. In this case the stoichiometry is approximate 54:1 (D100E: CaF_2). The Ca^{2+} sensitivity of GCAP1 is not influenced by presence of CaF_2 (determined by halfmaximal Ca^{2+} -depending GC activity), but the cGMP production of the GCAP/GC complex, as well as the apparent GC affinity of GCAP1 was significantly impaired. Further studies have shown an aggregation of GC to the nanoparticles which significantly affects the functionality of the GC/GCAP complex. This GC/ CaF_2 binding unintentionally excluded CaF_2 as a possible drug-delivery-system for GCAPs.

VI Zusammenfassung

Guanylatzyklase-aktivierende Proteine (GCAPs) nehmen eine Zentralfunktion in der biochemischen Signalkaskade der Phototransduktion ein. GCAPs sind Ca^{2+} -Sensorproteine, die durch ihre Regulation der Guanylatzyklase (GC) einen entscheidenden Einfluss auf die cGMP-Konzentration besitzen. Ca^{2+} und cGMP sind die sekundären Botenstoffe der Lichtenregung im Photorezeptor. Es gibt mehrere Krankheitsbilder, wie Stäbchen-Zapfen Dystrophie, die auf Mutationen in diesem Protein beruhen.

In dieser Arbeit wird eine, in Patienten mit Makula Dystrophie neu nachgewiesene, Mutante des GCAP1 (L176F) zum ersten Mal beschrieben. Die Mutante wurde heterolog exprimiert und gereinigt. In folgenden biochemischen Analysen zeigte L176F verschiedene funktionelle und strukturelle Unterschiede zum Wildtyp (WT). Es konnte eine Beeinträchtigung der Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung der Mutante L176F, durch messen der Tryptophan-Fluoreszenz, gezeigt werden. Darüber hinaus bewirkt die Mutante L176F eine stärkere apparente Affinität an die GC, als GCAP1. Am Auffälligsten erhöht sind jedoch die Ca^{2+} -Sensitivität (die durch die halbmaximale Aktivität der GC bestimmt wurde) sowie die cGMP-Produktion des L176F/GC-Komplexes. All diese Eigenschaften stören die cGMP- Ca^{2+} -Homöostase und könnten dazu führen, dass bei fortgeschrittenem Alterungsprozess Makula Dystrophie ausbricht.

Ein weiteres Projekt dieser Arbeit befasste sich mit CaF_2 -Nanopartikeln, die als mögliches Wirkstoff-Transport-System für GCAP1, biochemisch untersucht werden sollten. Nanopartikel werden nicht durch Membranen zurückgehalten und können Proteine zu therapeutischen Zwecken in Zellen transportieren. Die ersten Vorarbeiten zeigten, dass GCAP1 an die CaF_2 -Partikel binden und dissoziieren kann. Aufbauend auf diese ersten Ergebnisse konnte während dieser Arbeit die Stöchiometrie der Bindung GCAP1: CaF_2 auf mindestens 16:1 (über isotherme Titrationskalometrie) bestimmt werden. Für die genauere Erforschung der Bindungseigenschaften wurde auch die schwach Ca^{2+} -affine Mutante D100E mit CaF_2 titriert. Hier konnte eine Stöchiometrie von 54:1 (D100E: CaF_2 -Partikel) nachgewiesen werden. Ca^{2+} -Sensitivitätsstudien von GCAP1/GC bzw. D100E/GC in Anwesenheit von Nanopartikel zeigten keine Änderung des Aktivierungsprofils. Jedoch wird die cGMP Produktion drastisch erniedrigt, sobald Nanopartikel im Testansatz vorhanden sind. In weiterführenden Experimenten stellte sich eine hohe Affinität und Aggregation der GC an die CaF_2 -Partikel heraus, die maßgeblich an der verringerten cGMP Produktionsrate beteiligt

ist. Durch diese unspezifische Proteinbindung, erwiesen sich CaF_2 -Nanopartikel als Wirkstoff-Transporter für GCAP als unzureichend.

1. Einleitung

Sehen gehört zu den fünf Sinnen des Menschen und ist somit eines der wichtigsten Werkzeuge, um unsere Umwelt wahrzunehmen. Das Sehvermögen hilft, Gefahren frühzeitig zu erkennen oder auch Emotionen, die durch nonverbale Körpersprache ausgedrückt werden, aufzunehmen. Damit der Mensch ein Bild sieht, muss ein physikalischer Reiz (das Licht) in einen biochemischen und anschließend wieder in einen elektrischen umgewandelt werden. Dieser Prozess erfolgt in der Wirbeltierretina.

1.1 Der Aufbau der Wirbeltierretina

Fällt Licht in das Auge eines Wirbeltieres, wird es durch den dioptrischen Apparat, welcher aus Cornea, Linse und Glaskörper besteht, auf die Retina fokussiert. Die Retina befindet sich in der Innenseite des Auges. Sie entsteht während der embryonalen Entwicklung aus einer Ausstülpung des Zwischenhirnbodens und ist dementsprechend ein Teil des Gehirns, was ihr komplexes neuronales Netzwerk erklärt. Sie wird umschlossen von der stark durchbluteten Aderhaut (Choroid). Diese versorgt die Netzhaut mit Nährstoffen, ist für die Wärmeregulation verantwortlich, minimiert über Pigmentzellen das Streulicht und hilft durch ihre Elastizität beim Scharfstellen von Objekten. Zum Augennern grenzt die Retina an den Glaskörper (Corpus vitreus). Dieser besteht zu 98% aus Wasser sowie aus 2% Hyaluronsäure und Kollagenfasern und ist vor allem für die Form des Augapfels verantwortlich (1, 2).

Zwei Bereiche der Retina fallen morphologisch auf; der gelbe und der blinde Fleck. Der gelbe Fleck (Macula lutea; Makula) ist, obwohl nur etwa 3-5 mm groß, der Ort des schärfsten Sehens. Wird ein Bild mit den Augen fokussiert, wird es dort

abgebildet. Der gelbe Fleck (Makula) verdankt seinen Namen den eingelagerten gelben Pigmenten Lutein und Zeaxanthin und zeigt sich bei Augenhintergrundaufnahmen (Fundus oculi) durch die stärkere orange Färbung. In der Mitte der Makula befindet sich die etwa

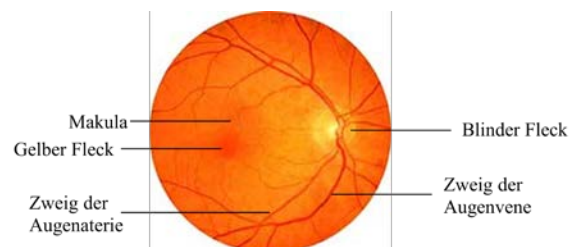


Abbildung 1: Fundusaufnahme des Auges. Entnommen und modifiziert nach (140).

1,5 mm große Sehgrube (Fovea centralis). Diese besitzt die höchsten Zapfendichte (140.000 Zapfen/mm²) der gesamten Retina. Die Nervenfasern der Retina laufen in der Papille (blinder Fleck) zusammen und bündeln sich dort zum Sehnerv. Der blinde Fleck befindet sich ca. 15° von der Makula entfernt Richtung Nase. Hier kann kein Bild erzeugt werden, da keine Photorezeptorzellen vorhanden sind. Das Gehirn ersetzt die fehlenden Informationen durch die Aufnahmen des anderen Auges und der Umgebung. Der blinde Fleck erscheint im Fundus sehr hell. Von hier aus strahlen auch (im Fundus, Abbildung 1, zu erkennen), die auf der Aderhaut liegenden, Augenvenen und -arterien aus (1, 2, 3).

Die Retina ist ein lichtsensitives, neuronales Gewebe, das aus fünf verschiedenen Zelltypen besteht: den Photorezeptoren (L-, M-, S-Zapfen und Stäbchen), den Horizontalzellen sowie den Bipolarzellen, den Amakrinzellen und den Ganglienzellen. Diese verschiedenen Zelltypen erzeugen aufgrund ihrer Anordnung drei nukleäre Schichten und zwei plexiforme Schichten. In den nukleären Schichten (äußerer nukleärer Schicht (ONL), innerer nukleärer Schicht (INL) und Ganglien Zellschicht (GCL)) sind die Zellkerne der Neuronen angeordnet. In den zwei dazwischen liegenden plexiformen Schichten (äußere plexiforme Schicht (OPL) und innere plexiforme Schicht (IPL)) sind die Synapsen miteinander verschaltet (siehe Abbildung 2). Die Außensegmente der Photorezeptoren sind ins retinale Pigmentepithel eingebettet. Hier werden die Disks der Stäbchen nach 12 Tagen Gebrauch abgebaut, die Photorezeptoren mit Nährstoffen (wie Vitamin A) versorgt und Streulicht über das enthaltene Pigment Melanin absorbiert (4).

1.2 Die neuronalen Zellen der Retina

Einfallendes Licht wird über membranlokalisierte Pigmentmoleküle in den Zapfen und Stäbchen detektiert. Bei Nacht detektieren Stäbchen (skotopisches Sehen) das schwache Licht, bei guten Sichtverhältnissen werden hingegen Zapfen (photopisches Sehen) angesprochen. Die Photorezeptorzellen wandeln den Lichtreiz über eine biochemische Proteinkaskade in ein elektrisches Signal (bis zu -65 mV; Hyperpolarisation der Zellmembran) um. Aufgrund der Spannungsänderung ändert sich der Glutamatstrom der synaptischen Enden der Photorezeptorzellen, was von nachgeschalteten Bipolar- und Horizontalzellen detektiert wird (5). Bipolarzellen werden klassisch in ON/OFF-Zellen unterteilt, je nachdem, wie sie auf einen Lichtreiz reagieren. Sie können tonisch oder phasisch

reagieren. Horizontalzellen verschalten die Photorezeptoren untereinander und wirken lateral hemmend auf die Signale. Amakrinzellen verbinden Bipolarzellen und Ganglienzellen miteinander und koppeln unter anderem auch Stäbchen- und Zapfen-Bipolarzellen. Sie modulieren das elektrische Signal, welches an die Ganglienzellen weitergeleitet wird. Amakrinzellen ähneln also in ihrer verbindenden Funktion den Horizontalzellen (6, 7, 8). Die Zellkörper der Amakrin-, Horizontal- und Bipolarzellen liegen in der INL. Ganglienzellen bilden die Nervenfaserschicht und anschließend den optischen Sehnerv und geben das Signal in Form eines Aktionspotentials an das Gehirn weiter. Jede Ganglienzelle ist aufgrund der vorangegangenen Verschaltung einem bestimmten Sehfeld zugeordnet. Man unterscheidet auch hier zwischen ON- und OFF-Zentren, die ihre Aktivität erhöhen bzw. verringern, wenn sie belichtet werden und ihre Peripherie nicht (9, 10).

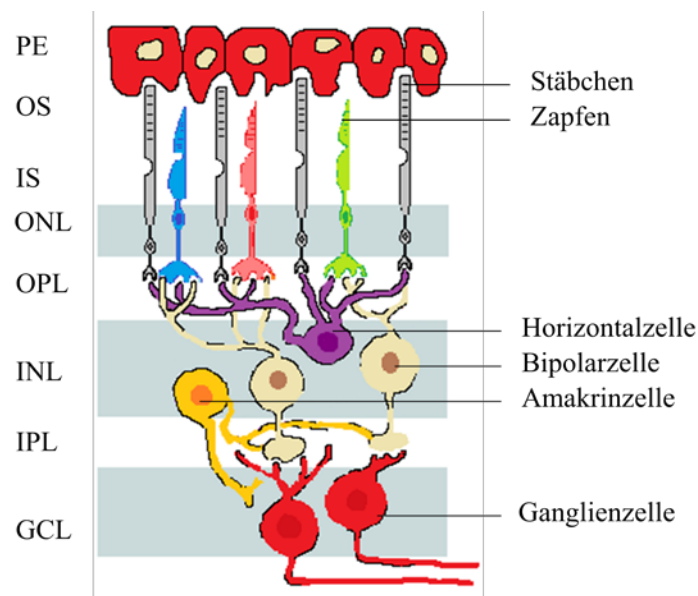


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Wirbeltierretina. Die plexiformen Schichten sind grau hinterlegt. **PE:** Pigmentepithel (phagozytiert abgeschnürte Membranstapel); **OS:** äußere Segmente der Photorezeptoren; **IS:** innere Segmente der Photorezeptoren; **ONL:** äußere nukleäre Schicht; **OPL:** äußere plexiforme Schicht; **INL:** innere nukleäre Schicht; **IPL:** innere plexiforme Schicht; **GCL:** Ganglien-Zellschicht.

1.2.1 Photorezeptoren der Vertebraten

Es gibt zwei unterschiedliche Photorezeptoren in Vertebraten: Stäbchen und Zapfen. Stäbchen sind sehr lichtsensitiv und reagieren schon auf einzelne Photonen. Sie vermitteln das skotopische Sehen. Zapfen sind weniger lichtsensitiv, sie vermitteln das photopische Sehen. Während Dämmerungsphasen werden beide Photorezeptortypen angesprochen (mesopisches Sehen), wobei das Farbsehen eingeschränkt ist (2). Der Mensch besitzt drei unterschiedliche

Zapfen-Typen: S-Typ, M-Typ und L-Typ. Andere Tiere wie einige Fische oder Vögel besitzen außerdem Zapfen die ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Spektralbereich aufweisen. Die menschliche Retina enthält ca. 92 Millionen Stäbchen und ca. 46 Millionen Zapfen (11, 12). Ungefähr 100 Photonen sind notwendig um einen Zapfen zu aktivieren, während Stäbchen nur 1 Photon benötigen. Dies beruht auf den weniger sensitiven Photopigmenten der Zapfen, den Iodopsinen. Man unterscheidet drei verschiedene Iodopsine, die auf distinkte Wellenlängen spezialisiert sind. S-Zapfen enthalten das S-Iodopsin (veraltet Cyanoopsin), das die Eigenfarbe Rot besitzt und ein Absorptionsmaximum bei 455 nm aufweist. M-Zapfen besitzen M-Iodopsin (veraltet: Porphyropsin), das bei 535 nm sein Absorptionsmaximum hat. L-Typ Zapfen besitzt L-Iodopsin (veraltet Iodopsin), das bei 570 nm absorbiert. Alle Sehpigmente bestehen aus einer Proteinkomponente (Opsin) und einem Chromophor (11-*cis*-Retinal oder 11-*cis*-Retinol). Die Chromophore werden durch eine lichtinduzierte Reaktion isomerisiert. Es entsteht die *trans*-Isoform (siehe Abbildung 5). Sie sind über eine Schiff'sche-Base an einen hochkonservierten Lysinrest in der siebten transmembranen Domäne des Opsins (ges. 7 transmembrane Helices) gebunden. Eine Isomerisierung des Chromophors führt zu einer Konformationsänderung des Proteins. Dies ist der erste Schritt einer biochemischen Proteinkaskade (siehe Abschnitt 1.3). Eine Stäbchenlichtantwort dauert ca. 600 ms während eine Zapfenlichtantwort nur ca. 200 ms benötigt (1, 3).

Beide Photorezeptoren sind untergliedert in ein äußeres und ein inneres Segment, welche über das Cilium miteinander verbunden sind. Sie sind optisch leicht voneinander zu unterscheiden (siehe Abbildung 3): Stäbchen sind länger (bis zu 25 μm lang und 2 μm dick) und dünner als Zapfen (ca. 13 μm lang und 3 μm dick) und besitzen flache Membranvesikel (Disk-Membranen) in ihren äußeren Segmenten (13). Hier ist die biochemische Kaskade der Phototransduktion mit dem lichtabsorbierenden Protein Rhodopsin lokalisiert.

Zapfen besitzen anstatt Disk-Membranen

Einstülpungen der Plasmamembran, wo die Signaltransduktion durch eine von drei

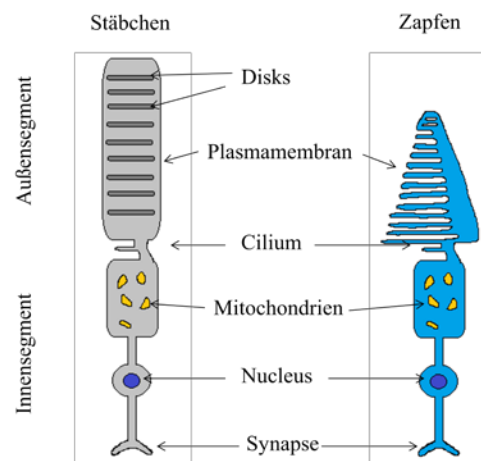


Abbildung 3: Aufbau von Zapfen und Stäbchen. Stäbchen vermitteln das Sehen bei Nacht, Zapfen das Farbsehen bei Tage. Stäbchen und Zapfen werden in Innen- und Außensegment untergliedert. Im Außensegment findet die biochemische Signaltransduktion statt: bei den Stäbchen in den Disk Membranen, bei den Zapfen in der Plasmamembran. Im Innensegment befindet sich der Nucleus, Zellorganellen wie Mitochondrien und am Terminus die synaptischen Enden, die zur Signalweitergabe benötigt werden.

lichtabsorbierenden Iodopsinen gestartet wird. Im inneren Segment der Photorezeptorzellen befinden sich die Zellkerne und weitere Zellorganellen wie Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum. Außerdem befinden sich in den Membranen Ionenkanäle und Transporter (wie selektive Kaliumkanäle), welche wichtig für die Hyperpolarisation des Photorezeptors sind (1, 2). Am Ende des inneren Segmentes befindet sich der synaptische Terminus. In Einstülpungen der synaptischen Enden sind Ribbons integriert, die Glutamatvesikel koppeln und die permanente Ausschüttung des Neurotransmitters sicherstellen. Hier werden Änderungen des Glutamatstromes, bedingt durch detektierte Lichtsignale, an nachgeschaltete Horizontal- oder Biploarzellen weitergegeben. Im Dunkelzustand ist die Photorezeptormembran depolarisiert. Durch die biochemische Signalkaskade schließen bei Lichteinfall die CNG-Kanäle (cGMP-gated channel) der Außensegmente, während beispielsweise die Kalium-selektiven Kanäle der Innensegmente weiterhin geöffnet bleiben (siehe Abschnitt 1.3). Als Resultat hyperpolarisieren die Photorezeptoren. Im Dunkelzustand hält der Photorezeptor eine Spannung von ca. -40 mV. Trifft nun ein Lichtreiz auf die Retina, kann diese Spannung je nach Intensität auf -65 mV sinken. Hyperpolarisation ist gut geeignet um ein Signal über kurze Strecken zu befördern. Die Hyperpolarisation des Rezeptors beeinflusst die stetig vorhandene Glutamatfreisetzung der synaptischen Enden (1, 14, 15).

1.2.2 Der retinale Signalweg

Der umgewandelte Lichtreiz führt zu einer Glutamatregulation an den synaptischen Enden des Photorezeptors. Glutamat ist einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter von Nervenzellen (1). Die veränderte Glutamatkonzentration wird von Bipolarzellen (Querverschaltung) bzw. Horizontalzellen (Signalweiterleitung) mittels Glutamatrezeptoren (AMPA-/ NMDA-Rezeptoren) detektiert.

Es existieren zwei unterschiedliche Bipolarzelltypen, die ON- und OFF Bipolarzellen mit 8-12 verschiedenen Subtypen. ON-Bipolarzellen registrieren Glutamat durch metabotropen Rezeptoren. OFF-Bipolarzellen durch ionotrope Rezeptoren. Die ON/OFF-Klassifizierung fußt auf der elektrischen Reaktion der Zellen nach einem Lichtreiz. ON-Bipolarzellen depolarisieren und OFF-Bipolarzellen hyperpolarisieren bei einem Lichtreiz. Mittlerweile sind darüber hinaus noch Bipolar-Mischtypen identifiziert worden (6). Ohne Lichteinwirkung

(Dunkelzustand) sezernieren die Stäbchen und Zapfen viel Glutamat. Die ON-Bipolarzellen sind hyperpolarisiert und sezernieren nur wenig Glutamat. Durch den Lichtreiz (weniger Glutamat erreicht den Rezeptor) depolarisiert die Zellmembran der ON-Bipolarzellen und schüttet daraufhin vermehrt Glutamat an ihrer Synapse aus (16, 17, 18). Off-Bipolarzellen hingegen schütten im Dunkelzustand viel Glutamat aus. Bei einem Lichtreiz (geringere Glutamatkonzentration) hyperpolarisieren die OFF-Bipolarzellen und vermindern ihre Glutamatausschüttung (19, 20). Jeder Zapfen innerviert eine ON- oder OFF-Bipolarzelle. Stäbchen sind nur mit den ON-Bipolarzellen verbunden, die nicht direkt mit Ganglienzellen verbunden sind. Jede Stäbchenzelle ist mit 2-5 Bipolarzellen verbunden. Diese Bipolarzellen sind auf Stäbchen spezialisiert und bilden ihrerseits mit ca. 30-50 Stäbchen Kontakte aus. Die Stäbchen-ON-Bipolarzellen sind mit AII-Amakrinzellen verbunden, die wiederum untereinander und außerdem über „gap-junctions“ mit Zapfen-Bipolarzellen verbunden sind. Die Signale der Stäbchen-ON-Bipolarzellen werden über ON-Zapfen-Bipolarzellen an ON-Ganglienzellen weitergeleitet (5, 21).

Horizontalzellen reagieren außerdem durch γ -Aminobuttersäure (GABA) Ausschüttung auf einen Lichtreiz. GABA entsteht durch die Decarboxylierung von Glutamat und ist einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter. Er reguliert mit etwas Zeitverzögerung die Glutamatausschüttung. Somit wirken die Horizontalzellen lateral inhibierend auf die von den Photorezeptoren erhaltenen Signale. Dieser Effekt ist essentiell für die Lichtadaptation und Erhöhung des Bildkontrastes (22, 23). Es gibt HI und HII- Horizontalzellen. HII-Zellen werden von allen drei Zapfentypen innerviert, während HI-Zellen von Stäbchen sowie L- und M- Zapfen dendritisch angeregt werden (24, 25, 26).

Ein weiterer regulatorischer Prozess wird durch die Querverschaltung der Photorezeptoren eingeleitet. M- und L- Zapfen sind mit umliegenden Photorezeptoren über „gap-junctions“, die aus Connexinen gebildet werden, verbunden. Das Membranpotential der Synapsen wird über diese Kanäle auch von den Nachbarzellen beeinflusst (26). Zapfen interagieren mit Stäbchen über „gap-junctions“ die aus Connexin36 aufgebaut sind. Dieses Connexin ist typisch für das zentrale Nervensystem (27). Feedback-Mechanismen zwischen beiden Photorezeptoren ermöglichen das Sehen bei mesopischen Lichtverhältnissen. Hierbei wird die Öffnungswahrscheinlichkeit der Hyperpolarisations-aktivierten und durch zyklische Nukleotide-modulierten Kanäle (HCN-Kanäle) durch cAMP Bindung erhöht. Dies führt zu einer Depolarisation der Zellmembran (28).

Die von den Horizontal- und Bipolarzellen weitergeleiteten Signale werden von Amakrin- und Ganglienzelle detektiert. Amakrinzellen verschalten Bipolar- und Ganglienzellen lateral miteinander. Ihre Wirkungsweise ist sehr komplex und noch nicht vollständig erforscht, ähnelt aber jener der Horizontalzellen. Es gibt viele verschiedene Typen von Amakrinzellen, die divers interagieren und unterschiedliche Neurotransmitter wie beispielsweise GABA und Glycin sezernieren. Aufgrund ihrer Morphologie, ihren Zellfortsätzen und ihren retinalen Verzweigungsmustern unterscheidet man über 30 Subtypen (z.B.: AI und AII-Amakrinzellen). Manche von ihnen besitzen nach heutigem Kenntnisstand kein Axon, wodurch sie ihren Namen erhielten. Sie wirken ähnlich wie die Horizontalzellen inhibierend auf die Signalweiterleitung und helfen dadurch ebenfalls bei der Lichtadaptation. So bilden beispielsweise AII-Amakrinzellen chemisch inhibierende Synapsen mit OFF-Bipolarzellen und aktivierende Synapsen mit ON-Bipolarzellen aus (5, 21, 29).

Ganglienzellen erkennen das übermittelte Signal und geben es in Form von Aktionspotentialen über den Sehnerv an das Gehirn weiter. Auch hier wird zwischen ON- und OFF-Ganglienzellen unterschieden. ON-Ganglienzellen erhöhen ihre Aktivität, wenn Licht ins Zentrum ihres rezeptiven Feldes fällt. Liegt dieses Feld im Dunkeln während die Umgebung des rezeptiven Feldes erhellt ist, reduzieren sie ihre Aktivität. Bei OFF-Ganglienzellen verhält es sich genau anders herum. Sie reduzieren ihre Aktivität, wenn Licht das Zentrum trifft und die Peripherie im Dunkeln liegt, während sie ihre Aktivität erhöhen, wenn das Zentrum unbelichtet und die Umgebung erhellt ist. Die Signale werden über den Sehnerv und anschließend der Sehbahn zum visuellen Zentrum, im Occipitallappen, weiter geleitet (1, 5, 21, 29).

1.3 Die Phototransduktion

Die Umwandlung des physikalischen Lichtreizes in ein biochemisches und weitergehend elektrisches Signal ist der Prozess der Phototransduktion. Diese ersten Schritte des Sehprozesses finden in den Außensegmenten der Photorezeptoren statt. Im Folgenden wird die Phototransduktion am Beispiel Stäbchen erläutert:

1.3.1 Die Komponenten der biochemischen Phototransduktion

In den Außensegmenten variieren die Konzentrationen der beiden sekundären Botenstoffe (second messenger) zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) und Ca^{2+} je nach Lichtkonzentration. Im Dunkelzustand liegt die freie zytoplasmatische Konzentration von cGMP bei 2-5 μM . Die CNG-Kanäle der Plasmamembran haben cGMP gebunden. Durch die geöffneten CNG-Kanäle strömen monovalente (K^+ und Na^+) und divalente (Ca^{2+} und Mg^{2+}) Kationen. Außerhalb der Photorezeptoren ist die Ca^{2+} -Konzentration höher als innen, was zu einem Diffusionsgradienten in die Zelle führt. Dieser Ionenstrom wird als Dunkelstrom bezeichnet. Aufgrund des hohen Ca^{2+} -Einstroms, liegt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Dunkelzustand bei 0,2-0,8 μM . Der größte Teil des Dunkelstroms (ca. 85-90%) besteht aus Na^+ Ionen, 10-15% aus Ca^{2+} -Ionen und ein ganz geringer Anteil aus Mg^{2+} -Ionen. Neben dem CNG-Kanal befindet sich in der Plasmamembran noch ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ -Austauscher, der permanent aktiv K^+ und Ca^{2+} aus der Zelle schleust und vier Na^+ in die Zelle fließen lässt. Das Membranpotential im Dunkelzustand wird durch CNG-Kanäle und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ -Austauscher permanent zwischen -35 bis -45 mV gehalten (30, 31, 32, 33).

In den Diskmembranen des Photorezeptors sind mehrere, an der Signaltransduktion beteiligte Proteine, lokalisiert: Rhodopsin (Rho), Recoverin (Rec), Rhodopsinkinase (RK), Transducin (T), Phosphodiesterase (PDE), Guanylatzyklase (GC) und das Guanylatzyklase-aktivierende Protein (GCAP).

Rho ist das lichtsensitive Protein der Stäbchen. Es ist in die Diskmembran eingebettet. Die RK ist an die Diskmembran assoziiert und im Dunkelzustand inaktiv. Im aktiven Zustand phosphoryliert die Kinase das Rhodopsin unter Nutzung von Adenosintriphosphat (ATP). Das myristylierte Calcium-Sensor-Protein Rec bindet unter hohen Ca^{2+} -Konzentrationen zwei Ca^{2+} -Ionen. Diese Bindung führt zu einer Konformation des Proteins, in der es seine Myristylgruppe nach außen positioniert hat. Diese Myristylgruppe fungiert als Membrananker und verbindet Rec mit der Diskmembran der Stäbchen. Ebenfalls an der Diskmembran liegt das heterotrimere G-Protein Transducin (T). T besteht aus drei Untereinheiten (α , β und γ) und hat im Dunkelzustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Die Phosphodiesterase (PDE), ebenfalls bestehend aus mehreren Untereinheiten (α , β und 2γ), ist inaktiv. Ein weiteres wichtiges Protein der Signaltransduktion ist die Guanylatzyklase (GC), die einen Komplex mit dem Guanylatezyklase-aktivierenden Protein (GCAP) bildet. Bei hohen

zellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bindet das GCAP bis zu 3 Ca^{2+} -Ionen und hemmt die Guanylatzyklase, die aus GTP cGMP bildet (siehe Abbildung 4) (2, 32, 34, 35, 36).

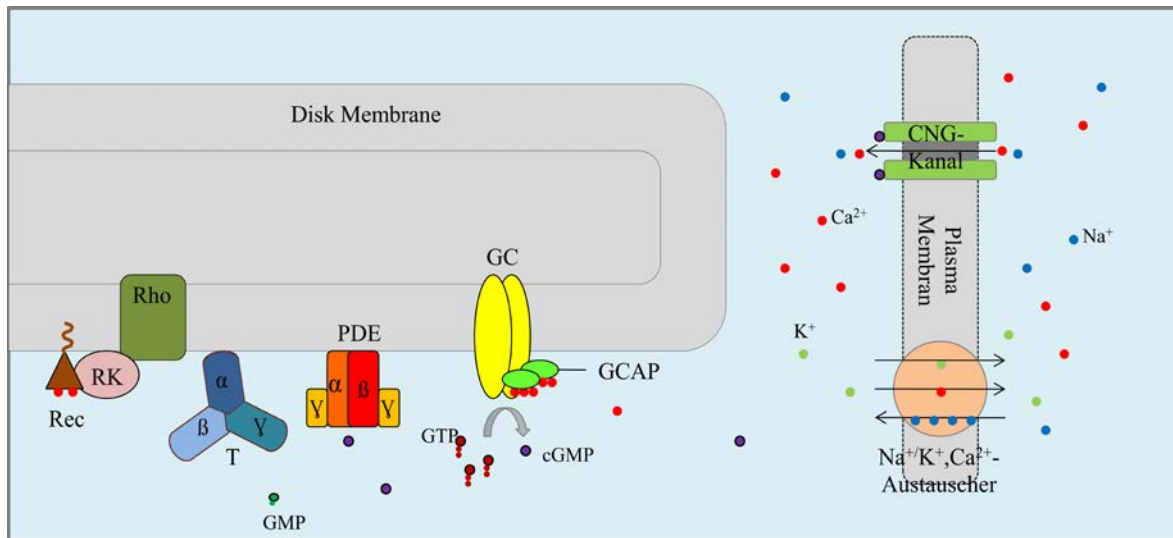


Abbildung 4: Der Dunkelzustand eines Photorezeptors (Stäbchen). Im Dunkelzustand sind die intrazellulären Konzentrationen von Ca^{2+} und cGMP hoch. Die CNG-Kanäle sind durch die Bindung mit cGMP geöffnet und sorgen für einen permanenten Einstrom von Ca^{2+} und Na^+ (Dunkelstrom). Der Na^+/K^+ , Ca^{2+} Austauscher befördert permanent ein Ca^{2+} und ein K^+ im Tausch gegen vier Na^+ aus der Zelle. Das Recoverin (Rec) bindet im Dunkelzustand zwei Ca^{2+} und bindet an die Rhosopsinkinase (RK). Das Rhodopsin (Rho) ist inaktiv. Das Transducin (T) und die Phosphodiesterase sind ebenfalls inaktiv. An die Guanylatzyklase (GC) sind die Calcium-sensitiven Guanylatzyklase-aktivierenden Proteine (GCAPs) gebunden. Die GC bildet nur in geringen Mengen cGMP.

Trifft nun Licht auf das System, werden die Photonen durch das lichtabsorbierende Pigment Rhodopsin detektiert. Rhodopsin konvertiert das physikalische Signal des Lichtreizes in ein biochemisches. Es besteht aus einem photorezeptorspezifischen Proteinmolekül Opsin und dem lichtabsorbierenden Chromophor 11-*cis* Retinal, das unter Lichteinfluss zu all-*trans* Retinal isomerisiert (siehe Abbildung 5). Die Photoaktivierung erfolgt binnen 200 fs. Durch diese Absorption werden sukzessive, energieintensive Konformationsänderungen in Gang gesetzt. Diese wandeln das Rhodopsin binnen 0,25-0,5 ms in das enzymatisch aktive Metarhodopsin II (Rho^*) um (2, 37).

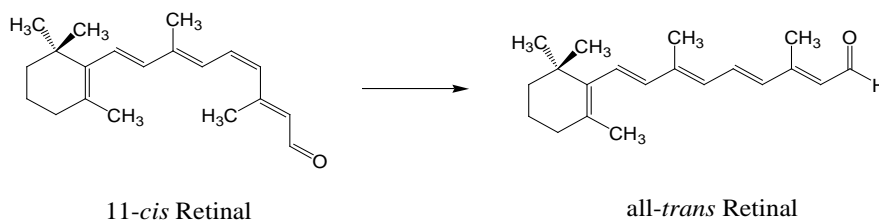


Abbildung 5: Photoisomerisierung des Retinals

Das aktivierte Rhodopsin katalysiert einen GDP/GTP Austausch am Transducin. Die α -Untereinheit des Transducin bindet das GTP und assoziiert daraufhin mit der

Phosphodiesterase. Durch Hydrolyse entsteht 5'-GMP aus cGMP. Der cGMP Spiegel der Zelle sinkt und auch das an den CNG-Kanal gebundene cGMP dissoziiert. Die Kanäle schließen und der stete Einstrom an Ca^{2+} wird unterbrochen. Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ -Austauscher ist weiterhin aktiv und pumpt Ca^{2+} aus der Zelle (siehe Abbildung 6). Somit sinkt auch die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle auf ca. 140 nM. Der verringerte Einstrom an Ca^{2+} und besonders Na^+ hat eine Hyperpolarisation der Zellmembran zur Folge. Diese Spannungsänderung wird bis zum synaptischen Terminus des Photorezeptors weitergeleitet, wo die spannungsabhängige Ausschüttung an Glutamat verringert wird. Anschließend wird das Signal über weitere Neurone bis zum visuellen Kortex weitergeleitet (1, 2, 38, 39, 40).

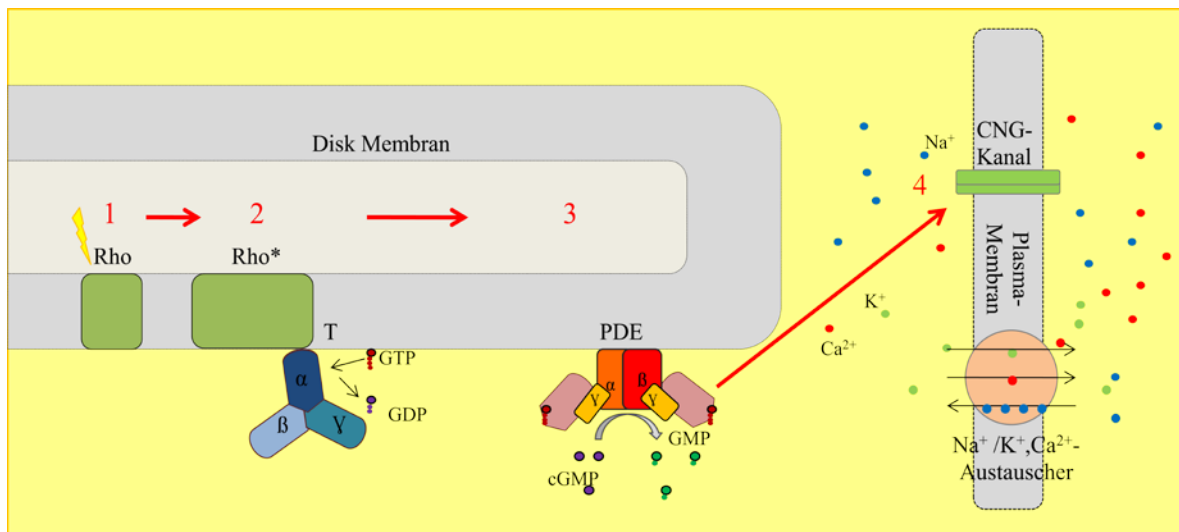


Abbildung 6: Lichtantwort des Photorezeptors (Stäbchen). Durch die Absorption der Energie eines Photons wird das Rhodopsin (Rho) „1“ in enzymatisch aktives Metarhodopsin II (Rho*) „2“ umgewandelt. Rho* katalysiert die Aktivierung des Transducins (T) durch den Austausch von GDP zu GTP. Die α -PDE hydrolysiert cGMP zu GMP „3“. Die CNG-Kanäle schließen sich im Zuge dieses verminderten cGMP-Spiegels in der Zelle. Ca^{2+} und Na^+ -Einstrom in der Zelle wird vermindert oder unterbunden „4“.

1.3.2 Die Wiederherstellung des Dunkelzustandes

Ist der Lichtreiz vorbei, muss die Konzentration der sekundären Botenstoffe im Photorezeptor wieder an den Dunkelzustand angepasst werden. Dieser Vorgang ist mindestens genauso wichtig, wie die Reaktion auf einen Lichtreiz selbst, da so sichergestellt wird, dass auf einen erneuten Lichtreiz reagiert werden kann. Ein wichtiges Protein in diesem Prozess ist die Guanylatzyklase. Durch einen Lichteinfall verringert sich die Konzentration an Ca^{2+} in der Zelle, wodurch das gebundene Ca^{2+} -Ionen vom GCAP dissoziieren. Die damit einhergehende

Konformationsänderung wirkt aktivierend auf die zuvor inhibierte GC, die nun beginnt aus GTP cGMP herzustellen. Die Konzentration an cGMP steigt, was die Öffnungswahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle erhöht. Bei geöffnetem Kanal kann Ca^{2+} in die Zelle strömen. Dieses Ca^{2+} kann wiederum an GCAP binden, wodurch das Protein eine Konformation annimmt, die inhibierend auf die GC wirkt. Die weitere Produktion an cGMP wird verringert (siehe Abbildung 7). Die Konzentrationen der sekundären Botenstoffe in den Photorezeptorzellen entspricht nun wieder denen des Dunkelzustandes (2, 41, 42, 43).

Das Zusammenspiel von GC und GCAP ist exakt aufeinander abgestimmt. Es sind bereits mehrere Mutationen beider Proteine bekannt, die mit Netzhautdegenerationen bei Patienten korrelieren. Die Mutationen stören dieses Zusammenspiel und beeinflussen daher die Wiederherstellung des cytoplasmatischen cGMP-Spiegels (siehe Abschnitt 1.4 und 1.5.3).

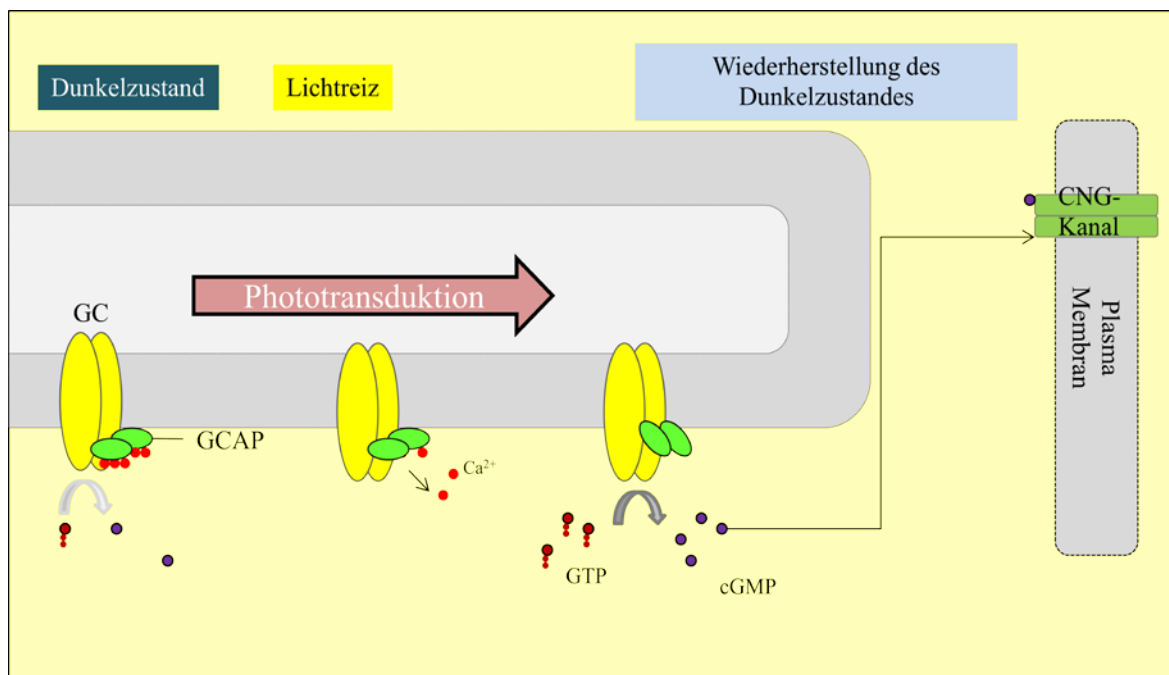


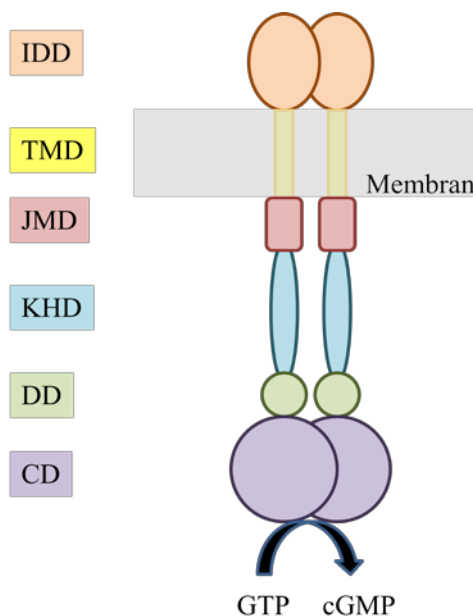
Abbildung 7: Wiederherstellung des Dunkelzustandes. Im Dunkelzustand synthetisiert die Guanylatzyklase nur eine geringe Menge an cGMP. Dieser Umsatz wird bedingt durch die inhibierende Wirkung, die das Ca^{2+} -bindende GCAP auf die GC hat. Durch die Phototransduktion verringert sich der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel, was zu einer Ca^{2+} -freien, Mg^{2+} -stabilisierten GCAP-Konformation und somit zur GC Aktivierung führt. cGMP wird aus GTP gebildet und bindet an die CNG-Kanäle. Die Öffnungswahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle steigt und Ca^{2+} kann in die Zelle strömen.

1.4 Die Guanylatzyklasen (GC)

Guanylatzyklasen (GCs) katalysieren die Umwandlung von GTP in cGMP unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes. Sie gehören zu den Lyasen. Der Mensch besitzt lösliche und membrangebundene. Die löslichen GCs werden über Stickstoffmonoxid aktiviert.

Membrangebundene GCs werden durch extrazelluläre Liganden aktiviert. Hier gibt es verschiedene Typen. GC-A und GC-B Typen werden durch Natriuretische Peptide (APN) aktiviert und GC-C Rezeptoren über Guanylin (hauptsächlich im Intestinaltrakt) (2).

Beim menschlichen Sehvorgang sind membrangebundene, retinale GCs beteiligt. Diese GCs bilden eine Unterfamilie der membrangebundenen GCs und werden nicht über extrazelluläre Liganden, sondern über Ca^{2+} moduliert und über GCAPs aktiviert. Beim Menschen wird zwischen GC-E und GC-F (veraltet: RetGC-E oder GC-1 und RetGC-F oder GC-2) unterschieden. GC-E ist in der Retina, der Nase, der Epiphyse und dem Corti-Organ vertreten, während GC-F nur in der Netzhautschicht nachgewiesen wurde (44, 45, 46). In Stäbchenzellen wird ungefähr 25-mal mehr GC-E als GC-F exprimiert (47). Die RetGC spielt eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung des Dunkelzustandes und gehört zu den sensorischen Guanylatzyklen. Alle membrangebundenen GCs bilden Dimere und sind ähnlich aufgebaut: Sie besitzen eine sehr lange, N-terminale extrazelluläre Domäne (ECD) mit anschließender sehr kurzer transmembraner Domäne (TMD), gegeben falls eine cytoplasmatischen Juxtamembrandomäne (JMD) die an eine lange intrazelluläre Domäne (ICD) anbindet, sowie einer Kinase-Homologie-Domäne (KDH), einer darauffolgenden Dimerisierungsdomäne (DD) und einer C-terminalen katalitischen Domäne (CD) (48, 49, 50).



Bis auf die RetGCs werden die membrangebundenen GCs über einen Aktivator, der an die IDD bindet, aktiviert. Bei den RetGCs binden GCAPs an die interzelluläre Seite und triggern so die Umwandlung von GTP zu cGMP unter Abspaltung eines Phosphatrestes (siehe Abbildung 8).

Abbildung 8: Schematische Darstellung einer GC; dargestellt als homologes Dimer. **IDD:** Intradiskale-Domäne; **TMD:** Transmembrane-Domäne; **JMD:** Juxtamembrandomäne; **KHD:** Kinase-Homologie-Domäne; **DD:** Dimerisierungs-Domäne; **CD:** katalytische Domäne

Die IDD oder auch ECD (extrazelluläre Domäne) ist je nach Ligand unterschiedlich aufgebaut und hat somit innerhalb der Gruppe der membrangebundenen GCs die geringsten Homologien. Allerdings liegt hier eine cysteinreiche Region, die hochkonserviert ist und Liganden-unabhängige Dimerbildung und Oligomerisierung der GCs vermittelt (51, 52, 53).

Die TMD bildet hydrophobe, α -helikale Bereiche und bettet dadurch die membrangebundenen GCs in die Membranen ein (54). In der kurzen JDM der RetGCs finden sich putative GCAP Bindestellen (55). Die KHD ist im Falle der Ret-GCs dazu fähig ATP zu binden und Mg^{2+} -abhängig Serinreste zu autophosphorylieren. Diese Kinase Aktivität ist unabhängig von der Ca^{2+} -Bindung durch das GCAP sowie der cGMP Bildung (56). Die Dimerisierungsdomäne (DD) vermittelt über amphipathische Regionen die Dimer-Bildung der GCs, welche essentiell für die Funktion der GC ist (50, 57). Die terminale, katalytische Domäne der GCs ist hoch konserviert und nahe verwandt mit der katalytischen Domäne der Adenylatcyclasen. Die Domäne katalysiert mithilfe von Mg^{2+} als Kofaktor die Dephosphorylierung und Zyklisierung von GTP zu cGMP. Ein Aminosäureaustausch von E925K und C995D würde die Substratspezifität des Enzyms von GTP zu ATP verschieben. Am C-terminalen Ende der CD befindet sich eine Bindestelle für GCAP2, das ebenfalls zur Regulation der Aktivität beiträgt, jedoch eine andere Ca^{2+} -Sensitivität aufweist (58, 59, 60, 61).

1.5 Guanylatzyklase-aktivierende Proteine (GCAPs)

Guanylatzyklase-aktivierende Proteine (GCAPs) sind die Aktivatorproteine der RetGCs (im Folgenden hGC-E oder zur Vereinfachung GC genannt). Sie können bis zu drei Ca^{2+} -Ionen bzw. bei geringen Ca^{2+} -Konzentrationen auch Mg^{2+} binden und wirken durch eine daraus resultierende Konformationsänderung regulierend auf die Guanylatzyklase (siehe Abbildung 9). Man unterscheidet zwischen einer Ca^{2+} -gebundenen Form (wirkt inhibierend auf die GC) und einer freien apo-Form (wirkt aktivierend auf die GC), die durch Mg^{2+} -Bindung stabilisiert wird (62).

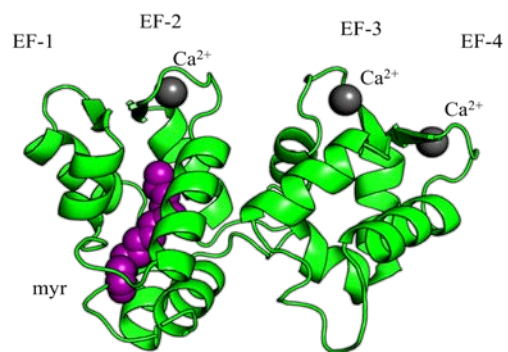


Abbildung 9: Kristallstruktur von myristyliertem GCAP1 aus Huhn. Modifiziert nach (132).

GCAPs gehören zu der Familie der NCS-Proteine (Neuronal-Calcium-Sensor Proteins). Alle NCS-Proteine leiten Ca^{2+} -abhängig Signale in neuronalen Zellen weiter. Sie sind hochspezifisch und involviert in diverse regulatorische Prozesse wie Genexpression, Ionenkanalfunktionen, Membrantransporten von Rezeptoren und Ionenkanälen. Darüber

hinaus helfen sie bei der Enzymmodulation beispielsweise bei den Kinasen der Guanylat- oder auch Adenylatzyklasen und sind beteiligt an der Kontrolle der Apoptose. Zurzeit werden fünf Subklassen (A-E) aufgrund ihrer Aminosäuresequenz unterschieden: NCS-1, VILIPs (Visinin-like Proteins), Recoverin, GCAPs und KchIPs (voltage-gated potassium channel-interacting protein). Der Mensch exprimiert insgesamt 14 von ihnen. Während die meisten NCS Proteine im gesamten neuronalen System exprimiert werden, kommt Recoverin nur in der Retina und im Pinealorgan vor. GCAPs sind nur in der Retina vertreten (63, 64, 65, 66, 67).

Es wurden bisher acht verschiedene GCAP Isoformen identifiziert. Der Mensch exprimiert drei, die meisten anderen Säugetiere nur zwei, auffällig viele besitzt der Kugelfisch mit acht Isoformen. Im Menschen finden sich die Isoformen GCAP1, GCAP2 und GCAP3. Menschliches GCAP3 findet sich nur in Zapfen, während die Isoformen GCAP1 und GCAP2 sowohl in Zapfen als auch in Stäbchen vorkommen. Die GCAP Isoformen unterscheiden sich in ihrer Ca^{2+} -Sensitivität, der katalytischen Effizienz und dem Dimerisierungsverhalten (68, 69, 70).

1.5.1 Interaktion mit der GC

Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen wirkt das GCAP aktivierend auf die GC-Aktivität, sodass die GC GTP in cGMP umwandelt. Bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen wirkt die Konformation des GCAPs jedoch inhibierend. Die GC-Dimere sind in bovinen Stäbchen mit ca. 6 μM vertreten. GCAP1 und GCAP2 werden in ähnlichen Mengen (ca. 3 μM) exprimiert. Beide Formen binden wahrscheinlich an unterschiedliche Stellen der GC (71). Bei *in vivo* Experimenten mit GCAP1/GCAP2 knockout Mäusen regulieren GCAP1 und GCAP2 die GC-E, während die GC-F nur von GCAP2 aktiviert, bzw. inhibiert wird. *In vitro* Experimente zeigen jedoch auch eine GC-F Aktivierung durch GCAP1 (47, 69, 72, 73). GCAP2 dimerisiert in Ca^{2+} -freier Form und verstärkt als Dimer die GC-Dimere. GCAP1 zeigt keine Ca^{2+} -abhängige Dimerisierung (74, 75, 76, 77). Die IC_{50} -Werte (Ca^{2+} -Konzentration bei der die GC-Aktivität halbmaximal ist) von bovinem GCAP1 und GCAP2 liegen bei 707 nM bzw. 100 nM. Diese Werte können je nach vorliegenden Mg^{2+} -Konzentrationen variieren (71). Aufgrund dieser unterschiedlichen IC_{50} -Werte, entstand das „ Ca^{2+} -relay“ Modell, das die Aktivierung der GC in den Photorezeptorzellen beschreibt (siehe Abbildung 10). Im Dunkelzustand sind in den Photorezeptorzellen 0,2-0,8 μM Ca^{2+} nachgewiesen worden. Bei

diesen hohen Ca^{2+} -Konzentrationen inhibieren sowohl GCAP1 als auch GCAP2 die GC. Trifft nun Licht auf die Retina sinkt dieser intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel. GCAP1 aktiviert die GC schon bei geringen Lichtintensitäten, während GCAP2 erst bei starkem Lichteinfall und sehr geringer Ca^{2+} -Konzentration die GC aktiviert. So kann das GCAP/GC-System, je nach Lichteinfall Einfluss auf die intrazelluläre cGMP-Konzentration nehmen (78, 79, 80).

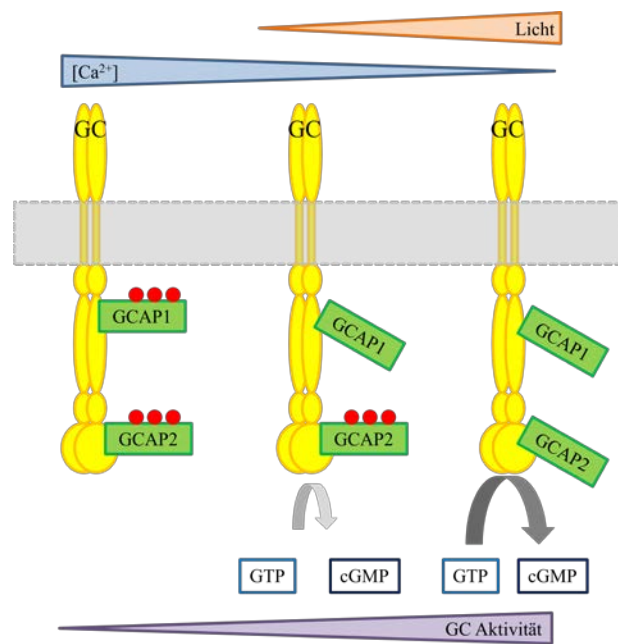


Abbildung 10: Schematische Darstellung des „Ca²⁺-relay“ Modells. Ohne Lichtreiz ist die Ca^{2+} Konzentration in der Zelle hoch. Die GCAPs binden drei Ca^{2+} Ionen. Sinkt der Ca^{2+} Spiegel dissoziieren zuerst die Ca^{2+} des niederaffinen GCAP1. Die wird die GC aktiviert und bildet cGMP aus GTP. Sinkt der Ca^{2+} Spiegel weiter, dissoziieren auch die Ca^{2+} Ionen des hochaffinen GCAP2. Die GC hat ihre maximale Aktivität erreicht (81).

Die physiologischen Messungen an transgenen Mäusen unterstützen diese Theorie. Wurde GCAP1 in GCAP1/GCAP2 knockout Mäusen exprimiert, konnte eine normale

Lichtantwort gemessen werden. Wurde jedoch GCAP2 in GCAP1/GCAP2 knockout Mäusen exprimiert, kam es zu einer deutlich langsameren Lichtantwort. Auch die Tatsache, dass von GCAP2 nur eine, bei GCAP1 hingegen 12 bekannte Mutation als Auslöser einer erblich bedingten retinalen Erkrankung identifiziert wurden, unterstützt das „Ca²⁺-relay Modell“. Solange das GCAP1 normal exprimiert wird, sind Lichtantworten des Photorezeptors normal möglich (81).

1.5.2 Struktur

GCAPs sind 20-24 kDa und 201-203 Aminosäuren groß. GCAP1 und GCAP2 sind jedoch nur zu 49 % identisch in ihrer Aminosäuresequenz. GCAP1 besitzt drei Tryptophane (an Position 24, 51 und 94). Die Fluoreszenz der drei Tryptophane kann angeregt werden, was unter anderem zur Beobachtung von Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderungen genutzt werden kann (siehe 3.9.2). Alle GCAPs können N-terminal-acyliert, genauer gesagt überwiegend myristyliert werden. Die Myristinsäure ist eingebettet in eine Tasche, die aus beiden Enden (N- und C-Terminus) des Proteins gebildet wird. Durch die Bindung von Ca^{2+} verändert sich die Konformation des GCAPs. Die Lage der Myristinsäure wird im Zuge dieser Konformationsänderung ebenfalls leicht verändert. Beim Recoverin ist der sogenannte „Ca²⁺-

Myristoyl-Switch“ bekannt. Hierbei erfolgt eine Exponierung der Myristinsäure bei Ca^{2+} Bindung des Proteins. Hat das Recoverin kein Ca^{2+} gebunden, ist die Myristinsäure in eine hydrophobe Proteintasche eingebettet. Die Myristinsäure fungiert als Membrananker bei hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen für das Recoverin. Ein „ Ca^{2+} -Myristoyl-Switch“ konnte bei den GCAP-Formen nicht gezeigt werden, ebenso ist die Myristinsäure auch nicht an einer Membranverankerung des Proteins beteiligt. Jedoch erhöht die Myristylierung von bGCAP1 und bGCAP2 deren Stabilität unter bestimmten Bedingungen. Bei bGCAP1 wird durch die Myristylierung die Ca^{2+} -Sensitivität der GC-Regulierung (IC_{50} -Wert) erhöht und verschiebt diese in einen physiologischen Bereich. Beim bGCAP2 hat die Myristylierung keinen Einfluss auf den IC_{50} -Wert. Auch verstärkt die Myristinsäure nur bei bGCAP1 die apparente GC-Affinität (EC_{50} -Wert). Der Effekt ist auch bei der katalytischen Effizienz der GC-E zu beobachten, welche durch myristyliertes (myr) bGCAP1, jedoch nicht durch myr bGCAP2, erhöht wird (67, 82, 83, 84).

GCAPs besitzen vier EF-Hände, deren Aminosäuresequenz über die Hälfte der Aminosäuren des gesamten Proteins ausmachen. EF-Hände sind Ca^{2+} -Bindemotive mit einer Helix-Loop-Helix-Struktur. Sie können Ca^{2+} -Ionen aber auch Mg^{2+} -Ionen binden, wodurch das Protein eine Konformationsänderung durchläuft. Jede EF-Hand hat eine spezifische Affinität zu Ca^{2+} . Die EF-Hände 1 und 2 bilden mit dem N-Terminus eine Proteindomäne, die EF-Hände 3 und 4 mit dem C-Terminus bilden eine zweite (siehe Abbildung 9). Die EF-Hände 2-4 sind funktionell und können Ca^{2+} -Ionen binden. Die erste EF-Hand kann kein Ca^{2+} binden, sie liegt in der Region in der GCAP1 mit der GC-E interagiert. Eine EF-Hand besteht aus 29 hochkonservierten Aminosäuren, auf die Loopstruktur fallen hiervon 9. Mehrere Sauerstoffatome von fünf verschiedenen Aminosäuren der EF-Hand binden ein Ca^{2+} -Ion in bipyramidal pentagonaler Koordinierung. Dabei verändern sie ihre räumliche Struktur und wirken so auf die Konformation des Proteins ein. Diese Konformationsänderung ist reversibel und Ca^{2+} -abhängig zu beobachten (67, 75, 86, 87).

Peshenko et al. (2012) vermuten aufgrund ihrer Beobachtungen, dass die Ca^{2+} -Bindung der EF-Hand 4 nicht nur eine Konformationsänderung des Proteins initiiert, sondern diese Information über die Myristinsäure weiter an die EF-Hand 1 gegeben wird. Anschließend wird die Information auf die GC übertragen.

In ihrer Veröffentlichung benennen sie diese Verbindung als „Calcium-Myristoyl-Tug“ (siehe Abbildung 11). Sie führten GC-Affinitätsstudien (siehe 3.11.3) und Ca^{2+} -Sensitivitätsstudien (siehe 3.11.2) des WT GCAP1 Proteins sowie der Einzelmutanten L80F, L176F, V180F und der Dreier-Mutante L80F/L176F/V180F durch, um die Rollen der drei Aminosäuren bei dem „Calcium-Myristoyl-Tug“ herauszuarbeiten. Die Aminosäuren Leu⁸⁰ und Val¹⁸⁰ liegen an den beiden Enden der Myristinsäuretasche.

Peshenko et al. (2012) fanden heraus, dass der Aminosäureaustausch an diesen Positionen nur minimal die Regulation der GC durch GCAP1 beeinflusst. Die Mutation L176F liegt in der Myristinsäuretasche. L176F verstärkte jedoch die GC-Affinität sowohl mit der

myristylierten, als auch mit der nicht myristylierten Form. Außerdem verminderte sich die Ca^{2+} -abhängige GC-Regulierung bei der Mutante L176F. Für Peshenko et al. (2012) diente die Mutante dazu einzelne Aminosäuren in der Myristinsäuretasche und deren Funktion zu untersuchen. Die Mutante L176F des GCAP1 konnte 2015 tatsächlich aus Patienten mit Makula-Dystrophie (siehe Abschnitt 1.5.1) isoliert werden (siehe Anhang: Vocke et al., 2016), (88). Die weiteren Auswirkungen der Mutation des GUCA1-Gens werden in dieser Arbeit erläutert.

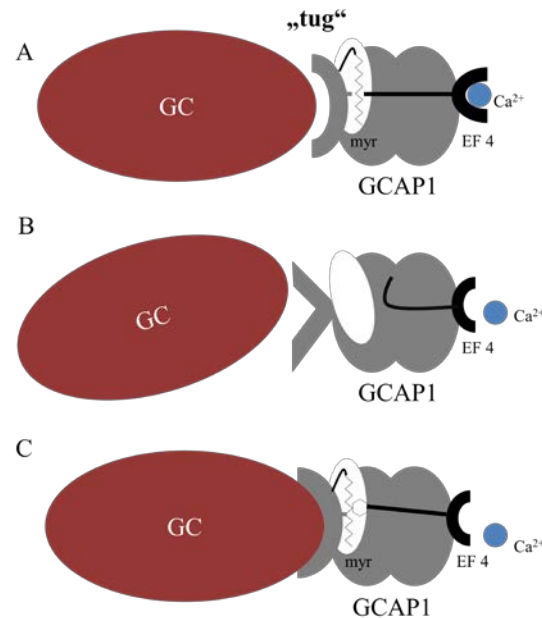


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Calcium-Myristoyl-Tug. A: voll ausgebildeter Calcium-Myristoyl-Tug. Durch Ca^{2+} Bindung der EF-Hand 4 wird die Myristoyl-gruppe in der Tasche fixiert. Die Affinität zur GC wird vermittelt. B: Durch Verringerung der Hydrophobizität in der Myristinsäuretasche sinkt die Affinität der EF-Hand 4 zu Ca^{2+} wie jene zum Targetprotein. C: Durch Erhöhung der Hydrophobizität ist die Affinität zu Ca^{2+} herabgesetzt, die Anbindung an die GC jedoch verstärkt. Modifiziert aus (88).

1.5.3 GCAP Mutanten

Viele erbliche, retinale Krankheiten wie Retinitis pigmentosa (RP) oder Leber'sche kongenitale Amaurose (LCA) werden durch Mutationen in Proteinen der Signaltransduktion hervorgerufen.

Bisher ist nur eine Mutation im GCAP2 kodierenden Gen festgestellt worden, die eine Erbkrankheit (autosomal dominante RP) hervorruft. Beim GCAP1 Protein sind hingegen 12 Mutationen, die zu einer retinalen Erkrankung führen, identifiziert worden. Mutationen im GCAP1-Gen (GUCA1A) können beispielsweise Zapfen-Dystrophien (CD), Zapfen- und Stäbchen-Dystrophien (CORD) oder Makula-Degeneration (MD) hervorrufen. Die meisten Punktmutationen, die zu Krankheiten führen, liegen in der Nähe der EF-Hände 3 und 4 des GCAP1. Sie beeinträchtigen die Ca^{2+} -sensorischen Eigenschaften des GCAPs und verschieben die GC-Aktivität zu höheren Ca^{2+} -Konzentrationen (höhere IC_{50} -Werte). Daraus resultieren abnormale cGMP-Konzentrationen, die wiederum das Ca^{2+} -Gleichgewicht durch Veränderung der Öffnungswahrscheinlichkeit für die CNG Kanäle entscheidend beeinflussen und somit die ganze Homöostase der cGMP- und Ca^{2+} -Konzentrationen stören können. Dies kann den Zelltod des Photorezeptors hervorrufen (89, 90, 91).

Die Krankheiten CD und CORD werden meist autosomal dominant vererbt. Zu den Symptomen zählen abweichendes Farbsehen, eine Verringerung der Sehschärfe, Photophobie, sowie eine Veränderung der Makula (zu sehen in einer Fundus-Aufnahme). Bei CORD ist neben dem Zapfen-vermittelten Sehen auch das Stäbchen-vermittelte Sehen durch Verlust der Photorezeptoren beeinflusst (92, 93). Bisher wurden mehrere Punktmutationen des GUCA1A-Gens identifiziert, die in Patienten mit diesen Krankheiten vorkommen (siehe Abbildung 12):

Tabelle 1: GCAP1 Mutanten und ihre Dystrophien

Mutante	Retinale Degeneration
P50L	CD/ CORD
L84F	CD/ CORD/ MD
E89K	CORD
Y99C	CD/ CORD/ MD
D100E/G	CORD
N104K	CORD
I107T	CD/ CORD/ MD
N143NT	CORD
L151F	CD/ CORD
E155G	CD
G159V	CD
L176F	CD/ MD

CD: Zapfen-Dystrophie,

CORD: Stäbchen-Zapfen-Dystrophie,

MD: Makula-Dystrophie

Die Mutante P50L senkt die thermische Stabilität von GCAP1 und die Resistenz gegenüber einer Trypsin-Proteolyse. Sie wirkt nicht direkt auf die Ca^{2+} -Sensitivität, bildet damit aber eher die Ausnahme (94). Die anderen aufgezählten Mutationen aus Tabelle 1 liegen in oder in der Nähe der dritten oder vierten EF-Hand des Proteins. Sie führen alle zu einer Veränderung der Ca^{2+} -Sensitivität des GCAPs und verändern damit auch die Ca^{2+} -abhängige cGMP-Produktion der GC. Die Mutation Y99C liegt beispielsweise in der α -Helix der dritten EF-Hand. Die Mutation stört die Ca^{2+} -sensorischen Eigenschaften des GCAP1, sodass die GC erst bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen inhibiert wird. Dies führt bei Mäusen mit der Mutation Y99C schon nach wenigen Monaten zur Photorezeptor-Degeneration (95, 96, 97). Die Mutationen N104K und E155G verändern nicht nur die Ca^{2+} -Affinität. Sie haben außerdem einen negativen Einfluss auf die Affinität von GCAP1 zur GC. Dies wird in Form des EC_{50} -Wertes (halbmaximale GCAP-Konzentration, die notwendig ist zur Aktivierung der GC) ausgedrückt (98, 99, 100). Die Aminosäuren D100, L151 und G159 sind für den strukturellen Aufbau sowie der Ca^{2+} -Koordination des Proteins essentiell. Die Mutationen D100E/G und L151F behindern die Ca^{2+} -Koordination. Die Mutante G159V hat einen negativen Einfluss auf die helikalen Strukturen der EF-Hand und damit auf die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des GCAP1. Bei der Mutation E89K handelt es sich um eine

Austausch-Reaktion von saurer mit basischer Aminosäure an der Oberfläche des Proteins, was zu einer direkten Ladungsverschiebung führt (97, 101, 102, 103, 104).

Trotz dieser unterschiedlichen primären Einwirkungen der Mutationen, behindern sie doch schlussendlich alle die Ca^{2+} -Affinität des GC/GCAP-Komplexes.

1.5.3.1 Die GCAP1 Mutante L176F

Bisher ist über die GCAP1-Mutante L176F noch nicht viel bekannt. Peshenko et al. (2012) untersuchten schon erste Auswirkungen dieser Mutation, da die veränderten Eigenschaften dieser und anderer Punktmutationen des GCAP1 die von ihnen postulierte Hypothese des „ Ca^{2+} -Myristoyl-Tug“ unterstützten. Gerade diese Position hatte sich als wichtig für die Interaktion mit der Myristinsäure herausgestellt (siehe Abbildung 11; Abschnitt 1.5.2). Durch den Austausch von Leucin mit Phenylalanin an Position 176 wurde die Hydrophobizität erhöht, was in experimentellen Vergleichen zu einer stärkeren Affinität des GCAPs zur GC aber einer verminderten Ca^{2+} -Sensitivität führte (88). Auffällig ist vor allem die Position der Mutation. Wie schon erwähnt sind die meisten Mutationen um die EF Hände 3 und 4. Die Mutation L176F liegt allerdings außerhalb der EF Hände, am C-Terminus (siehe Abbildung 12).

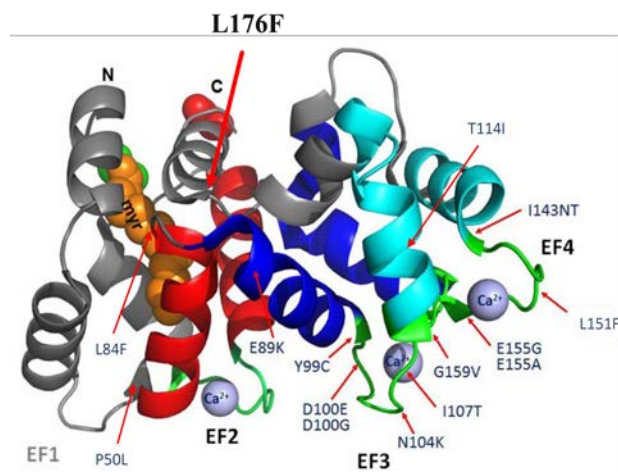


Abbildung 12: Bekannte GCAP1 Mutationen.
Modifiziert nach dem Mausmodell von Liang et al. (141).

Klinisch wurde diese Mutante bisher noch nicht beschrieben. Nicole Weißschuh und ihre Kollegen aus Tübingen identifizierten die Mutation im *GUCA1A* Gen an Position c.526C>T in drei verschiedenen Familien, deren Mitglieder an Makularer-Dystrophie (MD) und teilweise auch an Zapfen-Dystrophie (CD) leiden. Der jüngste Patient ist 44 Jahre alt. Die Mutation wurde durch Sanger Sequenzierung (Familie 1), Panel-based Next-Generation-Sequenzierung (Familie 2) und gesamter Exome-Sequenzierung des *GUCA1A* Gens in drei Familien identifiziert. Weitere Mutationen die MD oder CD hervorrufen wurden mittels ASPER-Chips und bzw. oder Sanger Sequenzierung ausgeschlossen. L176F wird autosomal, dominant vererbt (siehe Abbildung 13).

Alle Patienten zeigen einen parazentralen und zentralen Scotomas in 30° des Visuellen Feldes. Das skotopische Standard-Ganzfeld-ERG (Elektroretinogramm) zeigte normale Amplituden und Zeiten mit Ausnahme von Patient II.1 aus Familie 3. Bei diesem Patienten zeigten sich beim oculus sinister (OS) skotopisch geringe Amplituden. Beim photopischen Ganzfeld-ERG zeigten die Familien 2 und 3 geringere Signalamplituden. Multifocale ERGs wurden nur bei Familie 2 und 3 aufgenommen. Sie zeigen, dass im Bereich der Makula die Signalamplituden reduziert sind. Im peripheren Raum zeigte nur ein Patient (Patient II:1 aus Familie 3; siehe Anhang: Vocke et al. 2016) eine geringe Schwächung des Signals, alle anderen wiesen hier keine Veränderung auf. Die aufgenommenen Fundus-Daten der Erkrankten zeigten typische Makula-Anomalien. Außerdem konnte bei den darauf untersuchten Familien (1 und 2) eine verringerte Dicke der ONL-Schicht nachgewiesen werden (siehe Anhang: Vocke et al, 2016).

Dass die GCAP1 Mutation L176F Makula-Dystrophie hervorruft, obwohl ihre Lage nicht gleich darauf schließen lässt, ist für diese Arbeit von besonderem Interesse.

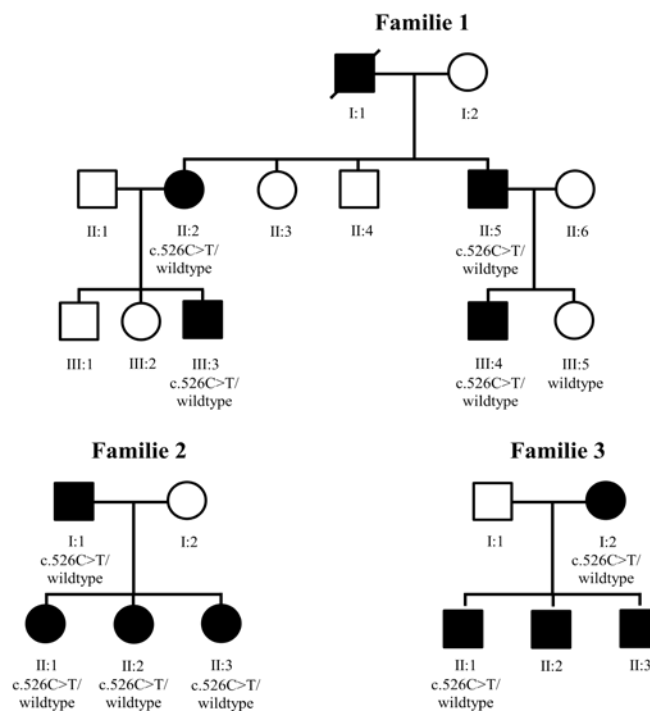


Abbildung 13: Stammbaum der von L176F Mutante betroffenen Familien.

Die Mutation c.526C>T bewirkt den AS Austausch an Position 176. Sie wird autosomal dominant vererbt

1.5.3.2 Die GCAP1 Mutante D100E

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung von Nanopartikeln auf die Funktionalität von WT GCAP1 und der GCAP1-Mutante D100E.

D100E ist eine weitere Mutante des GCAP1, welche Zapfen-Dystrophie hervorruft. Bei dieser Krankheit degenerieren nur Zapfen, was meistens zu einer zentralen, aber geringen retinalen Degeneration führt. Die genaue biochemische Charakterisierung wurde unter anderem in den Veröffentlichungen von Dell'Orco et al. (2014) und Kitiratschky et al. (2009) vorgenommen. D100E zeigt bei Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration einen Ca^{2+} -shift wie der WT. Durch die Analyse der Tryptophan-Fluoreszenz wurden Abweichungen in der Konformationsänderung, um den Bereich des Tryptophan 94 deutlich (siehe 3.9.2). Der EC_{50} -Wert ist ein Maß für die Affinität des Proteins zu seinem Target, der GC. In der Arbeit von Kitiratschky et al. wurde die Affinität zu der bovinen GC bestimmt, die sich nicht auffällig von dem WT unterscheidet (WT: $1,37 \pm 0,17 \mu\text{M}$ / D100E: $1,27 \pm 0,15 \mu\text{M}$). Die Ca^{2+} -abhängige GC-Aktivität der Mutante D100E weicht hingegen stark von dem WT ab. Die Mutante braucht eine ca. 30-fach höhere Ca^{2+} -Konzentration als der WT (WT: $0,78 \pm 0,2 \mu\text{M}$ / D100E: $21,94 \pm 1,3 \mu\text{M}$) um die GC zu inhibieren (104, 105).

1.6 Nanopartikel

Eine sehr viel versprechende Technologie auf dem Weg der Heilung verschiedenster Krankheiten ist die Nanomedizin. Sie gilt als eine der Schlüsseltechnologien unseres Jahrhunderts. Ihre Anfänge fand die Nanopartikeltechnologie durch die Entdeckung der Fullerene durch Kroto, Smalley und Curl, welchen 1985 der Nobelpreis für Chemie erhielten, sowie durch die Entwicklung des Scanning Tunneling Microscope durch Binnig und Rohrer denen ein Jahr später zusammen mit Ruska der Nobelpreis für Physik verliehen wurde (106, 107, 108, 109).

Nanopartikel sind laut Definition nur ein Milliardstel Millimeter groß. Durch ihre geringe Größe steigt ihre relative Oberfläche stark an. Somit erhöht sich auch der Anteil an Oberflächenatome im Gegensatz zu den Gesamtatomen, was als *Oberflächeneffekt* bezeichnet wird. Viele biologische und chemische Reaktionen finden an Oberflächen statt, wofür die Nanopartikel mit ihren verhältnismäßig großen Oberflächen sehr aktive Katalysatoren

darstellen. Neben dem Oberflächeneffekt besitzen Nanopartikel auch einen sogenannten *Volumeneffekt*. Die Gitterstruktur, die größere Festkörper annehmen, besitzt ein ganz spezielles Energieniveau aufgrund der elektronischen Struktur. Bei Nanomaterialien sind nur wenige Atome aggregiert. Die Zahl der Oberflächenatome ist größer und somit auch die Zahl an freien Elektronen an der Oberfläche, da diese Atome nicht im Gitter voll gebunden sind. In größeren Festkörpern ist die Zahl an Oberflächenelektronen sehr gering, wodurch annäherungsweise ein kontinuierliches Energieniveau entsteht. Bei Nanopartikeln ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Es gibt klare Abstände zwischen den einzelnen Energieniveaus, was als Volumeneffekt bezeichnet wird und starke Einwirkungen auf das Reaktionsverhalten hat. Aufgrund der geringen Größe und dem damit einhergehenden Oberflächen- und Volumeneffekt von Nanopartikeln können Materialeigenschaften wie Magnetismus oder Optoelektronik abweichen (106,107).

In der Medizin werden Nanopartikel aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften in unterschiedlichsten Anwendungsbereichen eingesetzt. So sind sie zum Beispiel sehr reaktiv, haben oft eine hohe Bioverfügbarkeit, sind gut löslich und können biologische Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Allerdings sind die Studien auf diesem Gebiet noch recht jung und viele Nachteile und Nebenwirkungen sind noch nicht erkannt und ausgearbeitet worden. Auch sind die Risiken und Langzeitschäden für Mensch und Umwelt noch ungewiss (106, 107, 108, 111, 112, 113, 114). Die heutige Nanomedizin hat viele Facetten für die unterschiedlichsten Einsatzgebiete: polymere Nanoverbundwerkstoffe, magnetische Nanopartikel, Quantenpunkte (Halbleiter, deren elektronische Eigenschaften je nach Größe und Form des ausgebildeten Kristalls variieren), Kohlenstoff-Nanomaterialien (wie Fullerene), Dendrimere, Nanoschalen, Liposomen, Mizellen und Nanofüllstoffe (107, 110, 115, 116). Besonders im Bereich der Tumorthherapie bietet das entwickelte Wirkstoff-Transport-System (Drug-Delivery-System) viele Vorteile gegenüber der bisher angewendeten Chemotherapie. So können durch Nanopartikel geringere Mengen des Wirkstoffes eingesetzt und direkt an den Wirkungsort transportiert werden, wo dieser dann gezielt angereichert wird. Durch die eingesetzte Menge reduzieren sich die Toxizität und folglich auch die Nebenwirkungen des Wirkstoffes für den Patienten. Auch die ausgeschiedene Menge ist gesundheitlich unbedenklicher, was den Magen-Darm-Trakt und die Umwelt schont. Ein hohes Risiko ist aber, dass das Transportmittel selbst toxisch sein oder unerwünschte Nebenwirkungen haben könnte (117).

In der Bekämpfung von retinalen Erkrankungen wie Makula-Degeneration scheinen vor allem Nano-Ceroxide erfolgsversprechend. Hier wurden schon erste Tests in Mäusen durchgeführt, die keine toxischen Nebenwirkungen zeigten. Sie werden mit einer dünnen Fettsäureschicht überzogen und wirken so zusätzlich als Antioxidantien. Sie werden zurzeit zur Behandlung von traumatischen Hirnverletzungen, Alzheimerbehandlungen und sogar bei Herzstillstand eingesetzt (118, 119, 120).

1.6.1 CaF₂-Nanopartikel

Nanoskopische Metallfluoride haben eine hohe katalytische Aktivität und sind in vielen Systemen lange beständig. Aus diesem Grund werden sie häufig als Katalysatoren eingesetzt. Metallfluoride wie MgF₂ und CaF₂ besitzen einen geringeren Brechungsindex als unbehandeltes Fensterglas und wirken so antireflektierend. CaF₂ ist darüber hinaus noch sehr abriebfest, weswegen es als Beschichtung von Brillengläsern, aber auch in der Laser- und Solartechnik eingesetzt wird. Die CaF₂-Nanopartikel Synthese ist sehr kostengünstig, außerdem können die Partikel bis zu einer Konzentration von 16 mg/ml in wässriger Lösung aufgenommen werden (115).

In dieser Arbeit wurden CaF₂-Nanopartikel auf deren Fähigkeit als Wirkstoff-Transport-System für GCAPs untersucht. Da GCAPs Ca²⁺-Sensormoleküle sind, wurde vermutet, dass die Proteine an die Oberfläche der Nanopartikel anheften und anschließend durch die Membran an den Ort des Bedarfes transportiert werden können. Die Assoziation sowie die Dissoziation von Calmodulin an CaF₂-Partikel konnte bereits nachgewiesen werden (121). Die CaF₂-Partikel werden aufgrund ihrer Größe nicht von der Zellmembran zurückgehalten und können so, beladen mit den GCAP Proteinen, in die Zelle eindringen.

2. Zielsetzung

Diese Doktorarbeit hat zwei Zielsetzungen.

Ein Ziel dieser Doktorarbeit ist die biochemische Analyse der GCAP1 Mutante L176F. Die Mutante wurde 2014 in Tübingen durch das Team von Nicole Weißschuh in Patienten mit Makula-Dystrophie entdeckt. Um wirkungsvolle Therapieansätze zu entwickeln, ist es nötig, die molekularen Ursachen und Konsequenzen von L176F zu untersuchen. L176F wurde bisher nur zur Überprüfung eines „Ca²⁺-Myristoyl-Tug“ Modells im GCAP1 von Peshenko et al. (2012) hergestellt und untersucht. Sie veröffentlichten Studien zur apparenten GC-Affinität (EC₅₀-Assay) sowie zur Ca²⁺-Sensitivität (IC₅₀-Assay) der 2012 noch nicht im Patienten nachgewiesenen GCAP1-Mutante L176F. Ziel dieser Arbeit ist, die Ergebnisse von Peshenko et al. 2012 zu überprüfen sowie L176F weiter zu charakterisieren. Studien wie Ca²⁺-shift Assay, Tryptophan Assay sowie Chelator-Assay sollen Aufschluss über die Ca²⁺-abhängige Konformation der Mutante geben. Die erhaltenen biochemischen Analysen sollen in Zusammenhang mit den klinischen Befunden gebracht werden, um die Auswirkungen der Mutation auf die Photorezeptorzelle besser zu verstehen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob CaF₂-Nanopartikel sich als Wirkstoff-Transport System für das Ca²⁺-Bindeprotein GCAP1 bzw. der GCAP1-Mutante D100E eignet. Nanopartikel werden häufig zur Therapie von Krankheiten eingesetzt, da sie Wirkstoffe effizient an den Ort des Bedarfs liefern können und Nebenwirkungen gering halten. Um CaF₂ als Wirkstoff-Transporter für GCAP1 einsetzen zu können, sind mögliche Auswirkungen der Nanopartikel vorher zu prüfen. In dieser Arbeit wird daher der Einfluss der CaF₂-Nanopartikel auf ein Zellsystem (HEK-293 Zellen), das GCAP1 und die GC untersucht. Hierfür wurden unter anderem Zellversuche und immunochemische Nachweise genutzt. Mithilfe einer Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) sollte die Stöchiometrie der Bindung von Protein und Nanopartikel untersucht werden. Außerdem sollte herausgearbeitet werden, ob die CaF₂-Partikel die Funktionalität des GC/GCAP1-Komplexes (IC₅₀-Assay) beeinträchtigen oder aber einen Einfluss auf die apparente Affinität von GCAP zur GC (EC₅₀-Assay) haben. Die Mutante D100E wurde aufgrund ihrer geringen Ca²⁺-Sensitivität ebenfalls untersucht. Unterschiede zwischen D100E und dem WT GCAP1 sollten Hinweise auf die Protein-Bindung an CaF₂ liefern. Würde sich ein CaF₂-Partikel basierender Wirkstoff-Transport biochemisch als umsetzbar erweisen, könnten weiterführende Versuche die physiologischen Auswirkungen in einem Tiersystem untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Name	Firma	Sitz
Agarosegel- elektrophoreseinheit	Consort Electrophoresis	E835 Consort	Turnhout, Belgien
Autoklav	V-150	Systemek GmbH	
Brutschank (<i>E. coli</i>)	BBC METRAWATT GTRO214	GOERZ Memmert	Schwabach, Deutschland
Feinwaage	ALC-2104 Acculab	Sartorius group	Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz Photometer	Bryte Box	Photon Technology International	Birmingham, England
Motor Driver	MD-5020	Photon Technology International	Birmingham, England
Lampe	Lamp Power Supply	Photon Technology International	Birmingham, England
Software	pTI Felix 32	Photon Technology International	Birmingham, England
Fotometer	Food ALYT	Omnilab	Bremen, Deutschland
FPLC	Äkta FPLC Biosciences	Amersham GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
Programm	Unicorn 5.01 Biosciences	Amersham GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
AEC-Säule	HiLoad 26/10 Q-Sepharose High Performance	GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
SEC-Säule	HiLoad 26/60 Superdex 75	GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
Geldokumentation	Alpha Innotech	Biozym	Oldendorf, Deutschland

Gerät	Name	Firma	Sitz
HPLC	EliteLAChrome	VWR Hitachi	Hannover, Deutschland
Software	EZChrom Elite	VWR Hitachi	Hannover, Deutschland
Lyophilisator	Lyovac GT2	Leybold-Heraeus	Dresden, Deutschland
Schüttler	Infors HT Mutitron	Infors HT	Bottmingen, Schweiz
Standzentrifugen			
I	Heraeus Biofuge PrinnoR Centrifuge	Thermo Electron Corporation	München, Deutschland
II	Avanti®J-E centrifuge	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
III	Heraeus Biofuge stratos	Thermo Electron Corporation	München, Deutschland
Thermocycler	T3000 Thermocycler	Biometra	Göttingen, Deutschland
Tischzentrifugen			
I	Centrifuge 5415D	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
II	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Electron Corporation	München, Deutschland
große Ultrazentrifuge	Sorvall WX Ultra 90	Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
Buckets	Sorvall P/N79388	Surespin™ Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
Rotor	Sorvall Surespin™ 630	Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
kleine Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery M120 SE	Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
Rotoren	Sorvall S100AT3; S100AT4; S45A; S52ST	Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
Wasserbad	WNB 14+M00	Memmert	Schwabach, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Name	Firma	Sitz
Dialyseschlauch	Visking dialysis tubing 12-16 kDa	VWR	Radnor, USA
Falcontubes	Falcontubes 15 ml/50 ml	Sarstedt	Nurnbrecht, Deutschland
Filtriergefäße 50 ml	Pierce Concentrators 9K (MWCO)	Thermo	Rockford, USA
Filtriergefäße	Ultrafree Centrifugal Filters	Millipore	Billerica, USA
Küvetten	Quarzglas SUPRASIL	Hellma	Müllheim, Deutschland
	Q-VETTES Halbmikro	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Spitzen	Pipettenspitzen	Sarstedt	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße	300 µl, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt	Sarstedt, Deutschland
Westernblot	Gel-Blotting Papiere	Roth	Karlsruhe, Deutschland
	Hyperfilm™	Amersham bioscience	
	Immunoblot PVDF-Membran	Bio-Rad	München, Deutschland
	Kodak GBX Developer/replenisher	Sigma	München, Deutschland
	Kodak GBX Enhancer	Sigma	München, Deutschland

3.3 Chemikalien

Zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet. Falls sterile Lösungen notwendig waren, wurden die Puffer vor Gebrauch bei 121°C für 20 min autoklaviert. Die genaue Zusammensetzung der Puffer wird bei der zugehörigen Methode aufgeführt.

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Firma	Sitz
Acrylamid-Bis (40%)	VWR	Darmstadt, Deutschland
Agarose	Serva	Mannheim, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ampicilin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid Dihydrat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva	Mannheim, Deutschland
DiBromoBAPTA	Alfa Aesar	Ward Hill, USA
Dithiothreitol (DTT)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (100%)	VWR	Darmstadt, Deutschland
Ethanol, absolut	VWR	Darmstadt, Deutschland
Ethanol, vergällt	Chemikalienlager	Oldenburg, Deutschland
Glycin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Firma	Sitz
Immun-Star™ Luminol/Enhancer	HRP Bio-Rad	München, Deutschland
Immun-Star™ Peroxide Buffer	HRP Bio-Rad	München, Deutschland
Isobutanol p.a	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	OmniLifeScience	Bremen, Deutschland
LB-(Lennox)-Medium	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Lysozym	Sigma	München, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Sucofin	Zeven, Deutschland
Methanol p.a.	VWR	Darmstadt, Deutschland
Myristinsäure	Sigma	München, Deutschland
Natriumchlorid	VWR	Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	OmniLife Science	Bremen, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	OmniLife Science	Bremen, Deutschland
Precisions Plus All Blue	Bio Rad	München, Deutschland
Precisions Unstained	Bio Rad	München, Deutschland
Roti®-Safe GelStain	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (37%, HCl)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SDS-Pellet	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Chemikalienlager	Oldenburg, Deutschland
TEMED	Fluka	München, Deutschland
Tetracyclin	Serva	Mannheim, Deutschland
Trifluoressigsäure p.a.	Sigma	München, Deutschland
Tris	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	OmniLife Science	Bremen, Deutschland

3.4 Verwendete Bakterienstämme

XL1-Blue Bakterienstämme:

recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK- mK+) supE44 relA1 lac [F' proAB, lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene)

BL21-codonPlus-(DE3)-RP:

E. coli B F- *ompT hsdS (rB-mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA endA HTe [argU proL Camr]* (Stratagene)

3.5 Methodendurchführung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Methoden aus dem Sammelwerk *Sambrook et al.* (1998) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert (122).

3.6 Klonierung

Das Plasmid der Mutante D100E lag aus voran gegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits vor.

Die Punktmutation L176F wurde über eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in den Vektor pET21 eingeführt. Der nicht-mutierte Vektor im Ansatz wurde verdaut. Anschließend wurden *E. coli* -Zellen mit dem L176F tragende Vektor pET21 transformiert. Eine anschließende Sequenzierung bestätigte die positive Klonierung. Die Ergebnisse der Klonierung sind nicht im Ergebnisteil aufgeführt.

3.6.1 Verwendete Primer

Forward Primer: 5'-AAGCTTGGACTTTACCCGCATTG-3' (T = eingeführte Mutation)

Reverse Primer: 5'-CGGGTCAGCGTGTCCAAG-3'

3.6.2 Verwendete Vektoren:

L176F: pET 21 (Novagen; EMD Chemicals Inc, San Diego, USA)

hGC-E: pIRES-eGFP (Clontech; Frankreich)

N-Myristyltransferase: pBB131 (zur Verfügung gestellt von Dr. J. I. Gordon; Center for Genome Science and Systems Biology, Washington University)

3.6.3 Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit Protocol

Die Mutation wurde mit dem *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* (NewEngland Biolab; Frankfurt, Deutschland) generiert. Über eine PCR wurde die Punktmutation eingebaut und das Zieltemplate amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurde mit einem Enzymkomplex die nicht mutierte Matritze verdaut, die Enden des Targetvektors phosphoryliert und der Vektor anschließend ligiert.

Arbeitsanweisung:

Schritt 1: Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR besteht aus mehreren Teilschritten, die nacheinander bei unterschiedlichen Temperaturen aber mit dem Ausgangsansatz durchgeführt werden. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang denaturiert. Anschließend binden die Primer (spezifische Oligonukleotide) an die Einzelstränge der DNA. Diese enthalten die einzubauende Mutation. Mittels einer hitzebeständigen Polymerase wird die DNA nun, unter Einfügung der Primer, elongiert. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt um genügend Vektor zu erhalten (123, 124).

Der PCR Ansatz wird, wie in Tabelle 5 beschrieben, vorgelegt und anschließend mit 20 μ l *chill out Wachs* überschichtet um Verdunstungen zu minimieren. Mithilfe eines Thermocyclers und des Programms (Tabelle 6) wird die Reaktion durchgeführt.

Tabelle 5: Ansatz für PCR

Komponente	Konzentration	eingesetzte Menge [μl]
Plasmid-DNA	1-25ng	1
Primer 1 (Forward-Primer)	10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,25
Primer 2 (Reverse-Primer)	10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,25
Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix	1U/ μl	12,5
H ₂ O		ad. 25

Tabelle 6: Programm für PCR

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [sec]	Reaktionsschritt	Zyklen
98	120	Denaturierung	1
98	15	Primerhybridisierung	30
66	30		
72	150		
72	120	Elongation	
4		Ende	

Schritt 2: Kinase, Ligase und DpnI (KDL) Behandlung

Im zweiten Schritt werden die Enden der entstandenen DNA phosphoryliert und anschließend ligiert. Das Restriktionsenzym DpnI schneidet gleichzeitig die Template-DNA spezifisch bei Sequenz der 5'-GmeATC-3'. Übrig bleibt die Mutation-tragende DNA, die anschließend in *E. coli* Zellen eingebaut werden kann. Der Ansatz wird wie folgt vorgelegt (Tabelle 7) und für 5 min bei RT inkubiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung KLD Ansatz

Komponente	eingesetzte Menge [μ l]
PCR Produkt	1
2x KLD reaction buffer	5
10x KLD enzyme mix	1
H ₂ O	ad. 10

3.6.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur heterologen Expression von L176F mussten *E. coli* Zellen mit dem Gen-tragenden pET-21 Vektor transformiert werden. Um eine Bakterienmembran für die Vektorenaufnahme vorzubereiten, wurden *E. coli* Zellen vorab mit CaCl₂ behandelt.

Arbeitsanweisung:

Tabelle 8: Zusammensetzung LB-Medium

Komponente	Konzentration (w/v)
Hefeextrakt	0,5%
Baktotrypton	1,0%
NaCl	0,5%

5 ml LB-Medium (Lennox) werden mit XL-1 Blue Zellen angeimpft und in Gegenwart von 12,5 mg/ml Tetracyclin, aerob bei 37°C für mindestens 8 h inkubiert. Anschließend wird eine 50 ml Hauptkultur angeimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen. Die Zellen werden bei 4°C durch Abzentrifugieren (10 min, 5000 g) pelletiert, der Überstand wird verworfen. Alle Arbeitsschritte werden bei 4°C durchgeführt um möglichst viele kompetente, lebende Zellen zu erhalten. Das Zellpellet wird in 25 ml 0,1 M CaCl₂ (eiskalt) vorsichtig resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wird abermals abzentrifugiert (5000g; 10 min; 4°C) und das resultierende Pellet wird umsichtig in 5 ml 0,1 M CaCl₂ / 25% Glycerin aufgenommen und für weitere 2 h auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen werden Schock-gefroren und bei -80°C in Aliquots gelagert.

3.6.5 Transformation

Um Proteine in Bakterien heterolog zu exprimieren, wurde die entsprechende DNA mithilfe einer Transformation in kompetente Zellen eingebracht. Es wurden die *E. coli* Stämme XL-1 Blue sowie BL-21 genutzt. Für die Sequenzierung wurde zuerst die DNA in den XL-1 Blue Stamm transformiert, für eine ertragreiche Ernte dann anschließend in BL-21 Zellen.

Arbeitsanweisung:

8 µl KLD Ansatz sowie 5 µl 10-fach CM-Puffer (100 mM CaCl₂; 400 mM MgCl₂) werden mit 35 µl Wasser vorgelegt. Es werden vorsichtig 150 µl der empfindlichen, kompetenten Zellen mit dem Ansatz vermischt. Der Reaktionsansatz wird 30 min auf Eis inkubiert, und anschließend für 1 min bei 42°C behandelt, was die Aufnahmefähigkeit der Zellen erhöht. Zur Entspannung werden die Zellen wieder 30 min auf Eis inkubiert, vorsichtig mit 800 µl LB-Medium versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert, bevor sie auf LB Platten ausplattiert werden. Die LB-Platten wurden zuvor mit Antibiotika versetzt, gegen das die eingeschleusten Plasmide Resistenzgene tragen, sodass nur positiv transformierte Zellen Kolonien bilden können. Diese können dann gepickt und in 5 ml LB-Flüssigkulturen gebracht werden. Die 5 ml Kultur wird über Nacht bei 37°C im Rollinkubator angezogen.

Verwendet wurde grundsätzlich das Antibiotikum Ampicilin. Bei den myristylierten Proteinen wurde außerdem Kanamycin zugegeben, da auf dem cotransformierten Plasmid pBB131 eine Kanamycin Resistenz vorhanden ist. Dieses Plasmid trägt das Gen für die Myristyltransferase, die im *E. coli* Gen nicht vorhanden, jedoch essentiell für die Myristylierung der heterolog exprimierten Proteine ist.

3.6.6 DNA Reinigung

Um DNA für die Sequenzierung zu gewinnen, wurden 5 ml Vorkultur der potentiell positiven Klone gereinigt. Hierfür wurde das *Pure YieldTM Plasmid Miniprep System* von Promega (USA) verwendet.

Arbeitsanweisung:

2 ml einer Bakterienkultur werden bei 13000 rpm für 2 min abzentrifugiert und das erhaltende Pellet in TE Puffer (10 mM Tris, pH 7,5 und 1 mM EDTA) resuspendiert. Durch Zugabe und Invertierung von 100 µl *Cell lysis* Puffer werden die Zellen aufgeschlossen. 350 µl des zweiten Puffers (*Neutralisation buffer*) neutralisieren den Vorgang. Der Aufschluss wird, nach gutem Vermischen, abzentrifugiert (13000 rpm, 3 min) und der Überstand auf eine *PureYieldTM Minicolumn* gegeben. Diese sammelt die DNA. Durch erneutes Abzentrifugieren werden alle weiteren Bestandteile durch die kleine Säule gedrückt und in einem *Collector tube* gesammelt. Die DNA wird mit 200 µl *Endotoxin Removal Wash* (ERB) und 400 µl *Column Wash Solution* gereinigt, bevor sie mittels 30 µl Elutionspuffer aus der Säule gelöst und in einem sauberen Reaktionsgefäß gesammelt (15 sec; 13000 rpm) wird. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.6.7 Sequenzierung

Die DNA Proben wurden durch die Firma GATC (Konstanz) sequenziert. Die genträgenden Bereiche der DNA wurden verglichen und die positiven Klone zur Anzucht des Proteins verwendet (Das Ergebnis wird in dieser Arbeit nicht gezeigt).

3.6.8 Glycerolstocks herstellen

Um gleiche Startbedingungen für alle weiteren Expressionen zu schaffen, wurden Glycerolstocks von den betreffenden Proteinen hergestellt.

Arbeitsanweisung:

Hierfür werden 850 µl einer 5 ml Übernacht-Kultur des entsprechenden Proteins mit 200 µl Glycerin gemischt und in Aliquots a 100 µl schock gefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.7 Expression und Reinigung der Proteine

Für die geplanten Experimente mussten mehrere mg Protein hergestellt werden. Die Proteine GCAP1 L176F und D100E wurden heterolog in *E. coli* exprimiert, mittels chromatographischer Methoden gereinigt und lyophilisiert gelagert.

3.7.1 Expression

Theorie:

Die Kulturen werden mit Antibiotika versetzt, gegen das die entsprechenden *E. coli* Stämme Resistenzen auf den zur Transformation genutzten Plasmiden tragen. So wird zum einen die Anzucht eines anderen Bakteriums unterdrückt und zum anderen das Ablesen des Plasmides und somit auch die Expression des Zielproteins getriggert. Für die Expression nicht myristylierter Proteine muss nur Ampicilin zugegeben werden. Um Proteine in *E. coli* zu myristylieren ist eine Coexpression mit dem Plasmid pBB131, welches das Gen für die N-Methyltransferase trägt, notwendig. Das zusätzlich eingebrachte Plasmid enthält eine Resistenz gegen Kanamycin und wird durch Zugabe des Antibiotikums abgelesen.

Arbeitsanweisung:

5 µl eines Glycerolstocks werden zum Animpfen einer 5 ml LB-Kultur verwendet und über Nacht bei 37°C in einem Rollinkubator angezogen. 500 ml Hauptkultur werden mit der vollgewachsenen Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 inkubiert. Insofern die Expression eines myristylierten Proteins angestrebt wird, muss bei dieser OD₆₀₀ Myristinsäure (Endkonzentration 50 µg/ml) zugegeben werden. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wird IPTG (Endkonzentration 1mM), zur Induktion der Expression, zugegeben. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation bei gleichbleibenden Parametern werden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 5000 g) geerntet. Das erhaltene Bakterienpellet wird bei -80°C gelagert.

3.7.2 Zellaufschluss

Der enzymatische Zellaufschluss ermöglicht das spätere Reinigen des exprimierten Proteins. Die heterolog exprimierten Proteine D100E, L176F und GCAP1 wurden aus den unlöslichen Bestandteilen der Zellen gereinigt.

Arbeitsanweisung:

Das Zellpellet wird in 20 ml 5 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Durch Lysozym (Endkonzentration 100 µg/ml) wird der enzymatische Verdau gestartet. Zugegebene DNase (Endkonzentration 5 U/ml) hydrolysiert zeitgleich die DNA der aufgeschlossenen Bakterien. Die Reaktion wird für 30 min bei 30°C im Wasserbad (6 ppm) durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss wird die Zellsuspension auf 30 ml mit 5 mM Tris/HCl (pH 8.0) aufgefüllt. Die Zugabe von 1,0 mM DTT hilft, die Cysteinreste vor Oxidation zu schützen und 0,1 mM PMSF inhibiert die Proteasereaktion. Durch eine Ultrazentrifugation (30 min, 300000 g, 4°C) werden die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen voneinander getrennt. Das Pellet der unlöslichen Bestandteile wird zur Denaturierung der Proteine in 6 M Guanidinhydrochlorid homogenisiert und über Nacht bei 4°C geschwenkt.

3.7.3 Dialyse

Zur Reinigung und Faltung der Proteine wurde eine Dialyse durchgeführt.

Theorie:

Die zuvor denaturierten Proteine werden durch Dialyse, aufgrund der abnehmenden Guanidinhydrochlorid-Konzentration, gefaltet. Hierbei geht man davon aus, dass die meisten Proteine ihre thermodynamisch günstigste Tertiärstruktur einnehmen. Diese müsste auch gleichzeitig der funktionellen Proteinstruktur entsprechen. Moleküle unter 14000 Da können den Dialyseschlauch passieren wodurch nebenbei auch eine Reinigung des Aufschlusses durchgeführt wird.

Arbeitsanweisung:

Tabelle 9: Zusammensetzung Dialysepuffer

Komponente	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
DTT	1 mM

Die homogenisierte und aufgeschlossene Zellsuspension wird in einen semipermeablen Dialyseschlauch gefüllt, in 3 l Dialyse-Puffer (Tabelle 9; gekühlt auf ca. 4°C) gehängt und bei 4°C langsam gerührt. Nach 5 Stunden wird der Puffer gegen einen neuen ausgetauscht und die Dialyse über Nacht bei 4°C fortgeführt um die Konzentration an Salzen und unerwünschten kleineren Molekülen im Dialysat weiter abzusenken.

3.7.4 Ammoniumsulfat-Fällung

Um die Proteine in 5 ml SEC⁻- Puffers aufnehmen zu können, wurde das Dialysat mit Ammoniumsulfat gefällt.

Theorie:

Durch Ammoniumsulfat werden die im Dialysat gelösten Proteine unter Erhaltung der Proteinstruktur gefällt.

Arbeitsanweisung:Tabelle 10: Zusammensetzung SEC⁻- Puffer

Komponente	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
EGTA	2 mM
DTT	1 mM

Da die Proteine durch die Dialyse vorgereinigt wurden, wird sofort eine Ammoniumsulfatkonzentration von 80% eingestellt. Bei dieser Konzentration werden GCAPs und fast alle anderen noch enthaltenen Proteine ausgesalzen. Die Zugabe erfolgt portionsweise und unter Rühren bei 4°C binnen 20 Minuten. Weitere 20 Minuten wird das Gemisch bei 4°C gerührt um das Ammoniumsulfat vollständig zu lösen und alle Proteine auszufällen. Die Suspension wird abzentrifugiert (20 min; 20000 rpm; 4°C) und das erhaltene Proteinpellet in 5 ml SEC⁻-Puffer (Tabelle 10) resuspendiert, wodurch die Proteine wieder gelöst werden.

3.7.5 Chromatographische Trennung

Die Proteine wurden über eine Größenausschluss-Chromatographie (SEC) und eine anschließende Anionenaustausch-Chromatographie (AEC) gereinigt. Unerwünschte Proteine, DNA und andere Zellbestandteile werden aufgrund ihrer Eigenschaften von den Zielproteinen getrennt. AEC-Fractionen die über 95% reines Zielprotein enthielten, wurden gepoolt und lyophilisiert (Ergebnisse werden nicht gezeigt).

3.7.5.1 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Als erste chromatographische Trennmethode wurde die SEC gewählt.

Theorie:

Bei der SEC werden die Proteine aufgrund ihrer Größe getrennt. Große Proteine werden weniger von dem porösen Säulenmaterial adsorbiert als kleinere und können die Distanz der großen Säule (HiLoad 26/60 Superdex 75 #1 Säule; GE Healthcare) schneller überwinden. Da diese Trennung nicht durch direkte Bindung sondern durch Adsorption an die große Oberfläche des Säulenmaterials erfolgt, ist das Wechseln der mobilen Phase nicht notwendig.

Arbeitsanweisung:

Vor dem Säulenauftrag werden unlösliche Bestandteile der Proteinlösung durch Ultrazentrifugation (100000 g; 15 min; 4°C) abgetrennt. Bei einem Fluss von 1 ml/min SEC⁻-Puffer (siehe Tabelle 10) wird die Proteinlösung auf die Säule gegeben. Die UV-aktiven Fraktionen die 120-200 Minuten nach Probenauftrag die Säule passieren, werden gesammelt.

Die Fraktionen mit dem Zielprotein werden aufgrund der Proteingröße mit einem 12% SDS-Gel (siehe 3.7.6) und anschließender Coomassiefärbung (siehe 3.7.7) identifiziert und weiter gereinigt.

3.7.5.2 Anionenaustausch-Chromatographie (AEC)

Nach der SEC wurden die vorgereinigten, proteintragenden Fraktionen über eine AEC weiter gereinigt.

Theorie:

Bei der AEC werden Proteine aufgrund ihrer Nettoladung voneinander getrennt. Die stationäre Phase bindet negativ geladene Moleküle. Positive oder neutrale Proteine werden nicht adsorbiert und passieren die Säule. Durch einen Wechsel der mobilen Phase werden die gebundenen Proteine eluiert und aufgefangen.

Arbeitsanweisung:

Tabelle 11: Zusammensetzung AEC Puffer A

Komponente	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	20 mM
EGTA	2 mM
DTT	1 mM

Tabelle 12: Zusammensetzung AEC Puffer B

Komponente	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	1000 mM
EGTA	2 mM
DTT	1 mM

Die Zielprotein-enhaltenen Fraktionen der SEC werden vereint und auf die AEC (HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance; GE-Healthcare) gegeben. Die Flussrate wird auf 2 ml pro Minute eingestellt. Für den Proteinauftrag wird eine Pufferkonzentration von 85% Puffer A (Tabelle 11) und 15% B (Tabelle 12) gewählt. Zum Waschen der Säule wird auf 20% Puffer B erhöht. Zur langsamen Elution der gebundenen Proteine wird ein Gradient über 30 min von 20% auf 55% Puffer B gefahren. Während dieser Phase werden UV-aktive Fraktionen à 10 ml gesammelt. Die gesuchten, proteintragenden Fraktionen werden mittels eines 12%igen SDS Gels (siehe 3.7.6) und anschließender Coomassie-Färbung (siehe 3.7.7)

identifiziert. Insofern diese Fraktionen rein genug sind, werden sie vereint und umgepuffert (siehe 3.7.8).

3.7.6 SDS (Sodium dodecyl sulfate)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das SDS-Gel wurde für verschiedene Analysen innerhalb dieser Arbeit verwendet. Hauptsächlich diente diese Methode der Identifizierung und Mengenabschätzung eines Proteins.

Theorie:

Mittels der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese werden die Proteine aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität durch einen diskontinuierlichen pH-Verlauf (nach Laemmli) getrennt. Das Gel besteht aus einem Sammelgel (pH: 6,8; 0,125 M Tris) und einem Trenngel (pH 8,8; 0,375 M Tris). Der verwendete Puffer maskiert die Nettoladung der Proteine, sodass sie nur aufgrund ihrer Größe und ihrer elektrophoretischen Mobilität getrennt werden (125).

Arbeitsanweisung:

Tabelle 13: Zusammensetzung Trenngel (12%)

Komponente	Volume [μ l]
H ₂ O	1775,0
Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	1000,0
Acrylamid-Bis solution 40%	1200,0
TEMED solution	2,5
APS 10%	21,5

Tabelle 14: Zusammensetzung Sammelgel

Komponente	Volume [μ l]
H ₂ O	610,0
Tris/HCl 0.5 M pH 6,8	250,0
Acrylamid-Bis solution 40%	125,0
TEMED solution	1,2
APS 10%	12,0

APS: Ammoniumperoxosulfat;

TEMED: Tetramethylethyldiamin

Tabelle 15: Zusammensetzung 4xSDS Probenpuffer

Komponente	Einwaage
Tris/HCl pH 6,8; 0,5 M	2500,0 μ l
H ₂ O	1500,0 μ l
Glycerol	5000,0 μ l
SDS	0,4 g
Bromphenolblau	2,5 mg
2-Mercaptoethanol	1000,0 μ l

Tabelle 16: Zusammensetzung Elektrophorese-Laufpuffer

Komponente	Konzentration
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)

Das Trenngel wird wie in Tabelle 13 beschrieben in die dafür vorgesehene Vorrichtung gegossen, nach einer Stunde Polymerisationszeit wird das Sammelgel (Tabelle 14) auf das Trenngel geschichtet. Ein Taschenkamm sorgt dafür, dass nach einer Stunde Polymerisationszeit, Taschen für die Proben vorhanden sind. Die Proben werden mit 4x Probenpuffer vermischt und in die Taschen des Sammelgels gegeben (je nach Versuch 10-20 μ l). Im Falle der Fraktionsanalysen der chromatographischen Trennung werden 30 μ l der gesammelten 10 ml FPLC Fraktionen mit 10 μ L 4xProbenpuffer (Tabelle 15) vermischt. Davon werden 10 μ l in eine der Geltaschen gefüllt. Ein mitlaufender Größenstandard (Precision Plus Unstained Standard von BioRad; 4 μ l Einsatz) ermöglicht die Zuordnung der Banden. Das Gel wird in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit Elektrophoresepuffer (Tabelle 16) umgeben. Die Elektrophorese wird bei 200 Volt für 37 Minuten durchgeführt. Das Gel wird anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blue R-250 (siehe 3.7.7) gefärbt oder für weitere immunchemische Analysen geblottet (siehe 3.8.4.1).

3.7.7 Coomassie-Färbung

Theorie:

Coomassie-Brilliant-Blue R-250 ist ein Farbstoff, der sich an basische und hydrophobe Seitenketten von Aminosäuren anlagert und diese blau einfärbt. Dadurch werden die Proteinbandenmuster der SDS-Gele sichtbar.

Arbeitsanweisung:

Tabelle 17: Zusammensetzung Coomassie-Färbelösung

Komponente	Konzentration
Coomassie R-250	0,2% (w/v)
Ethanol vergällt	40,0% (v/v)
Essigsäure	10,0% (v/v)

Tabelle 18: Zusammensetzung Entfärberlösung

Komponente	Konzentration
Ethanol vergällt	40,0% (v/v)
Essigsäure	10,0% (v/v)

Das SDS-Gel wird zur Fixierung der Proteinbanden 5 Minuten in Entfärberlösung (Tabelle 18) geschwenkt und anschließend für mindestens eine Stunde in Coomassie-Färbelösung (Tabelle 17) gefärbt. Das eingefärbte Gel wird nun abermals in Entfärberlösung gegeben, um unspezifische Einfärbungen des Farbstoffes auszuwaschen. Durch einen auf dem gleichen Gel mitlaufenden Größenstandard kann eine Bande einem Protein zugeordnet werden. Die Intensität der Bande korreliert in den meisten Fällen mit der relativen Häufigkeit eines Proteins in der Fraktion.

3.7.8 Pufferwechsel

Die ausgewählten Fraktionen wurden eingeengt, um die Proteine über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können.

Theorie:

Um eine Lyophilisierung zu ermöglichen, wird der AEC-Puffer durch 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) ausgetauscht. Alle Bestandteile von NH_4HCO_3 (NH_4 , H_2O und CO_2) können sublimiert werden, sodass nach dem gefriertrocknen nur noch das Protein im Reaktionsgefäß vorliegt.

Arbeitsanweisung:

Die Fraktionen werden in einen Konzentrator (Pall Corporation, Massachusetts) gegeben und bei 5000 g (30 min; 4°C) abzentrifugiert. Der Konzentrator ist undurchlässig für die Zielproteine. Alle passierenden Bestandteile werden verworfen. Die zurückbleibende Flüssigkeit wird mit NH_4HCO_3 aufgefüllt und abermals abzentrifugiert (5000 g; 30 min; 4°C).

Dieser Vorgang wird 3 Mal wiederholt um alle AEC-Pufferreste auszuwaschen. Bei Bedarf kann das Ammoniumhydrogencarbonat vorweg mit Chelex (siehe 3.10.2.1) vorbehandelt werden um annähernd Ca^{2+} -freie Bedingungen zu schaffen.

3.7.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

Vor dem Lyophilisieren wurde die Proteinkonzentration gemessen um geeignete Aliquots (1 oder 5 mg) herzustellen, aber auch für andere Experimente wurde diese photometrische Methode herangezogen.

Theorie:

Die Konzentration der Proteinlösung kann photometrisch bei 280 nm bestimmt werden. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Seitenketten von Proteinen. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Formel 1) kann die Proteinkonzentration errechnet werden.

Arbeitsanweisung:

1 ml einer 50-fachen Verdünnung der zu bestimmenden Probe wird in einer UV-fähigen Küvette vorgelegt und bei 280 nm gemessen. Nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz wird die Konzentration der Probe berechnet:

$$E = \varepsilon \times c_{\text{Molar}} \times d \quad (1)$$

E = Extinktion; c = molare Konzentration; d = Schichtdicke Küvette (1 cm)

$$\text{GCAP1 } \varepsilon_{280} = 27580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Anschließend wird das Volumen, das benötigt wird um die gewünschte Aliquotgröße zu erhalten, errechnet:

$$c_{\text{(Masse)}} = c_{\text{(Molar)}} * M \quad (2)$$

$$M_{\text{(GCAP1)}} = 26510 \text{ g/mol}$$

$$\text{Aliquotvolumen} = 1 / c_{\text{(Masse)}} \quad (3)$$

Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80°C gelagert.

3.7.10 Lyophilisierung

Theorie:

Durch das Gefriertrocknen wird das Ammoniumhydrogencarbonat langsam sublimiert. Hierbei entstehen nur gasförmige Produkte (H_2O , CO_2 und NH_3). Das Protein bleibt funktionell, da die Temperatur unter $0^\circ C$ gehalten wird. Lyophilisiert kann es monatelang bei $-80^\circ C$ gelagert werden.

Arbeitsanweisung:

Die gefrorenen Aliquots werden unter Vakuum bei unter $0^\circ C$ gefriergetrocknet (Gerät), bis keine Flüssigkeit mehr vorhanden ist.

3.8 Bereitstellung von hGC-E

3.8.1 Anzucht stabiler Zelllinien

Für die Interaktionsstudien von GCAP1, L176F und D100E mit hGC-E musste eine ausreichende Menge an hGC-E (auch im Folgenden mitunter vereinfacht GC genannt) bereitgestellt werden. Diese wurde heterogen in HEK-Zellen exprimiert. Bislang konnte dieses Protein nicht durch eine *E. coli* Anzucht funktionell hergestellt werden. Um vergleichbare hGC-E-Konzentrationen bei jeder Anzucht zu erhalten, wurden stabile Zelllinien hergestellt. Hierfür wurde in vorrangegangenen Experimenten durch Transfektion des pIRES-Vektors, welcher die hGC-E DNA sowie eine Antibiotikumresistenz gegen G418 enthält, in HEK-293 Zellen eingebracht. Durch Anzucht in Anwesenheit von G418 wurde der permanente Einbau des Plasmids in das Genom der HEK-293-Zellen getriggert.

Arbeitsanweisung:

Die stabile Zelllinie ist bereits in der Arbeitsgruppe Biochemie vorhanden und wird bei Bedarf aus einer Stammkultur reaktiviert. Hierfür wird ein Aliquot in DMEM Medium (= Dulbecco's modified Eagle's medium, pH7,4; GlutaMax™ – I, Gibco®) mit fetalem Rinderserum (Gibco®) und Antibiotika/Antifungal (Gibco®) bei $37^\circ C$ (5% CO_2) angezogen und 3x passagiert. Passagieren und Ernten erfolgen wenn 70% bis 80% der Petrischale bewachsen ist. Im Falle des Passagierens wird die Vorgänger-Kultur mechanisch

homogenisiert und 1 ml genutzt um eine neue 10 ml Passage an zu impfen. Geerntet werden die Kulturen wie in 3.8.3 beschrieben.

3.8.2 Behandlung mit CaF₂

Um den Einfluss von Nanopartikeln auf ein Zellsystem zu untersuchen wurden die stabilen Zelllinien 5 Tage vor Ernte mit 0,7 µM CaF₂-Partikeln (in 5 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM KCl) versehen. Die weiteren Kultivierungsbedingungen blieben unverändert. Das Zellwachstum sowie die Expression, des auf dem pIRES-Vektor ebenfalls codierten GFP-Proteins, wurde währenddessen mikroskopisch überwacht (Mikroskop Evos_{fe}).

3.8.3 Ernte und Aufschluss

Arbeitsanweisung:

Tabelle 19: Zusammensetzung Aufschlusspuffer

Komponente	Konzentration
Hepes-KOH pH 7,4	10 mM
DTT	1 mM
Protease Inhibitor Cocktail	1-fach

Tabelle 20: Zusammensetzung Resuspensionspuffer

Komponente	Konzentration
Mops/KOH pH 7,4	50 mM
KCl	50 mM
NaCl	10 mM
DTT	1 mM

Für die Ernte wird das Medium von den adhären wachsenden HEK-293 abgesaugt. Die Zellen werden in 3 ml PBS Puffer resuspendiert und anschließend abzentrifugiert (5000 g; 10 min). Hier können die Pellets Schock-gefroren und bei -80°C gelagert werden. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird unmittelbar vor dem Einsatz in 500 µl Aufschlusspuffer (Tabelle 19) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Zum Aufschluss der Zellen wird die Suspension diskontinuierlich mit Ultraschall 5 sec (Branson Sonifier B12) behandelt. Der Aufschluss wird abzentrifugiert (13000 g; 10 min) und das erhaltene Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer (Tabelle 20) aufgenommen. Für die GC-Assays wird die Gesamtproteinmenge des Aufschlusses mittels Amidoblack (3.8.4.3) bestimmt. Pro GC-Assay-Reaktionseinheit werden 10 µl Aufschluss pro Ansatz eingesetzt.

3.8.4 Nachweis von hGC-E

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der hGC-E, wurde ein immunochemischer Nachweis durchgeführt. Dieser besteht generell aus einem Westernblot um das Bandenmuster auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran zu übertragen und einem anschließenden Antikörpernachweis der gesuchten Proteinbande.

3.8.4.1 Westernblot

Die ausgewählte *Semidry*-Methode basiert auf dem System nach Khyse-Anderson (126).

Arbeitsanweisung:

Tabelle 21: Zusammensetzung Transferpuffer

Komponente	Konzentration
Tris	48 mM
NaCl	39 mM
Methanol	20% (v/v)

Bei dem *Semidry*-Westernblot wird eine durch Methanol aktivierte PVDF-Membran zusammen mit dem SDS-Gel (liegt auf der Membran) zwischen zwei in Transferpuffer (Tabelle 21) getränkte Filterpapieren auf eine Elektrophoreseapparatur gespannt. Durch Anlegen von 10 Volt für 33 min werden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen.

3.8.4.2 Immunochemischer Antigennachweis

Durch die Zugabe eines primären und sekundären Antikörpers zur Membran (siehe Westernblot 3.8.4.1), wurde gezielt das Antigen der hGC-E gelabelt. Der erste Antikörper bindet an das Antigen der hGC-E, anschließend ermöglicht der zweite Antikörper, durch eine photochemische Reaktion, die Detektion.

Arbeitsanweisung:

Tabelle 22: Zusammensetzung Tris-gepufferte NaCl-Lösung (TBST)

Komponente	Konzentration
Tris/HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	0,90% (w/v)
Tween-20	0,05% (v/v)

Nach dem Westernblot wird die PVDF Membran in TBS gewaschen und anschließend mit 1% Magermilchpulver über Nacht bei 4°C blockiert. Am nächsten Tag wird die Membran 4-mal mit TBST (Tabelle 22; je 5 min) gewaschen, bevor der erste Antikörper gegen das Antigen der hGC-E (ROS-GC-E; Santa Cruz; Heidelberg) zugegeben wird. Das in dem TBST enthaltene Tween sorgt für die nötige Permeabilität der Membran. Der primäre Antikörper (in TBST) bindet an das Protein binnen 1 h (Verdünnung 1/1000). Nach mehrmaligem Waschen (4 x 20 ml TBST, á 5 min) wird der sekundäre Antikörper (IgG-POD anti rabbit; Verdünnung 1/20000 in TBST) auf die Membran gegeben und für 1 h bei RT darin geschwenkt. Dieser ist mit einer HRP (Meerrettich Peroxidase) gekoppelt. Anschließend werden auch hier alle nicht gebundenen Reste abgewaschen (3 x 20 ml TBST á 5 min; 1 x 20 ml TBS á 5 min). 200 µl des Reaktionsgemisches (enthält Luminol und H₂O₂) werden auf die Membran gegeben. Die Membran wird zusammen mit einem Film in eine Vorrichtung eingespannt, in der die frei werdenden Lichtquanten der Oxidation von Luminol durch die HRP auf dem Film detektiert werden. Die Belichtungszeit des Filmes richtet sich nach der gewünschten Intensität der Bande. Der Größenstandard wird manuell auf den Film übertragen um die Signale mit der Proteingröße zu vergleichen und den immunchemischen Nachweis auswerten zu können.

3.8.4.3 AmidoblackTheorie:

Eine weitere Möglichkeit Proteine anzufärben ist der Einsatz des Azofarbstoffes Amidoblack. Vorteil dieser Methode ist, dass der an das Protein gebundene Farbstoff hinterher von der Membran gelöst und photometrisch vermessen werden kann.

Arbeitsanweisung:

Tabelle 23: Zusammensetzung Amidoblack-Färbelösung

Komponente	Konzentration
Amidoblack B10	0,5% (w/v)
Propanol-2	25,0% (v/v)
Essigsäure	10,0% (v/v)

Tabelle 24: Zusammensetzung Entfärbelösung

Komponente	Konzentration
Propanol-2	25,0% (v/v)
Essigsäure	10,0% (v/v)

Tabelle 25: Zusammensetzung Elutionslösung

Komponente	Konzentration
Ethanol	50%
NaOH	25 mM
EDTA	50 μ M

Nach dem immunchemischen Nachweis kann die Membran mit Amidoblack angefärbt werden, um Proteinbanden nachzuweisen. Hierfür wird die Membran nach dem immunchemischen Antigennachweis für mindestens 1 h in Amidoblack-Färbelösung (Tabelle 23) geschwenkt. Anschließend werden unspezifische Färbungen durch Schwenken in Amidoblack-Entfärber (Tabelle 24) wieder entfärbt.

Der folgende Schritt kann optional durchgeführt werden um Proteinmengen abschätzen zu können. Eine Kalibriergerade bestehend aus 0, 1, 2, 5, 7, 10 μ g BSA in 100 μ l H₂O wird vorgelegt. Die Probe wird ebenfalls auf 100 μ l aufgefüllt und sollte im Kalibrierungsbereich liegen. Es werden nacheinander 10 μ l 10% SDS, 15 μ l 1% SDS in 1M Tris/HCl pH 7,5 sowie 30 μ l 104 % TCA (w/v) mit den vorgelegten 100 μ l vermischt. Die Reaktionsansätze werden für 20 Minuten bei RT inkubiert. 10 μ l der Ansätze werden auf einen mit 3 ml 6% TCA gewaschenen 0,45 μ m Membranfilter gegeben. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Spots nicht miteinander verlaufen oder Blasen enthalten. Um den Vorgang zu erleichtern wird die Membran auf eine Absaugvorrichtung gespannt. Abschließend wird die Membran ein weiteres Mal mit 3 ml 6% TCA gewaschen, bevor sie für mindestens 1 h mit Amidoblack gefärbt wird. Nach der Entfärbung kann mithilfe der aufgetragenen Kalibrierreihe die Proteinkonzentration abgeschätzt werden. Sollte diese Bestimmung nicht ausreichen, kann der

Filter auch getrocknet, die Spots ausgeschnitten und 20 Minuten (RT) in Elutionslösung (Tabelle 25) inkubiert werden. Die Elutionslösung ist nun blau gefärbt, wobei die Intensität äquivalent zur Proteinkonzentration der Probe bzw. Kalibrierreihe ist und bei 630 nm photometrisch bestimmt werden kann.

3.9 Strukturanalysen

Mit den Strukturanalysen sollten Konformationsänderungen aufgrund von Ca^{2+} -Bindungen untersucht werden. Diese Experimente wurden vor allem zur Beschreibung und zur Charakterisierung der Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung der Mutante L176F durchgeführt.

3.9.1 Ca^{2+} -shift Assay

Theorie:

Bei manchen GCAP Isoformen verschiebt sich die Proteinbande in einem SDS-Gel zu geringeren Molekulargewichten, wenn sie Ca^{2+} gebunden haben. Dieses Phänomen wird Ca^{2+} -shift genannt und kann Auskunft über die Konformationsänderung des Proteins bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentration liefern. Durch die Bindung des Kations, verändert sich die Oberfläche und das Volumen von beispielsweise GCAP1 so stark, dass dies durch eine höhere elektrophoretische Mobilität im Gel sichtbar wird.

Arbeitsanweisung:

Für den Assay muss vorab ein 12%-iges SDS-Gel (siehe 3.7.6) vorbereitet werden. 2 μg des Proteins werden mit 1 mM CaCl_2 oder 1 mM EGTA (Gesamtvolumen Ansatz: 15 μl) versetzt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Proben werden mit 5 μl 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen, welches in einer Elektrophoresekammer eingespannt und 40 Minuten bei 200 Volt laufen gelassen wird. Anschließend wurden die Proteinbanden mit Coomassie (siehe 3.7.7) eingefärbt und ausgewertet.

3.9.2 Tryptophan-Messung

Theorie:

Tryptophan ist eine aromatische Aminosäure, deren Fluoreszenzemission bei 280 nm angeregt werden kann. GCAP1 besitzt drei Tryptophane (Position 21, 51 und 94). Je nach Konformation des Proteins verändert sich die Umgebung der Tryptophane, was durch eine veränderte Tryptophanfluoreszenz (Emission) sichtbar wird. Ca^{2+} -Konzentrationen bis zu 1 mM beeinflussen vorwiegend die Umgebung der Tryptophane 21 und 51. Dies wird unter Phase 1 zusammengefasst. Ab 1 mM wird durch Ca^{2+} -Bindung vor allem die Umgebung des Tryptophans 94 angesprochen. Man spricht von Phase 2 (62).

Arbeitsanweisung:

Tabelle 26: Zusammensetzung Fluoreszenzpuffer

Komponente	Konzentration
Hepes KOH pH 7,5	80 mM
KCl	40 mM
DTT	1 mM

Um die Konformation des GCAPs zu beeinflussen werden unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen vorgelegt (Tabelle 27):

Tabelle 27: Pipettierschema Tryptophan-Messung

50 mM K ₂ H ₂ EGTA [μ l]	50 mM K ₂ CaEGTA [μ l]	μ M [Ca ²⁺] _f
10	0	1,77*10 ⁻³
9	1	0,029
7	3	0,099
6	4	0,159
5	5	0,255
4	6	0,405
3	7	0,705
2	8	1,491
1	9	7,688
0	10	33

50 mM Ca²⁺-Lösungen werden in 100 μ l vorgelegt, mit 300 μ l Fluoreszenzpuffer (Tabelle 26) versehen und kurz vor der Messung mit 25-50 μ g (in 100 μ l) Protein vermischt. Die Messung wird mit Hilfe der Tryptophan-Methode des Fluoreszenzphotometers (Photon Technology International) durchgeführt. Jede Ca²⁺-Konzentration wird 4 Mal in Anwesenheit und Abwesenheit von 1 mM Mg²⁺ vermessen. Angeregt wird die Fluoreszenz bei 280 nm, aufgenommen wird ein Emissions-Spektrum zwischen 300 und 400 nm. Das Absorptionsmaximum liegt zwischen 330 nm und 340 nm und wird gegen die Ca²⁺ Konzentration aufgetragen.

3.10 Bindungsstudien

Es wurden zwei verschiedene Bindungsstudien durchgeführt. Der Chelator-Assay (3.10.1) wurde eingesetzt, um die Ca²⁺-Affinitäten der drei funktionellen EF-Hände der GCAP1 Mutante L176F zu untersuchen. Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC; 3.10.2) wurde eingesetzt um die Stöchiometrie der GCAP1/CaF₂ bzw. D100E/CaF₂ Bindung zu untersuchen.

3.10.1 Chelator-Assay

Mit diesem Versuch sollten die drei funktionellen EF-Hände der GCAP1 Mutante L176F hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Bindungsaffinitäten untersucht werden.

Theorie:

DiBromo-BAPTA ist ein Ca^{2+} Chelator, der in Konkurrenz zu den GCAPs Ca^{2+} -Ionen der Lösung bindet. GCAPs haben eine höhere Affinität zu Ca^{2+} als DiBromo-BAPTA. Der Chelator kann also nur die nicht durchs GCAP gebundenen Ca^{2+} -Ionen der Lösung binden. Durch diese Bildung des BAPTA- Ca^{2+} Komplexes verringert sich die Absorption bei 263 nm, wodurch die Konzentration dieser Verbindung bestimmt werden kann. Trägt man die Absorption des Komplexes gegen die absolute Ca^{2+} -Konzentration auf, kann die durch die GCAPs gebundene Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von der gesamten Ca^{2+} -Konzentration der Lösung, berechnet werden (127).

Arbeitsanweisungen:

Chelatorlösung ansetzen

Die Konzentration der Stocklösung wird genau bestimmt um die spätere Auswertung zu ermöglichen. 15 mM DiBromo-BAPTA wurde in 0,1 M KOH gelöst und mit Ca^{2+} -freiem Chelatorpuffer (5 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM KCl) auf ungefähr 3 mM verdünnt. Die genaue Konzentration der hergestellten Chelatorlösung wird mittels dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Formel 1) bei E_{240} ($M_{\text{DiBromo}} = 14.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Chelatorlösung wird für den Assay auf 30 μM verdünnt. Um die genaue Chelatorkonzentration zu bestimmen, wird zuerst der BLW (1 ml Chelator-Puffer) und anschließend die Chelatorlösung mit 5 μl CaCl_2 bei E_{240} nm gemessen.

Hieraus ergibt sich die Chelatorkonzentration C_{Ch} :

$$C_{\text{Ch}} = \frac{E_{240}}{14000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}} \quad (3)$$

Im Folgenden wird die genaue, anfängliche Ca^{2+} -Konzentration bestimmt. Die Ca^{2+} -frei gespülte Küvette (mit 5 mM EDTA, Ethanol und demineralisiertem H_2O) wird mit 1 ml neuer

Chelatorlösung gefüllt, der BLW bei E_{263} und anschließend die Extinktionen in Gegenwart von 0,1 M EDTA (5 μ l) sowie 1M CaCl_2 (5 μ l) gemessen.

Die initiale Ca^{2+} Konzentration wird wie folgt berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]Ch = \frac{c_{Ch} \cdot (E_{263}^E - E_{263})}{(E_{263}^E - E_{263}^C)} \quad (4)$$

Proben vermessen

2 mg lyophilisiertes Protein werden in 3 ml Chelatorlösung gelöst. Die genaue Proteinkonzentration wird bei 280 nm bestimmt (siehe 3.7.9). 1 ml wird in einer Quarzküvette vorgelegt und die Extinktion bei 263 nm gemessen. Anschließend werden 2,2 μ l 3 mM CaCl_2 dazu pipettiert und die Extinktion gemessen. Dies wird so lange wiederholt, bis keine Extinktionsveränderung mehr zu erkennen ist. Die Werte werden gegen die Ca^{2+} Konzentration aufgetragen und mittels dem Program CaLigator ausgewertet (128).

3.10.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Mit der Isotherme Titrationskalorimetrie wurde die Stöchiometrie der GCAP1/ CaF_2 bzw. D100E/ CaF_2 Bindung überprüft. Sie wurde zuvor von Daniele Dell'Orco nur rechnerisch vorhergesagt.

Theorie:

Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) kann genutzt werden, um Bindungsprozesse thermodynamisch (Enthalpie und Entropie) zu charakterisieren, sowie um Stöchiometrie und Bindungsaffinitäten zweier Reaktionspartner zu bestimmen (129, 130). Minimale Temperaturunterschiede, die bei Titration zwischen Referenz- und Messzelle auftreten, können registriert und ausgewertet werden. Genutzt wurde das Kalorimeter (VP-ITC von MicroCal; GE Life Science).

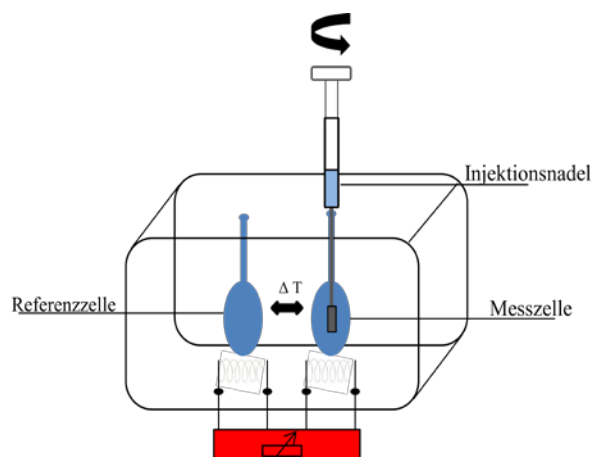


Abbildung 14: Aufbau einer ITC. Über die Injektionsnadel wird der eine Interaktionspartner in die Messzelle zu dem vorgelegten zweiten Interaktionspartner titriert. Dadurch entstehende Temperaturdifferenzen zwischen Mess- und Referenzzelle können als Änderung des Heizstromes detektiert werden.

Referenz- und Messzelle sind von einem adiabatischen Mantel umgeben und können unabhängig voneinander durch Heizelemente auf die gewünschte Versuchstemperatur geheizt oder gekühlt werden. Die Messzelle besitzt ein Volumen von 1,4696 ml, die ebenfalls temperierte Injektionsnadel eines von 285,96 μl . Die Nadel wird über eine passgenaue Öffnung in die Messzelle eingeführt. Sie ist abgeflacht und kann ein definiertes Volumen durch einen aufgesetzten Stellmotor unter ständigem Rühren in die Messzelle injizieren (130). Dadurch werden Temperatur und Konzentrationsgradienten vermieden. Für die Bindungsstudien von Nanopartikeln und GCAP1 sowie der GCAP1-Mutante D100E wurde decalzifizierter Titrationspuffer (5 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM KCl) in die Referenzzelle, die Proteinlösung in die Messzelle und die Nanopartikellösung in die Injektionsspritze gefüllt. Die Temperaturkonstanz zwischen Mess- und Referenzzelle wird über mehrere Rückkopplungsmechanismen gewährleistet und so reguliert, dass keine Heizstromdifferenz vorliegt. Erst durch eine Bindungswärme oder -kälte wird die Temperaturkonstanz gestört, was durch das Kalorimeter detektiert und ausgeglichen wird. Aufgetragen wird das molare Verhältnis gegen die kcal die pro Mol Interaktionspartner A (vorgelegt in der Injektionsspritze) benötigt oder abgegeben werden.

3.10.2.1 Decalzifizierung von Puffern

Für die ITC- und die Chelatormessungen ist die Verwendung eines annähernd Ca^{2+} -freiem Puffers wichtig, um die geringen Ca^{2+} -Konzentrationen der Experimente genau einstellen zu können. Hierfür wird der Titrationspuffer (5 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM KCl) über mehrere Tage mit Chelex behandelt. Chelex ist ein Übergangsmetall-Chelator (BioRad, München), der sehr gut Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen in wässrigen Lösungen binden kann. Vor Gebrauch muss das Chelex regeneriert werden. Hierfür wird die gelartige Substanz auf eine Absaugvorrichtung gegeben, mit 200 ml 1 M HCl für mindestens 10 min inkubiert und anschließend mit mindestens 1 l H_2O gewaschen. Danach wird das Chelex mit 200 ml 2 M NaOH für 10 min und abermals mit 1 l H_2O gespült. Der Ca^{2+} -Chelator wird in Titrationspuffer resuspendiert und der pH Wert auf 7,5 eingestellt, bevor es zusammen mit dem noch nicht Ca^{2+} -freiem Titrationspuffer für mindestens drei Tage bei 4°C gerührt wird. Vor dem Gebrauch wird das Gemisch über eine Absaugvorrichtung gegeben, sodass alle Reste des Chelex im Filter zurückbleiben. Die finale Ca^{2+} -Konzentration wird mittels einer BAPTA Messung bestimmt.

3.10.2.2 Ca²⁺ Konzentrationsbestimmung (BAPTA)

Mit BAPTA (1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure) können sehr geringe Ca²⁺-Konzentration (bis 10 µM) einer Lösung bestimmt werden. Es handelt sich um ein Chelator Chromophor, mit einem Absorbptionsmaximum bei 254 nm. In Verbindung mit Ca²⁺ bildet BAPTA einen nicht-absorbierenden CaBAPTA Komplex. Dieser Komplex bildet sich auch in Anwesenheit von Mg²⁺ aus, sodass BAPTA auch eine ideale Nachweismethode für Ca²⁺-Ionen in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen darstellt.

Zur Überprüfung der Ca²⁺-Konzentration werden 20 µM BAPTA (20 µL 1M BAPTA) in 1ml Puffer angesetzt. Die freie BAPTA Konzentration kann mithilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes ermittelt werden:

$$c_{BAPTA\ frei} = \frac{E}{\epsilon} \quad (5)$$

C = Konzentration; E: Extinktion; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient (16000 M⁻¹ * cm⁻¹)

Da 20 µM BAPTA ohne Ca²⁺ vorgelegt werden, kann sofern man $c_{BAPTA\ frei}$ bestimmt hat, die Konzentration an initialem CaBAPTA errechnet werden. Die freie Ca²⁺-Konzentration kann dann daraus wie folgt ermittelt werden:

$$[Ca^{2+}]_{frei} = \frac{[CaBAPTA] * K_D BAPTA}{[BAPTA]_{frei}} \quad (6)$$

$K_D BAPTA = 0,107 \mu M$

Arbeitsanweisung:

Alle Lösungen und Apparaturen werden versucht Ca²⁺-frei zu halten um Interaktionen von GCAP mit Ca²⁺-Ionen zu minimieren. Bei der ITC ist Sauberkeit für das generieren vertrauensvoller Ergebnisse besonders wichtig. Vor und nach jeder Titration wird die Messzelle mit 300 ml 2% Decon90 und 700 ml Wasser gespült. Um alle Reste von Ca²⁺ aus der Zelle zu spülen wird abschließend ungefähr 30 ml Titrationspuffer durch die Zelle geleitet. Flüssigkeitsrückstände in der Messzelle werden nach jedem Waschschrift sorgfältig entfernt. Um Proteinagglomerationen abzulösen wird nach 3 Messdurchgängen die Zelle auf 40°C für mindestens eine Stunde aufgeheizt, während sie mit 2% Decon90 gefüllt ist.

Für die Messung werden 3 mg lyophilisiertes Protein in ungefähr 6 ml Titrationspuffer resuspendiert. Das Protein wird soweit verdünnt, dass eine Konzentration von ca. 10 μM vorliegt. Die genaue Konzentration wird mittels E_{280} bestimmt (siehe 3.7.9). Die gereinigte Messzelle der ITC wird mit Proteinlösung und die Injektionsspritze mit Nanopartikelösung (4,25 μM) blasenfrei befüllt. In der Referenzzelle wird Titrationspuffer vorgelegt. Die Titrations-spritze wird in die Messzelle eingeführt. Die Messungen werden mit dem Programm von VP-ITC gesteuert. Im Programm werden folgende Parameter eingestellt: *total injections* (30), die *cell temperature* (25°C), das *Volume of injection* (10 μl), *duration* (20 sec). Die *Reference power* wird bei 15, das *Initial Delay* bei 180, der *stirring speed* bei 307, das *Spacing* bei 120 und die *Filter period* bei 2 belassen. Nachdem das Gerät die geforderten 25°C erreicht hat, wird die Titration automatisch gestartet. Ausgewertet werden die Messungen mit der Software: Origin7 (Microcal, GE Healthcare) die unter anderem für die Auswertung der ITC Messungen entwickelt wurde. Die Titrationsen werden mit dem Einseiten-Bindemodell gefittet.

3.11 Funktionalitätsstudien (GC-Assays)

Um die Funktionalität der GCAPs und GCAP Mutanten zu untersuchen, wurde deren Aktivierung und Inhibierung auf die GC getestet. Der IC_{50} -Wert ist die halbmaximale Ca^{2+} -Konzentration die zur Inhibierung der GC notwendig ist. Durch Auswertung dieser Messergebnisse kann ebenfalls die x-fache Aktivierung bestimmt werden, die ein Maß für die Produktivität in der cGMP Produktion des GCAP/GC Komplexes ist. Der EC_{50} -Wert bezeichnet die GCAP Konzentration, die notwendig ist um die GC halbmaximal zu aktivieren. Sowohl der EC_{50} - als auch IC_{50} -Assay wurden für die biochemische Charakterisierung der Mutante L176F und für die Untersuchung von CaF_2 -Einwirkungen auf die Funktionalität, Affinität und Sensitivität des GCAP/GC Systems genutzt.

Theorie:

Ausgewertet wird der Test über die cGMP Produktion der GC in Gegenwart von GCAP (bzw. den Mutanten) innerhalb einer Reaktionsdauer von 5 min. Die hergestellte cGMP Konzentration kann anschließend über eine HPLC bestimmt werden. Die Menge an GC sowie GTP ist in allen GC-Assays gleich, während die Ca^{2+} -Konzentration des Assays (IC_{50} -Messung) oder die Proteinkonzentration (EC_{50} -Messung) variiert werden. Um die

Auswirkungen von Nanopartikel auf die Funktionalität des GCAP-GC-Komplexes zu untersuchen, wurden die GC-Assays auch in Gegenwart von CaF_2 durchgeführt.

3.11.1 übergreifende Testdurchführung:

Tabelle 28: Zusammensetzung 2,5 x GC-Puffer

Komponente	Konzentration [mM]
Mops/KOH pH 7,2	75,00
KCl	150,00
NaCl	10,00
DTT	2,50
MgCl ₂	8,75
GTP	2,50
ATP	0,75
Zaprinast	0,40

Tabelle 29: Zusammensetzung Resuspensionspuffer

Komponente	Konzentration [mM]
Mops/KOH pH 7,4	50,0
KCl	50,0
NaCl	10,0
DTT	1,0

Die hGC-E wird für den Test in HEK-293 Zellen angezogen (siehe 3.8), geerntet und die absolute Proteinkonzentration des Aufschlusses vor dem Experiment bestimmt. Die gewählte GCAP1- oder Mutanten-Konzentration wird mit den entsprechenden Ca^{2+} -Konzentrationen vorgelegt (gesamt 20 μl). Bei der Bestimmung des IC_{50} -Wertes werden 12 verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen getestet (siehe Tabelle 30). Bei der Bestimmung des EC_{50} -Wertes werden 12 verschiedene Proteinkonzentrationen untersucht. Die genaue GCAP1 Konzentration im Ansatz wird vorweg mittels E_{280} Messung bestimmt (siehe 3.7.9). Die GC (10 μl) wird zum Testansatz gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Es wurde bei den GC-Assays für die Untersuchung der CaF_2 -Partikel Auswirkungen unterschieden ob die Nanopartikel direkt zum Testansatz (hGC-E-Aufschluss) hinzu pipettiert wurden (5 μl 15 mg/ml CaF_2 -Lösung pro 10 Ansätze; N) oder aber schon 5 Tage vor der Zellernte der hGC-E-Zelllinie zugefügt wurden (170 μl 15 mg/ml CaF_2 -Lösung pro Petrischale; NK). Durch Zugabe von 20 μl 2,5 x GC Puffer (Tabelle 28) wird die Reaktion der GC gestartet. Nach 5 Minuten bei 30°C wird durch

50 μl 0,1 M EDTA und einer sofortigen Temperaturerhöhung auf 95°C die Reaktion abgebrochen. Die entstandene cGMP Konzentration wird mittels RP-HPLC (siehe 3.11.4) gemessen. Jede Ca^{2+} - bzw. GCAP Konzentration wird 5 Mal wiederholt.

3.11.2 IC₅₀-Messung

Tabelle 30: Pipettierchema Testansätze IC₅₀-Messung

10 mM K ₂ H ₂ EGTA [μl]	10 mM K ₂ CaEGTA [μl]	$\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_f$
10	0	$1,77 \cdot 10^{-3}$
9	1	0,029
8	2	0,058
7	3	0,099
6	4	0,159
5	5	0,255
4	6	0,405
3	7	0,705
2	8	1,491
1	9	7,688
0	10	33
10 mM CaCl ₂ [μl]	H ₂ O [μl]	$\mu\text{M} [\text{Ca}^{2+}]_f$
0,5	9,5	100

Ziel dieses Experimentes ist es den IC₅₀-Wert (halbmaximale $[\text{Ca}^{2+}]$ bei der die Guanylatzyklase inhibiert wird) zu bestimmen. Hierfür werden 5-10 μM GCAP1 mit den aufgelisteten Ca^{2+} -Konzentrationen (Tabelle 30) in 20 μl vorgelegt. Die Testdurchführung verlief wie oben beschrieben.

3.11.3 EC₅₀-Messung

Ziel der EC₅₀-Messung ist es die zur GC-Inhibierung bzw. -Aktivierung halbmaximal benötigte GCAP Konzentration zu ermitteln. Hierfür werden die GCAP-Konzentrationen 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 3; 5; 10; 15 und 20 µM vorgelegt. Die Ca²⁺-Konzentration wurde bei 0,0018 µM gehalten. Die Testdurchführung verlief wie vorher beschrieben.

3.11.4 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Um die entstandene Konzentration an cGMP zu bestimmen wird eine Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (EliteLACHrome/ VWR Hitachi) durchgeführt. Die Trennung der IC₅₀- und EC₅₀-Produktgemische erfolgte mittels einer LiChrospher®100 (RP-18; 5 µm) -Säule. Die stationäre Phase der Säule besteht aus Silicagel, das mit C-18 Alkylketten modifiziert ist. Als mobile Phase wird 5 mM KH₂PO₄ verwendet. Nach 6-8 min Retentionszeit wird cGMP detektiert. Zur Bestimmung der exakten Retentionszeit wird ein externer cGMP-Standard (500 pmol) in regelmäßigen Abständen mit gemessen. Für die Auswertung werden die cGMP-Peakflächen integriert und von dem Programm (HPLC-LaChrome) in cGMP-Konzentrationen umgerechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Projekt 1:

Biochemische Untersuchung der GCAP1-Mutante L176F

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der in Patienten neu nachgewiesenen GCAP1-Mutante L176F. Die Ergebnisse der Ca^{2+} -Sensitivität und GC-Affinität, die Peshenko et al. 2012 an dieser Mutante untersucht hatten, konnten in den wesentlichen Aussagen bestätigt werden. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit intensiver die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderungen der Mutante untersucht und die daraus resultierenden Fehlfunktionen aufgeklärt.

4.1.1 Funktionalitätsstudien: IC_{50} -Wert

Der IC_{50} -Wert gibt an, bei welcher Ca^{2+} -Konzentration die Aktivität der Guanylate-Cyclase halbmaximal ist. Er ist ein Maß für die Ca^{2+} -Sensitivität des GCAPs. Um die GC-Aktivität zu bestimmen, wird die produzierte cGMP-Konzentration nach 5 Minuten Reaktionszeit bei 30°C mittels HPLC Analyse gemessen und gegen die Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen. Die GCAP1 Konzentration wird konstant auf $10 \mu\text{M}$ gehalten. Die Gesamtproteinmenge der HEK-Zellmembran wird mittels Amidoblack bestimmt und in die Berechnung mit einbezogen. Jede Messung wurde 4-5 Mal wiederholt. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms Sigmaplot12. Über einen sigmoidalen Fit (Hill; 4 Parameter) wurde der IC_{50} -Wert ermittelt.

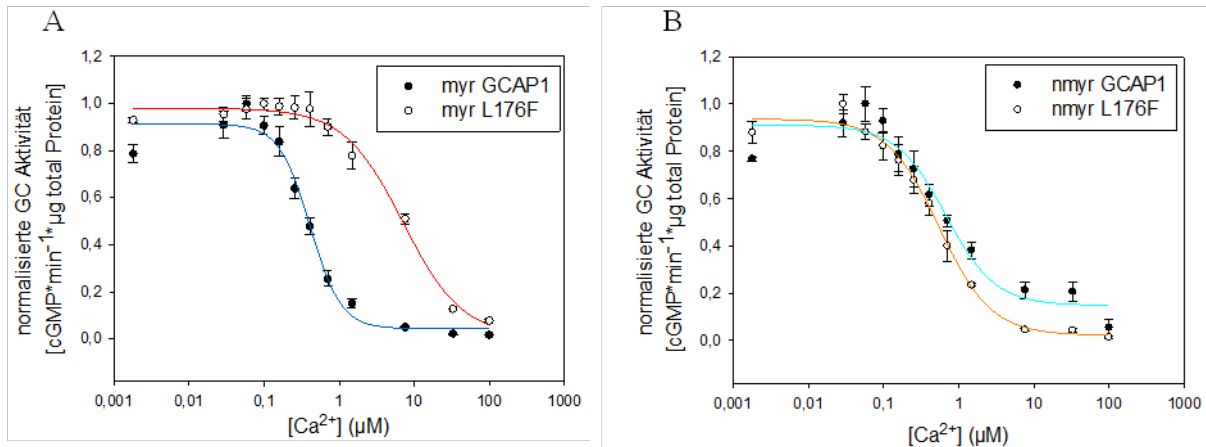


Abbildung 15: IC₅₀-Messung. Produzierte cGMP Konzentration der GC in Gegenwart von 10 µM GCAP1 bzw. L176F (nmyr und myr) in Abhängigkeit der vorhandenen Ca²⁺-Konzentration. Die halbmaximal benötigte Ca²⁺-Konzentration zur Inhibierung der GC ist aus den Graphen mittels einem sigmoidalen Fit (Hill; 4 Parameter) ermittelt worden. Es ergaben sich folgende IC₅₀-Werte: nmyr GCAP1 = 0,67 ± 0,37 µM Ca²⁺; myr GCAP1 = 0,41 ± 0,1 µM Ca²⁺; nmyr L176F = 0,55 ± 0,12 µM Ca²⁺; myr L176F = 7,09 ± 2,78 µM Ca²⁺. Auffallend ist die stark verschobene Ca²⁺-Sensitivität der myr L176F Mutante.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse des IC₅₀-Assays gezeigt. Für nmyr GCAP1 wurde 0,67 ± 0,37 µM Ca²⁺, für myr GCAP1 0,41 ± 0,1 µM Ca²⁺, für nmyr L176F = 0,55 ± 0,12 µM Ca²⁺ sowie 7,09 ± 2,78 µM Ca²⁺ für myr L176F ermittelt. Während die nmyr Mutante sich nicht sonderlich von dem nmyr GCAP1 unterscheidet, liegt der IC₅₀-Wert von myr L176F weit über dem von myr GCAP1. Zur Inhibierung ist fast 20 Mal so viel Ca²⁺ notwendig wie beim WT (GCAP1). Es liegt ein dramatischer Sensitivitätsunterschied der L176F-Mutante zum GCAP1-WT vor. Ob dies an der Ca²⁺-Bindfähigkeit von L176F oder der Signalweiterleitung an die GC liegt, konnte mit diesem Experiment nicht bestimmt werden. Dies wird im Folgenden mit dem Chelator-Assay (siehe 4.1.4) genauer untersucht.

4.1.2 Funktionalitätsstudien: x-fache Aktivierung

Mittels der Daten des IC₅₀-Experimentes (siehe 4.1.1) kann auch die x-fache Aktivierung berechnet werden. Hierfür werden die nicht normierten Ca²⁺-abhängigen spezifischen Aktivitäten aufgetragen und gefittet. Der niedrigste cGMP-Wert wird durch die Differenz von Minimum zu Maximum (die der sigmoidalen Hill Fit/ 4 Parameter vorhersagt; siehe Abbildung 15) geteilt. Die x-fache Aktivierung bezieht die gebildete cGMP Menge pro Zeiteinheit mit ein und ist somit ein Maß für die Produktivität der GCAP/GC-Verbindung.

$$x - \text{fache Aktivierung} = \frac{GC_{Max} - GC_{Min}}{GC_{Min}} \quad (7)$$

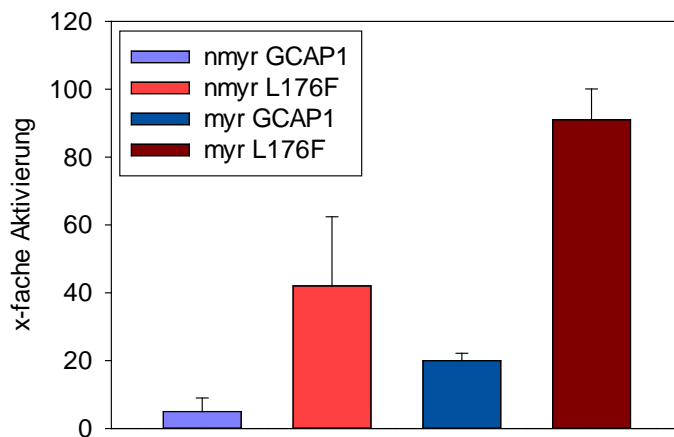


Abbildung 16: x-fache Aktivierung. Die x-fache Aktivierung ist ein Maß für die Produktivität des GC/GCAP Komplexes. Es konnten x-fache Aktivierung von nmyr WT = $5,2 \pm 4,0$; myr WT = $20 \pm 2,2$; nmyr L176F = $42 \pm 20,4$; myr L176F = $91 \pm 9,1$ bestimmt werden. Die Mutante hat sowohl in seiner myristylierten, als auch in ihrer nicht myristylierten Form eine stark erhöhte x-fache Aktivierung.

In Abbildung 16 ist ein Balkendiagramm der ermittelten x-fachen Aktivierungen mit Standardabweichungen zu sehen. Es ergeben sich Werte für die x-fache Aktivierung von $5,2 \pm 4,0$ für nmyr WT $20,0 \pm 2,2$ für den myr WT sowie $42 \pm 20,4$ für die nmyr L176F und für myr L176F = $91 \pm 9,1$. Auffällig sind vor allem die hohen Werte von L176F. Durch die Mutante wird die totale Produktion an cGMP durch die GC sowohl in der nmyr als auch myr Form erhöht. Die Umsatzrate der GC wird also positiv beeinflusst.

4.1.3 Funktionalitätsstudien: EC₅₀-Werte

Der EC₅₀-Wert ist die halbmaximale GCAP1-Konzentration, die benötigt wird, um die GC zu regulieren. Hierfür wird die eingesetzte GCAP1-Konzentration im Test variiert und anschließend gegen die produzierte cGMP-Konzentration aufgetragen. Gefittet werden die Daten mittels Sigmaplot12 (Fit: Einseiten-Bindemodell).

Es wurden die EC₅₀-Werte $8,6 \pm 1,02 \mu\text{M}$ nmyr GCAP1, $4,1 \pm 0,94 \mu\text{M}$ myr GCAP1, $4,23 \pm 1,02 \mu\text{M}$ nmyr L176F sowie $2,13 \pm 0,23 \mu\text{M}$ myr L176F ermittelt. In Abbildung 17 sind die Graphen, aus denen diese Werte errechnet wurden, gezeigt. Auffällig ist, dass im Vergleich zum GCAP1-WT die GC-Affinität der L176F-Mutanten höher ist. Besonders myr L176F hat eine doppelt so hohe Affinität zur GC als myr GCAP1. Die Mutation von Leucin zu Phenylalanin an Position 176 verstärkt demnach die apparente GC-Affinität.

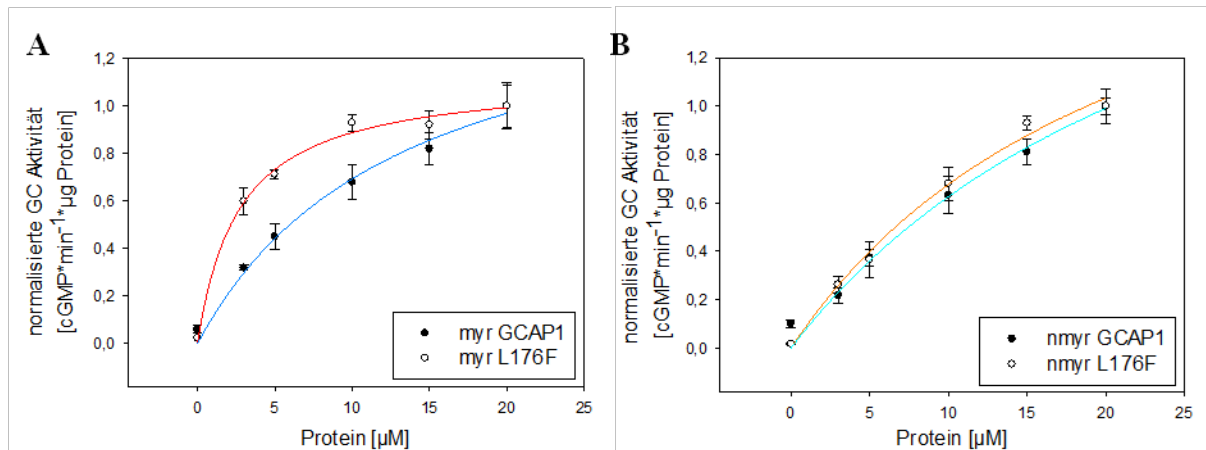


Abbildung 17: EC₅₀-Assay. Der EC₅₀-Wert gibt die apparente Affinität des GCAP Proteins zu seinem Zielprotein, der Guanylatzyklase wieder. Aus den Daten ergaben sich folgende Werte: nmyr GCAP1: $8,6 \pm 1,02 \mu\text{M}$ Protein; myr GCAP1: $4,1 \pm 0,94 \mu\text{M}$ Protein; nmyr L176F $4,23 \pm 1,02 \mu\text{M}$ Protein; myr L176F $2,13 \pm 0,23 \mu\text{M}$ Protein. Die Mutante, vor allem die myristylierte Variante, hat demzufolge eine höhere Affinität zur GC als der WT.

4.1.4 Funktionalitätsstudien: Chelator-Assay

Um zu untersuchen welche Auswirkungen die Mutation auf die Ca²⁺-Sensitivität der EF-Hände hat, wurde ein Chelator-Assay durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Änderung der Absorption des Ca²⁺-Chelators DiBromo-BAPTA während einer Ca²⁺-Titration in Gegenwart des GCAPs gemessen. DiBr-BAPTA konkurriert kompetitiv mit dem Protein um Ca²⁺ je nach Affinität. Solange die Affinität der EF-Hände des NCS-Proteins größer ist, als jene des Chelators, detektiert das DiBromo-BAPTA die freie Ca²⁺-Konzentration. Im Umkehrschluss kann die Menge an gebundenem Ca²⁺ errechnet und gegen die totale Ca²⁺-Konzentration aufgetragen werden. Die Titrationen werden auch in Gegenwart von 1 mM Mg²⁺ durchgeführt. Gefittet werden können die Daten mit dem Programm, CaLigator.

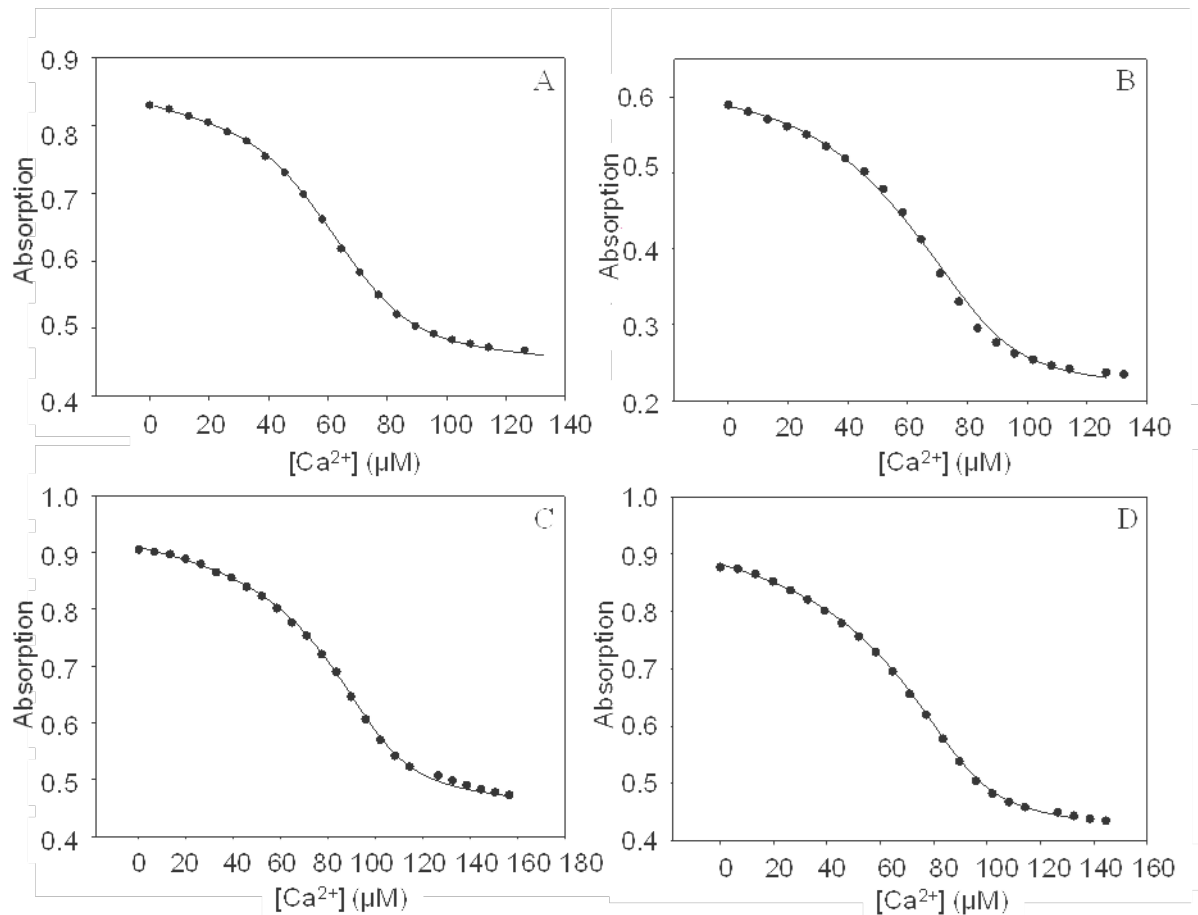


Abbildung 18: Chelator-Assay. Beispielhafte Chelator-Titrationskurven mit Fit. A = nmyr GCAP1 (K_D^{app} : 0,14 μM); B = myr GCAP1 (K_D^{app} : 0,13 μM); C = nmyr L176F (K_D^{app} : 0,17 μM); D = myr L176F (K_D^{app} : 0,13 μM). Aus den Fits konnten pro GCAP-Titration 3 Ca^{2+} -Affinitäten (logK Werte) ermittelt werden (siehe Tabelle 31). Die Werte von L176F und GCAP1 unterscheiden sich nicht auffällig voneinander.

Durch Fitten der Werte mit dem Programm CaLigand wurden die drei einzelnen Ca^{2+} -Affinitäten des GCAPs sowie der K_D^{app} ermittelt (siehe Tabelle 31). Zuverlässige Aussagen geben jedoch nur die Werte der K_D^{app} -Werte. Die drei unterschiedlichen Ca^{2+} -Affinitäten des GCAPs können zwar berechnet werden sind jedoch während der Titration nicht direkt zu erkennen und auch nicht auf einzelne EF-Hände spezifizierbar. In Abbildung 18 werden beispielhafte Titrationskurven für nmyr GCAP1, myr GCAP1, nmyr L176F und myr L176F mit Fit aufgeführt. Die K_D^{app} -Werte von L176F und GCAP1 unterscheiden sich nicht auffällig voneinander. Im Falle von myr L176F ist er sogar gleich mit myr GCAP1 (0,13 μM). Auch die nicht myristylierten Varianten liegen in dem Bereich (nmyr GCAP1 = 0,14 μM ; nmyr L176F = 0,17 μM). Ist Mg^{2+} anwesend, verdoppeln sich fast alle K_D^{app} für nmyr GCAP1 auf 0,2 μM , für myr GCAP1 auf 0,38 μM , für nmyr L176F auf 0,3 μM , und für myr L176F auf 0,47 μM . Unter diesen Bedingungen sind die K_D^{app} -Werte der L176F-Mutante im Gegensatz zu denen des GCAP1-WT leicht erhöht.

Tabelle 31: Auswertung des Chelator-Assays

	$\log K_1$ (μM)	$\log K_2$ (μM)	$\log K_3$ (μM)	K_D^{app} (μM)
nmyr GCAP1	$7,20 \pm 0,20$	$6,50 \pm 0,26$	$3,50 \pm 1,11$	0,14
nmyr GCAP1 Mg²⁺	$6,83 \pm 0,06$	$6,57 \pm 0,12$	$5,63 \pm 0,12$	0,20
myr GCAP1	$6,87 \pm 0,35$	$6,87 \pm 0,35$	$4,07 \pm 0,71$	0,13
myr GCAP1 Mg²⁺	$6,97 \pm 0,15$	$5,87 \pm 0,06$	$2,43 \pm 0,40$	0,38
nmyr L176F	$7,47 \pm 0,06$	$6,07 \pm 0,06$	$2,27 \pm 1,23$	0,17
nmyr L176F Mg²⁺	$6,77 \pm 0,12$	$6,27 \pm 0,06$	$4,00 \pm 0,26$	0,30
myr L176F	$7,52 \pm 0,13$	$6,23 \pm 0,23$	-	0,13
myr L176F Mg²⁺	$6,70 \pm 0,01$	$6,10 \pm 0,15$	$2,40 \pm 1,9$	0,47

Diese Werte erklären nicht die starke Verschiebung der Ca²⁺-abhängigen GC-Inhibierung beim IC₅₀-Assay. Die EF-Hände scheinen durch die Mutation von Leucin zu Phenylalanin an Position 176 nicht maßgeblich in ihrer Ca²⁺-Sensitivität beeinflusst zu werden. Allerdings kann neben einer veränderten Ca²⁺-Affinität der EF-Hände auch eine zu höheren Ca²⁺-Konzentrationen verschobene Signalübertragung von dem GCAP auf die GC Ursache für die höheren IC₅₀-Werte der Mutante sein.

4.1.5 Strukturanalysen: Ca²⁺-shift Assay

Der Ca²⁺-shift Assay diente der qualitativen Strukturanalyse von L176F. Durch die Bindung von Ca²⁺-Ionen verändern GCAPs ihre Konformation. Diese Ca²⁺-gebundene Konformation hat eine höhere elektrophoretische Mobilität, was durch ein schnelleres Laufverhalten in einem SDS-Gel detektiert wird. Durch Zugabe von EGTA oder CaCl₂ wurden Ca²⁺-freie oder Ca²⁺-haltige Bedingungen geschaffen. Die Proteine wurden über ein 12%iges SDS Gel aufgetrennt.

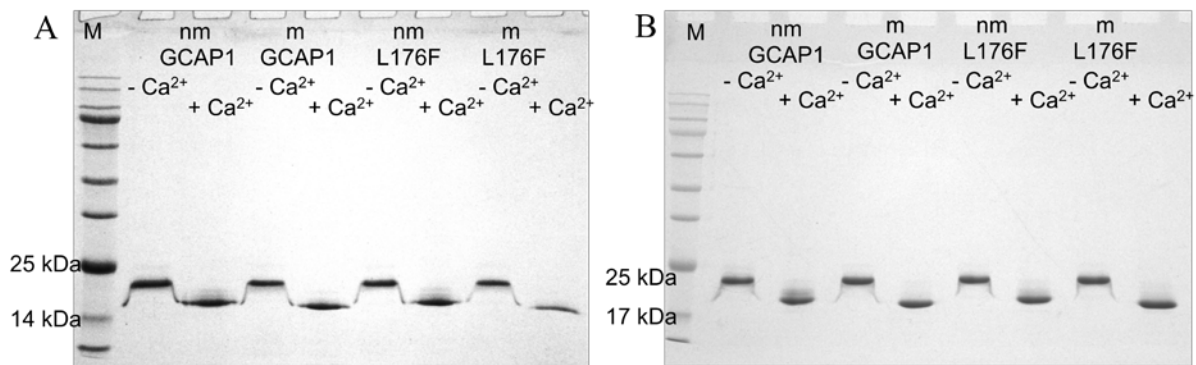


Abbildung 19: Ca²⁺-shift Assay. Die elektrophoretische Mobilität wurde in Gegenwart und in Abwesenheit von Ca²⁺ in einem 12%igen SDS Gel bestimmt. **nm** = nmyr; **m** = myr; **A**: kein Mg²⁺ zugesetzt; **B**: 1 mM Mg²⁺ zum Reaktionsansatz gegeben. Es konnte kein verändertes Laufverhalten der Mutante im Vergleich mit dem WT festgestellt werden.

Die mit Coomassie gefärbten Gele des Ca²⁺-shift Assays sind in Abbildung 19 abgebildet. Es konnte keine veränderte elektrophoretische Mobilität der Mutante im Vergleich zum WT beobachtet werden. Das Bandenmuster von L176F ist identisch mit dem WT (siehe Abbildung 19A). Um den Einfluss von Mg²⁺ auf das Verhalten zu analysieren, wurde das Experiment in Gegenwart von 1 mM MgCl₂ wiederholt (siehe Abbildung 19 B). Auch hier verhält sich die L176F-Mutante wie der GCAP1-WT. Zusätzlich zeigen diese Gele die Reinheit der hergestellten Proteinproben.

4.1.6 Strukturanalysen: Tryptophan-Fluoreszenz

GCAP1 besitzt drei Tryptophane an Position 21, 51 und 94. Durch eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration durchläuft das GCAP1 eine Konformationsänderung, welche auch die Umgebungen der Tryptophane verändert. Unter 1 μM wird die Umgebung und somit auch die Fluoreszenz der aromatischen Tryptophane 21 und 51 beeinflusst. Über 1 μM kann die Fluoreszenzveränderung des Tryptophans 94 beobachtet werden (62).

Die einzelnen Proteinaliquots wurden in Fluoreszenzpuffer gelöst und mit unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen vermischt. Umgehend wurde die Tryptophan-Fluoreszenz bei 280 nm angeregt und dann ein Spektrum von 300 - 400 nm aufgenommen. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei ungefähr 330 nm. Die detektierte Fluoreszenz wurde gegen die Ca²⁺-Konzentration aufgetragen.

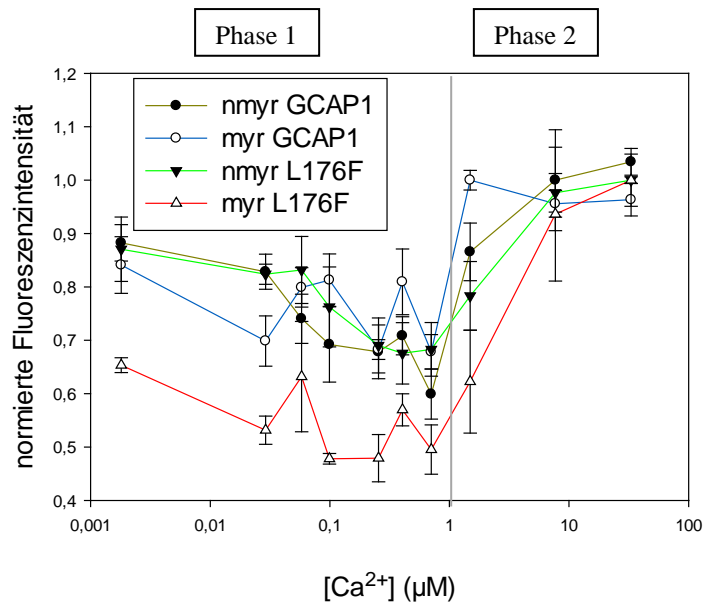


Abbildung 20: Tryptophan-Fluoreszenz ohne Mg²⁺. Die Tryptophan-Fluoreszenz von myr und nmyr GCAP1 sowie myr und nmyr L176F wurde in Gegenwart unterschiedlicher Ca²⁺-Konzentrationen gemessen. Unter 1 μM Ca²⁺ wurde die Fluoreszenz der Tryptophane 21 und 51 (Phase 1) angesprochen, darüber jene des Tryptophans 94 (Phase 2). Im Falle von myr L176F ist die Fluoreszenz – Intensität in der ersten Phase geringer, als bei GCAP1. Die anderen Proteine zeigen keine Auffälligkeiten.

Die Ergebnisse dieser Testreihen sind in Abbildung 20 zusammengefasst. Myr L176F zeigte in Phase 1 eine geringere Emissionsänderung im Gegensatz zu dem WT und den nicht myristylierten Proteinen. Die anderen Messungen zeigen keine Auffälligkeiten. In der ersten Phase werden unter anderem die Veränderungen der Fluoreszenzemission des Tryptophans 51, welches sich in der Myristinsäuretasche des Proteins befindet, detektiert. Teil dieser Tasche ist auch der C-Terminus des Proteins, wo die Mutation lokalisiert ist. Die hydrophobere Aminosäure Phenylalanin kann mit der Myristinsäure stärker interagieren als Leucin und die apo-Form des Proteins möglicherweise stabilisieren. Es scheint, als wäre das myr L176F durch diese hydrophoben Interaktionen in seiner Bewegungsfreiheit eingeschränkt.

Das gleiche Experiment wurde auch in Anwesenheit von 1 mM Mg^{2+} durchgeführt (siehe Abbildung 21).

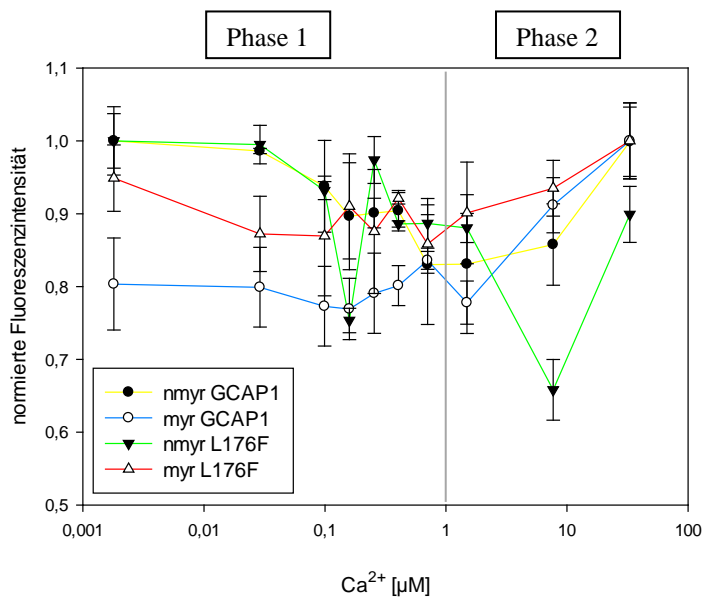


Abbildung 21: Tryptophan-Fluoreszenz mit Mg^{2+} . In Gegenwart von Mg^{2+} entfällt beim myr GCAP1 die erste Phase. Die Fluoreszenz der myr L176F weist nur sehr geringe Schwankungen auf. Die stärksten Ausschläge zeigt hier nmyr L176F, das Protein folgt aber gerade in der ersten Phase dem nmyr GCAP1.

In Anwesenheit von Mg^{2+} entfallen starke Emissionsänderungen während der ersten Phase beim myr GCAP1. Dieser Effekt wird durch die Bindung und Stabilisierung der EF-Hände 2 und 3 mit Mg^{2+} -Ionen erklärt und wurde bereits vorher erläutert (62). In der 2ten Phase steigt die Intensität an. Bei myr L176F sind kaum Schwankungen zu erkennen. Die Ca^{2+} -abhängige Emission der Fluoreszenz verläuft eher tendenzlos. Bei der nmyr Mutante sind die Ca^{2+} -abhängigen Emissionsunterschiede der Fluoreszenz aufeinanderfolgender Ca^{2+} -Konzentrationen stärker als beim nmyr GCAP1, gerade in der 2ten Phase der Tryptophan-Fluoreszenz-Messung. Die Konformationsänderung von nmyr L176F bei hohen Ca^{2+} -Ionen scheint stärker ausgeprägt zu sein, als beim GCAP1.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Experimente, dass durch die Mutation die Ca^{2+} -abhängige Signalweiterleitung in der Mutante L176F gestört ist. Die Ca^{2+} -Konzentration wird zwar über das GCAP detektiert, allerdings sorgt die Mutation dafür, dass die Ca^{2+} -initiierte Konformationsänderung eingeschränkt ist. Aus den EC_{50} -Daten wird eine starke apparente Affinität von L176F zur GC ersichtlich. Dies führt zwar zu einer höheren cGMP Produktion des GCAP/GC Komplexes, sorgt jedoch für eine abnormale Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung, die das Übermitteln der umgebenden Ca^{2+} -Konzentration von L176F an die GC zu höheren Konzentrationen verschiebt. Der GC/GCAP Komplex weist dadurch eine geringe Ca^{2+} -Sensitivität auf.

4.2 Projekt 2: Einwirkungen von CaF₂ auf das GCAP/GC System

Dieser Teil der Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die CaF₂-Nanopartikel als Transportsystem für GCAPs in Frage kommen. Dafür ist unter anderem notwendig, zu untersuchen, in welchem Verhältnis die Nanopartikel GCAPs binden und ob sie toxisch auf ein Zellsystem wirken oder die Funktionsweise des GCAP/GC-Systems bzw. die Affinität des GCAPs an die GC beeinflussen. Das gesamte Projekt wurde zusammen mit der Forschungsgruppe um Daniele Dell'Orco (Universität Verona) bearbeitet, der in vorangegangenen Tests herausfand, dass die GCAPs keine permanente Bindung mit den Nanopartikeln eingehen, sondern von diesen, aufgrund von Konzentrationsgradienten, auch wieder dissoziieren können (4.2.1). Da die GCAP-Bindung an die CaF₂-Nanopartikel wahrscheinlich über die EF-Hände erfolgt, wurden alle Versuche nicht nur mit dem myr GCAP1-WT sondern auch mit der geringer Ca²⁺-sensitiven myr D100E-Mutante durchgeführt. Unterschiede zwischen myr GCAP1 und myr D100E können Hinweise auf die Bindung vom GCAP an Nanopartikel liefern (Zur Vereinfachung wird im Folgenden auf das Hinweisen der Myristylierung verzichtet).

4.2.1 Vorversuche (durchgeführt von Daniele Dell'Orco):

Die Vorversuche wurden von Daniele Dell'Orco durchgeführt und begutachtet, bevor weitere Experimente geplant wurden. Die folgenden, einführenden Experimente sind noch nicht veröffentlicht und werden hier nur kurz beschrieben, da sie für die Diskussion, der während dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, benötigt werden.

Bindung von GCAP1 bzw. D100E an CaF₂-Nanopartikel

Der hydrodynamische Teilchendurchmesser R_h wird mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) gemessen. Bewegt sich ein Teilchen in einer Flüssigkeit haften an dessen Oberfläche geladene Teilchen. Eine Zunahme des R_h zeigt eine Bindung oder Aggregation an. Daniele Dell'Orco untersuchte mit diesem Test, ob Nanopartikel GCAP1 und D100E binden können. Durch die Zugabe einer 11,7 μ M GCAP1-Lösung konnte eine Zunahme des R_h von CaF₂-Nanopartikel um 19% (CaF₂: 23,42 \pm 0,51 nm; CaF₂/GCAP1 27,93 \pm 0,52 nm) beobachtet werden. Das Experiment wurde mit D100E und CaF₂-Nanopartikel wiederholt. Hier konnte

eine Zunahme der R_h ca. 13% (CaF_2 : $23,11 \pm 0,43$ nm; $\text{CaF}_2/\text{D100E}$ $26,18 \pm 1,2$ nm) beobachtet werden. Beide Proteine können also an CaF_2 -Partikel binden oder aggregieren.

Dissoziation von GCAP1 bzw. D100E von CaF_2 -Partikel

Um die Dissoziation von GCAP1 und D100E von CaF_2 -Partikeln zu untersuchen, wurden Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR) Experimente durchgeführt. SPR ist eine spektroskopische Methode, um Protein-Protein-Wechselwirkungen oder andere biomolekulare Interaktionen zu messen. Ein Bindungspartner wird auf einer Dextran-Gold-Oberfläche über seine Cysteine oder Amine gebunden. Monochromatisch polarisiertes Licht wird über ein Glasprisma in einem Winkel, der größer ist als der Winkel der Totalreflexion, eingestrahlt. Durch die Verbindung mit dem Edelmetall wird ein Plasmon generiert. Die Energie, die für die Erzeugung des Plasmons benötigt wird, kann durch den Winkel des reflektierten Lichtes bestimmt werden. Die Oberfläche wird nun mit dem zweiten Bindungspartner umspült. Durch eine Massenzunahme der Dextran-Matrix ändert sich der Brechungsindex und daraus resultierend der Winkel der Totalreflexion. Dies wird detektiert.

GCAP1 und D100E wurden auf der Oberfläche des Sensorchips gebunden, anschließend wurden CaF_2 -Partikel über die Zelle geleitet. Es konnte eine Volumenzunahme auf dem Sensorchip festgestellt werden, die bei Einstellung des CaF_2 -Partikel Stroms wieder zurück geht. Die CaF_2 -Partikel können also an GCAP1 bzw D100E binden oder aggregieren und wieder dissoziieren. Es konnten Dissoziationskonstanten k_{off} (in 5 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM KCl) von $7,3 \pm 0,7$ für GCAP1 und CaF_2 sowie $7,6 \pm 1$ bestimmt werden. Unter Ca^{2+} -freien Bedingungen dissoziieren die Nanopartikel 1,5 Mal schneller von D100E als von GCAP1 ($7,8 \pm 0,7$ für GCAP1/ CaF_2 ; $12 \pm 1,4$ für D100E/ CaF_2). Die Zugabe von 1 mM Mg^{2+} erhöht die Dissoziationskonstanten erheblich ($7,8 \pm 0,7$ für GCAP1/ CaF_2 ; $12 \pm 1,4$ für D100E/ CaF_2). Dieser Test beweist, dass GCAP1 bzw. D100E von den Nanopartikeln dissoziieren können.

Berechnung der einzusetzenden Menge an CaF_2 für die vollständige Bindung von GCAP1 bzw. D100E (theoretische Stöchiometrie)

Für die geplanten Versuche dieser Arbeit wurde die theoretische Stöchiometrie der GCAP1- bzw. D100E-Bindung an die Nanopartikel berechnet. Hieraus ließ sich in den weiteren Versuchen der Einsatz an Nanopartikeln abschätzen. Die Stöchiometrie wurde über folgende Formel ermitteln:

$$N_{max}^{myrGCAP1} = \frac{4\pi(r_{NP} + r_{myrGCAP1})^2}{\pi r_{myrGCAP1}^2} \quad (8)$$

$r_{myrGCAP1} = 2,7 \text{ nm}$; $r_{NP} = 23,5 \text{ nm}$

Der Radius des myr GCAP1 ($r_{myrGCAP1} = 2,7 \text{ nm}$) wurde aufgrund der veröffentlichten GCAP1 Struktur aus Huhn (*Gallus gallus*) von Stephen et al. (2007) berechnet (131).

Der Radius der Nanopartikel wurde mittels DLS ermittelt. Hierfür wurde als Referenz myr GCAP1 vermessen. Ebenfalls wurde eine Lösung mit myr GCAP1 und CaF_2 gemeinsam vermessen. Aus diesen Daten konnte ein r_{NP} von 23,5 nm errechnet werden. Dies ist eine Näherungslösung, da man bei dieser Berechnung die CaF_2 -Nanopartikel als sphärisch (kugelförmig) und nicht als kubisch (würfelförmig) betrachtet.

Mit diesen Werten ergibt sich ein stöchiometrischer Wert ($N_{max}^{myrGCAP1}$) von 144.

$N_{max}^{myrGCAP1}$ ist jedoch nur ein theoretischer Wert, der davon ausgeht, dass GCAP1 immer in gleicher geometrischer Anordnung und mit uneingeschränkter Affinität an die CaF_2 -Partikel bindet. Aufgrund der Vereinfachungen wurde der theoretische Wert praktisch durch isotherme Titrationskalorimetrie (siehe 4.2.3) überprüft.

In Zusammenarbeit mit Daniele Dell'Orco wurden alle weiteren Versuche geplant um CaF_2 -Partikel auf die Tauglichkeit zum GCAP1-Transport-System hin zu untersuchen.

4.2.2 Einfluss von CaF_2 auf HEK-293 Zellen

Um zu untersuchen, ob die CaF_2 -Partikel einen negativen Einfluss auf ein Zellsystem haben, wurde der Phänotyp von CaF_2 -behandelten, HEK-293 Zellen, die stabil GC exprimieren, über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet.

Für diesen Versuch werden zu passagierten, 2 Tage angewachsenen HEK-293 Zellen, 200 μl einer 15 mg/ml CaF_2 -Lösung gegeben. Diese Konzentration entspricht, bezogen auf 100 μl des Versuchsansatzes für die IC_{50} - und EC_{50} -Experimente, einem Verhältnis von 1 GCAP-Molekül zu 144 Nanopartikeln (berechneter stöchiometrischer Wert von Daniele Dell'Orco, siehe 4.2.1). Anschließend wird die Kultur weitere fünf Tage kultiviert und schlussendlich mit 1x PBS gewaschen und geerntet. Durch das Waschen, Aufschließen und Abzentrifugieren ist die endgültige Konzentration der Nanopartikel im Testsystem ungewiss. Mit diesem Test werden somit eher die Auswirkungen auf das Zellsystem analysiert. Das Wachstum der Zellen

wurde mittels mikroskopischer Aufnahmen im Durchlicht (Lichtmikroskop EvoS_{fe}, 10x Objektive) dokumentiert.

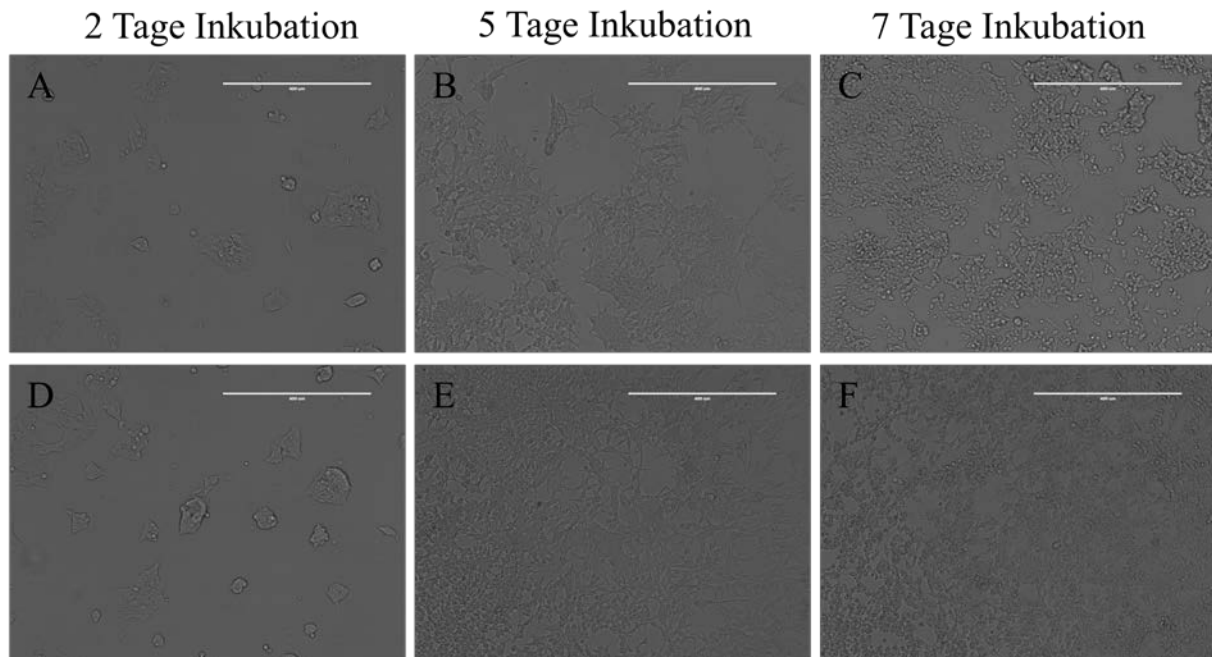


Abbildung 22: Wachstumsanalyse HEK-293 Zellen ohne und mit CaF₂ behandelt. A-C: Wachstum der stabilen hGC-E Zelllinie ohne Nanopartikelzugabe; D-F: Wachstum der stabilen hGC-E Zelllinie nach Zugabe von 200 µM CaF₂ (15 mg/ml). Dokumentiert sind drei verschiedene Wachstumsstadien A, D: Tag 2 nach Passagierung (bei D Zugabe von Nanopartikeln); B, E: Tag 5 nach Passagierung; sowie C, F am Tag der Ernte. Auffällig ist, dass das Wachstum durch die Zugabe von Nanopartikeln beschleunigt wurde. Die Expression war nicht beeinflusst.

In Abbildung 22 ist eine Übersicht des Zellkulturwachstums zu erkennen, was zu erkennen lässt, dass die Nanopartikelzugabe einen positiven Effekt auf das Zellwachstum hatte. Der mit CaF₂-behandelte Zellrasen ist nach wenigen Tagen zugewachsen (siehe Abbildung 22 D-F), während der unbehandelte Zellrasen (siehe Abbildung 22 A-C) nur ca. 80% des Zellwachstums zeigt. Die Expression des auf dem pIRES-Vektor kodierten Proteins war nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Stöchiometriebestimmung Nanopartikel und GCAP1/D100E

Um zu bestimmen, wie viele GCAP Moleküle an ein Nanopartikel binden können, wurde eine isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt. Für die Durchführung des Experimentes wird eine GCAP1-Lösung vorgelegt und eine Titration mit Nanopartikeln durchgeführt. Die Bindung der beiden Moleküle wird über eine Änderung der Temperatur erfasst und in kcal/sec gegen das molare Verhältnis angegeben.

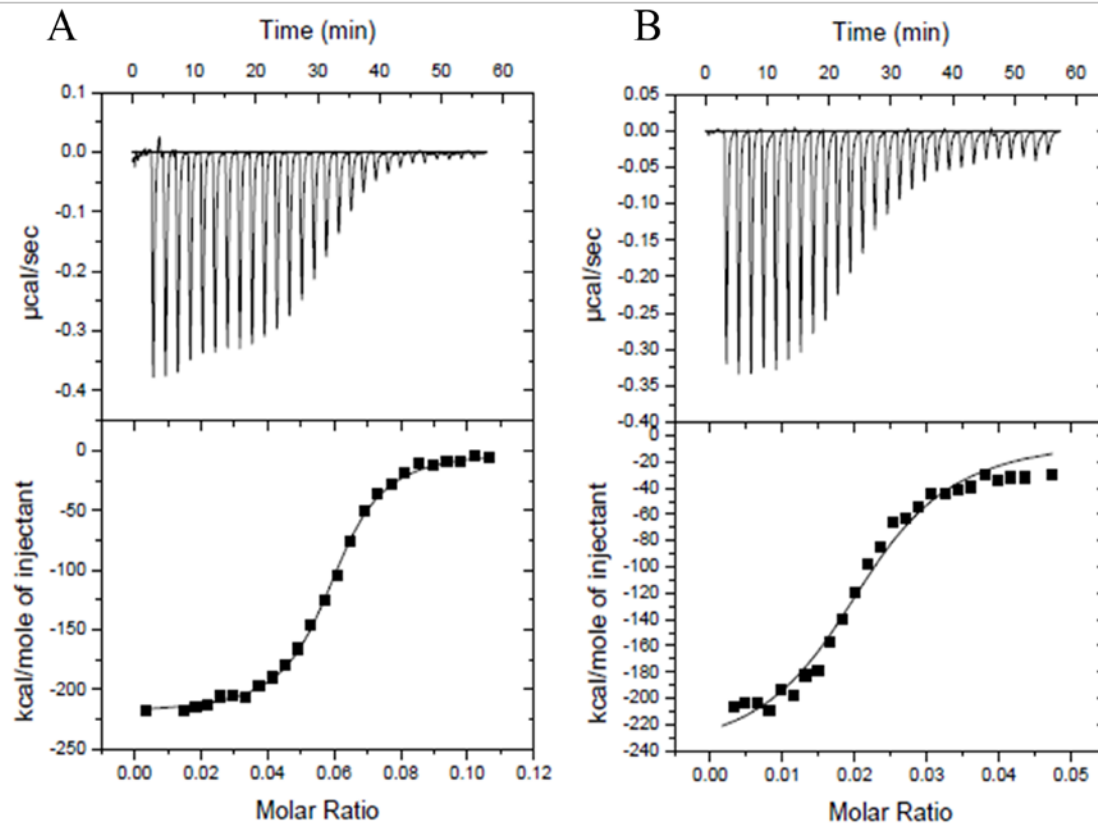


Abbildung 23: Isotherme Titrationskalometrie von GCAP1 und D100E mit CaF₂. A: ITC von GCAP1 mit CaF₂. Aus dem Fit ergibt sich ein Verhältnis von $16 \pm 0,02$ GCAP1 Moleküle, die an einem Nanopartikel binden können. Die errechnete Dissoziationskonstante beträgt $12,1 \pm 1,01$ nM. Die Reaktion ist exotherm $2751 \pm 4,4$ kcal/mol. B: ITC von D100E mit CaF₂. Aus dem Fit konnte ein Bindungsverhältnis ($N_{max}^{myrGCAP1}$) von $54 \pm 1,4$ D100E Molekülen zu einem Nanopartikel berechnet werden. Die Dissoziationskonstante beträgt $23,4 \pm 1,14$ nM und die Reaktion verläuft exotherm $140,5 \pm 5,2$ kcal/mol.

Die erhaltenen Datenpunkte werden mittels der Software Origin (Origin LabCooperation) mit einem Einseitenbindemodell ausgewertet. Aus dem Fit der Titration (Abbildung 23) kann unter anderem die Bindungszahl ($N_{max}^{myrGCAP1}$), die Dissoziationskonstante (K_D), die Enthalpie (ΔH) und der Chi-2-wert (χ^2) für GCAPs und für D100E mit CaF₂-Partikeln berechnet werden (siehe Tabelle 32).

Es werden um die $16 \pm 0,02$ GCAP1-Moleküle bzw. $54,4 \pm 1,4$ Moleküle der Mutante D100E an die Nanopartikel gebunden. Diese Werte unterscheiden sich deutlich von den berechneten 144 Moleküle pro Nanopartikel, was mehrere Ursachen haben könnte. Der Diskussion vorgegriffen sei erwähnt, dass die Ausgangskonzentration der CaF₂-Partikel eine sehr schwer zu bestimmende Komponente ist.

Hervorzuheben ist, dass 3 Mal so viel D100E an die CaF₂-Partikel binden kann als GCAP1.

Die Dissoziationskonstanten der Titration sind $12,1 \pm 1,01$ nM für den WT mit CaF₂ und $23,4 \pm 1,14$ nM für D100E mit CaF₂. Die Dissoziationskonstante von GCAP1 an die

Nanopartikel ist sogar geriner als die von Ca^{2+} an GCAP1. Demzufolge sind die Affinitäten von D100E und GCAP1 für die CaF_2 -Nanopartikel höher als für die GC.

Die Bindung von GCAP1 und D100E an CaF_2 verläuft exotherm (ΔH für den WT: -275,1 kcal/mol und für D100E: -140,5 kcal/mol). Diese Werte sind sehr hoch verglichen mit den bekannten ΔH -Werten von um die 0-7 kcal/mol für die Bindung von Ca^{2+} an GCAP (siehe Doktorarbeit Petra Behnen, 2010). Die Bindung von Nanopartikeln und GCAP1 verläuft demnach stark exotherm und bedarf keiner weiteren Energiezufuhr.

Tabelle 32: Daten der ITC Auswertung für GCAP1 und D100E

	$N_{max}^{myrGCAP1}$	K_d [nM]	ΔH [kcal/mol]	Chi^2/DoF
WT	$16,0 \pm 0,02$	$12,1 \pm 1,01$	$-275,050 \pm 4,4$	70887500
D100E	$54,4 \pm 1,40$	$23,4 \pm 1,14$	$-140,530 \pm 5,2$	52002000

4.2.4 Funktionalitätsstudien: IC_{50} -Assay

Der IC_{50} -Wert gibt die halbmaximale Ca^{2+} -Konzentration an, die benötigt wird um die GC mittels GCAP zu inhibieren bzw. zu aktivieren. Eine Abweichung vom WT kann dramatische Folgen auf die Wiederherstellung des Dunkelzustandes der Photorezeptoren haben. Um Nanopartikel als Transport-System für GCAPs einsetzen zu können, muss die Funktionalität der GCAPs nach dem Transport gesichert sein.

Für den IC_{50} -Assay sind zwei verschiedene experimentelle Bedingungen getestet worden. Zum einen sind Nanopartikel im Verhältnis 1:144 GCAPs (Stöchiometrische Berechnung siehe 4.2.1) zu dem Testansatz zugegeben worden (N). Zum anderen sind Nanopartikel im gleichen Verhältnis zu den GC produzierenden HEK-Zellen (fünf Tage vor der Ernte, siehe 3.8.2) gegeben worden (NK). Auch mit diesen Zellen als GC-Quelle sind die IC_{50} - und EC_{50} -Werte bestimmt worden. Gemessen wurde die produzierte cGMP-Konzentrationen der GC binnen 5 Minuten Reaktionszeit in Anwesenheit von 10 μM GCAP1 bzw. D100E bei unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen.

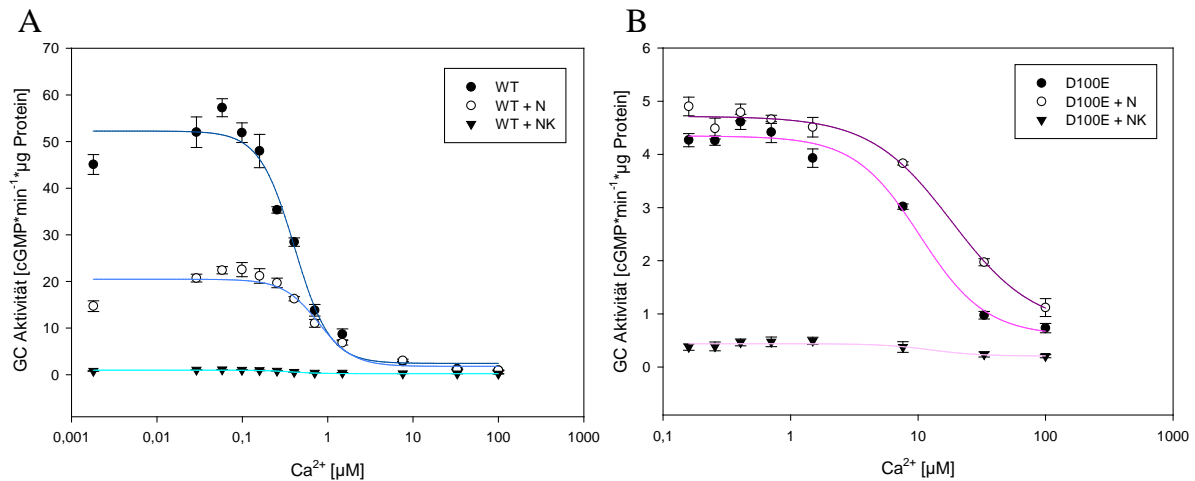


Abbildung 24: IC₅₀-Assay: Einfluss von Nanopartikeln. Der IC₅₀-Wert wurde in Anwesenheit von Nanopartikeln bestimmt um deren Einfluss auf die Ca²⁺-abhängige GC-Aktivierung. Hierfür wurden Nanopartikel (Verhältnis 144 Proteinmoleküle: 1 Nanopartikel) direkt zum Versuchsansatz hinzugefügt (N) oder 5 Tage vor der Zellernte zur hGC-E exprimierenden Zellkultur gegeben (NK). **A** Die IC₅₀-Werte des GCAP1-WT (A) variieren nur gering in Gegenwart von Nanopartikeln: GCAP1-WT = 0,41 ± 0,1 μM Ca²⁺; GCAP1-WT + N = 0,78 ± 0,36 μM Ca²⁺; GCAP1-WT + NK = 0,34 ± 0,14 μM Ca²⁺. Die x-fache Aktivierung hingegen wird stark von den Nanopartikeln beeinflusst GCAP1-WT = 20,4 ± 2,2 ; GCAP1-WT + N = 10,4 ± 1,7; GCAP1-WT + NK = 2,7 ± 0,6. **B** Die produzierte cGMP-Konzentration der D100E-Mutante ist generell kleiner, was zu höheren Schwankungen in der Berechnung des IC₅₀-Wertes führt, aber auch hier sind die Werte nah beieinander auch in Gegenwart von Nanopartikeln: D100E = 10,4 ± 4,4 μM Ca²⁺; D100E + N = 18,5 ± 8,0 μM Ca²⁺; D100E + NK = 13,6 ± 20,0 μM Ca²⁺. Die x-fache Aktivierung sinkt in Gegenwart von Nanopartikeln, ähnlich wie beim GCAP1: D100E = 6,3 ± 1,1; D100E + N = 5,4 ± 1,3; D100E + NK = 1,1 ± 0,6.

In Abbildung 24 wird deutlich, dass die produzierte cGMP-Konzentration durch die Zugabe von Nanopartikeln (N) stark erniedrigt ist. Vor allem beim Einsatz der mit Nanopartikeln behandelten HEK-Zellen (NK), ist ein starker Abfall des gebildeten cGMP zu verzeichnen. Dieser Unterschied schlägt sich im Wert der x-fachen Aktivierung nieder: GCAP1-WT = 20,4 ± 2,2; GCAP1-WT + N = 10,4 ± 1,7; GCAP1-WT + NK = 2,7 ± 0,6. Ein ähnlicher Abfall wurde auch im Falle der D100E-Mutante beobachtet: D100E = 6,3 ± 1,1; D100E + N = 5,4 ± 1,3; D100E + NK = 1,1 ± 0,6. Die IC₅₀-Werte variieren hingegen nicht besonders stark, weder beim GCAP1-WT noch bei der D100E-Mutante (WT = 0,41 ± 0,1 μM Ca²⁺; WT + N = 0,78 ± 0,36 μM Ca²⁺; WT + NK = 0,34 ± 0,14 μM Ca²⁺; D100E = 10,4 ± 4,4 μM Ca²⁺; D100E + N = 18,5 ± 8,0 μM Ca²⁺; D100E + NK = 13,6 ± 20,0 μM Ca²⁺). Schlussfolgernd kann durch diese Experimente herausgestellt werden, dass durch die Nanopartikel die Ca²⁺-Sensitivität der GCAPs nicht direkt beeinflussen, die produzierte cGMP Konzentration jedoch auffällig gering ist.

4.2.5 Funktionalitätsstudien: EC₅₀-Assay

Der EC₅₀-Wert ist ein Maß für die apparente GC-Affinität der GCAPs. In diesem Projekt sollten durch CaF₂-Partikel hervorgerufene Störungen der GC-Affinität untersucht werden. Um zu entscheiden, ob Nanopartikel als Transportsystem für GCAPs in Frage kommen, darf die apparente GC-Affinität nicht beeinflusst sein.

Gemessen wurde die produzierte cGMP-Konzentrationen der GC in Ca²⁺-freier Umgebung binnen 5 Minuten Reaktionszeit. Die GCAP1- bzw. D100E-Konzentrationen wurden variiert. Zusätzlich wurden Nanopartikel direkt zum Testansatz gegeben (N) oder aber eine fünf Tage mit Nanopartikeln behandelte stabil exprimierende GC-E HEK-Zelllinie (NK) als GC Quelle eingesetzt. Die resultierenden Werte sind gemittelt und mit Standardabweichung aufgetragen worden. Gefittet wurden die Daten mittels SigmaPlot12 (Einseiten-Bindemodell).

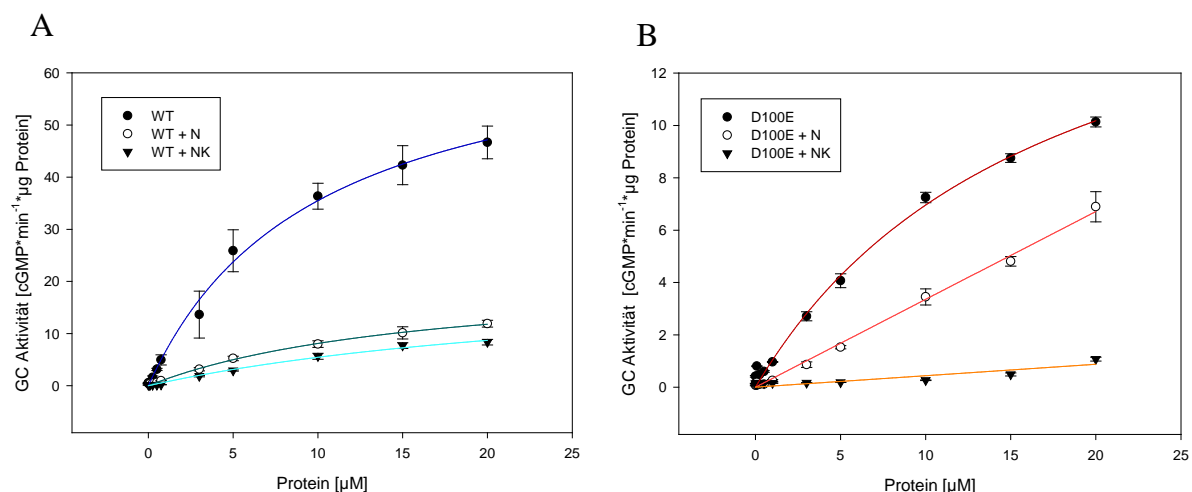


Abbildung 25: EC₅₀-Assay: Einfluss von Nanopartikeln. Der EC₅₀-Wert ist in Anwesenheit von Nanopartikeln bestimmt worden, um deren Einfluss auf die Interaktion von GCAP1 und GC zu studieren. Hierfür wurden Nanopartikel (Verhältnis 144 Proteinmoleküle: 1 Nanopartikel) direkt zum Versuchsansatz hinzugefügt (N) oder 5 Tage vor der Zellernte zur hGC exprimierenden Zellkultur gegeben (NK). Die EC₅₀-Werte des GCAP1-WT (A) variieren stark in Gegenwart von Nanopartikeln: WT = 9,8 ± 2,4 µM GCAP1; WT + N = 16,6 ± 3,8 µM GCAP1; WT + NK = 29,4 ± 14,0 µM GCAP1. Wird der Versuch mit der Mutante D100E (B) durchgeführt, ist die produzierte cGMP-Konzentration generell sehr viel geringer. N und NK des D100E-Experimentes sind durch die mangelnde Sättigung der Kurve nicht auswertbar. Der ermittelte EC₅₀-Wert für den Versuchsaufbau ohne Nanopartikeln beträgt: 17,2 ± 6,6 µM D100E.

Für den GCAP1-WT ergeben sich folgende EC₅₀-Werte: WT = 9,8 ± 2,4 µM GCAP1; WT + N = 16,6 ± 3,8 µM GCAP1; WT + NK = 29,4 ± 14,0 µM GCAP1. Auffällig ist, dass durch Zugabe von Nanopartikeln der EC₅₀-Wert fast doppelt so hoch ist (16,6 ± 3,8 anstatt 9,8 ± 2,4 µM GCAP1), also doppelt so viel GCAP1 benötigt wird, um die GC halbmaximal zu aktivieren. Gibt man die Nanopartikel schon fünf Tage vor der Zellernte zu der GC exprimierenden Zellkultur, erhöht sich dieser Wert weiter (29,4 ± 14,0 µM GCAP1). Im Falle

von D100E sind die generierten cGMP- Konzentrationen generell geringer. Dies und die mangelnde Sättigung der Kurven bedingt die unzureichende Auswertung der D100E- Experimente, die mit Nanopartikeln durchgeführt wurden. Der EC_{50} -Wert für D100E ohne Nanopartikel liegt bei $17,2 \pm 6,6 \mu\text{M}$ D100E. Aus den Graphen wird eindeutig ersichtlich, dass mit Nanopartikeln der EC_{50} -Wert erhöht wird (siehe Abbildung 25). Die Nanopartikel scheinen also einen erheblichen Einfluss auf die GCAP/GC-Interaktion oder auf die Verfügbarkeit der Proteine für eine normale Bindung zu haben.

4.2.6 Einfluss der Nanopartikel auf die hGC-E Konzentration in stabilen Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die verminderte cGMP-Produktion (siehe 4.2.4) darauf zurückzuführen ist, dass die von den Nanopartikeln dissoziierten GCAPs nicht mehr funktionstüchtig sind oder aber die hGC-E durch die CaF_2 -Partikel beeinflusst wird, wurde die hGC-E-Konzentration in Gegenwart von Nanopartikeln ($170 \mu\text{l}$ 15 mg/ml CaF_2 pro 9 cm Schale) untersucht.

Teil 1:

Zuerst ist die hGC-E-Konzentration in stabilen Zelllinien überprüft worden. Hierfür ist aufgeschlossenes Zelllysate über ein SDS-Gel aufgetrennt und mit hGC-E Antikörper (ROS-hGC-E, Santa Cruz) behandelt worden.

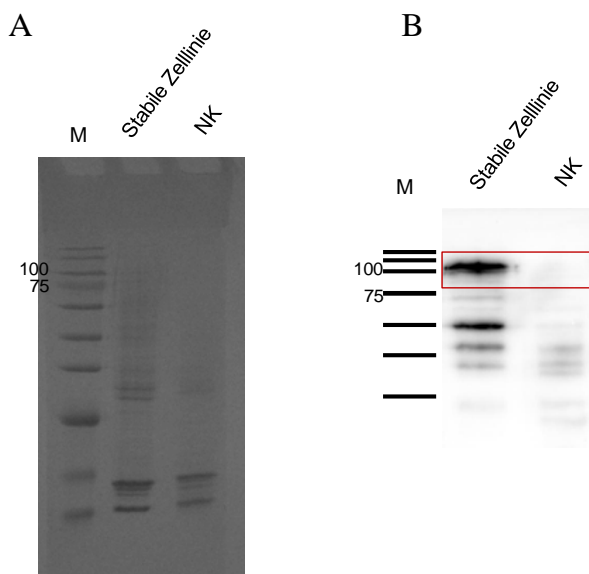


Abbildung 26: analysiertes Zelllysate stabiler hGC-E Zelllinien, mit und ohne CaF_2 behandelt. A: Coomassie-Gel; B: Westernblot mit hGC-E Antikörper behandelt, beide Geltaschen wurden mit der gleichen Konzentration an Gesamtprotein beladen. Der rote Kasten markiert den Größenbereich in dem die hGC-E liegt. Bei der stabilen Zelllinie, die 5 Tage mit Nanopartikeln inkubiert wurde, ist keine hGC-E-Bande zu erkennen (NK). In der Kontrolle (stabile Zelllinie) ist die Bande gut sichtbar.

In Abbildung 26 A ist ein Coomassie-gefärbtes Gel gezeigt, das den Aufschluss einer stabilen Zelllinie und einer Zelllinie, die fünf Tage mit CaF_2 inkubiert wurde (NK) enthält. Obwohl die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden, ist zu sehen, dass im Falle einer CaF_2 -Behandlung nicht das gesamte Protein in das Gel eingewandert sein kann. Die gefärbten Proteinbanden sind schwächer als bei der Kontrolle. Bei Behandlung mit dem hGC-E Antikörper (Abbildung 26 B) wird außerdem sichtbar, dass die Konzentration an hGC-E im Gel deutlich verringert wurde, sodass sie durch diese Analyse nicht mehr zu detektieren ist.

Teil 2:

Um entscheiden zu können, ob die hGC-E an die Nanopartikel wirklich bindet oder die Inkubation mit CaF_2 zu einem Abbau des Proteins führt, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Hierbei wurde der Aufschluss einer unbehandelten Zellkultur in vier 100 μl Aliquotes aufgeteilt und mit 5 μl 15 mg/ml CaF_2 für 1, 2 und 4 Stunden bei RT inkubiert. Über ein SDS-Gel und einen Westernblot mit anschließendem immunchemischem Antikörpernachweis ist die hGC-E Konzentration der Ansätze visualisiert worden.

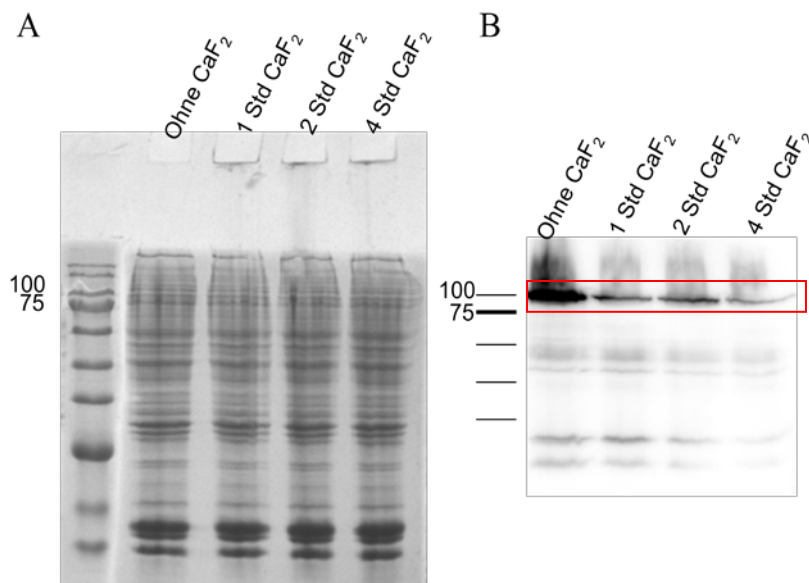


Abbildung 27: Nachweis der hGC-E bindenden Wirkung von CaF_2 . Zu sehen sind 100 μl eines Zellaufschlusses einer stabilen hGC-E-Zelllinie, die mit 5 μl 15 mg/ml CaF_2 für 1, 2 sowie 4 Std bei RT inkubiert wurde. **A:** Coomassie-Gel – es sind gleiche Proteinmengen aufgetragen worden. Das Bandenmuster zeigt keinen Hinweis auf einen Abbauprozess der hGC. **B:** Antikörpernachweis der hGC-E. Die hGC Bande bei 100 kDa (roter Kasten) nimmt mit zunehmender Dauer der CaF_2 Behandlung ab.

In Abbildung 27 wird gezeigt, dass durch die Anwesenheit von CaF_2 in den Ansätzen die Konzentration an hGC-E mit zunehmender Inkubationsdauer geringer wird. In den Geltaschen des Coomassie gefärbten Gels (Abbildung 27 A) ist bei Anwesenheit von Nanopartikeln ein Proteinrest in den Taschen angefärbt worden. Das Bandenmuster hat sich jedoch durch Inkubation mit CaF_2 nicht verändert. In Abbildung 27 B ist der Antikörpernachweis der hGC-E gezeigt. Die Bande bei 100 kDa ist jene der hGC-E, alle weiteren Banden können

Kreuzkopplungen des Antikörpers oder aber Abbauprodukte der hGC-E sein. Man erkennt, dass die Intensität der hGC-E Bande sowie der weiteren Banden mit zunehmender Inkubationsdauer abgeschwächt wird (Abbildung 27 B). Auch die anderen Banden verlieren an Intensität, jedoch verändert sich das Bandenmuster nicht (Abbildung 27 A), was gegen einen Abbau der GC durch Nanopartikel spricht. Die Membran wurde nach der Detektion mittels Amidoblack gefärbt (Daten nicht gezeigt) um sicher zu stellen, dass kein Übertragungsfehler beim Blotten den Intensitätsunterschied der hGC-E-Bande verursacht hat. Die Membran zeigte das gleiche Muster wie das Coomassie Gel. Die Zugabe der Nanopartikel scheint vor allem die hGC-E zu binden, sodass diese nicht ins Gel einwandern können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Anwesenheit von Nanopartikeln das GCAP/GC-System durch die Aggregation der GC negativ in ihrer x-fachen Aktivierung und apparenten GC-Affinität beeinflusst, jedoch nicht die Ca^{2+} -Sensitivität der GCAPs.

5. Diskussion

5.1 Biochemische Untersuchung der GCAP1-Mutante L176F

Die Mutante L176F

Die GCAP1 Mutante L176F wurde 2014 von Nicole Weißschuh in Tübingen das erste Mal bei Patienten mit Makula-Dystrophie diagnostiziert (siehe Anhang Vocke et al. 2016). Makula-Dystrophie beschreibt eine Degeneration am Ort des schärfsten Sehens, der Makula. Hier ist die höchste Zapfendichte der Retina. Je nach Krankheitsstadium, können Symptome wie eine Sehschärfeminderung, Farbsinnstörungen, zentraler Gesichtsfeldausfall und auch Blendungsempfindlichkeit auftreten. Dass eine Mutation des GUCA1-Gens, das die Erbinformation für das GCAP1 trägt, diese Krankheit auslöst, ist allerdings ungewöhnlich. Generell sind Mutationen auf diesem Gen meistens für Zapfen-Dystrophien oder Stäbchen- und Zapfen-Dystrophien verantwortlich (siehe Tabelle 1). Die biochemische Beschreibung sowie die Strukturaufklärung der GCAP1-Mutante L176F sind wichtig um zu verstehen, welche Eigenschaften diese Mutante charakterisieren und warum sie zum Absterben von Photorezeptoren führen. Weiterführend hilft es zu verstehen, warum Makula-Dystrophie durch diese Mutation ausgelöst wird. Dies sind die ersten Schritte für mögliche Therapieansätze.

Um zu untersuchen, welche Auswirkung die Mutation auf die Funktion des Proteins hat, wurde der IC_{50} -Wert ermittelt, der verglichen mit GCAP1, auffällig erhöht ist (von $0,41 \pm 0,1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ auf $7,09 \pm 2,78 \mu\text{M Ca}^{2+}$; siehe 4.1.1). Da die Ca^{2+} -abhängige GC-Regulierung eine Kernfunktion des GCAPs darstellt, ist dieser große Unterschied in der Ca^{2+} -Sensitivität entscheidend für die gesamte Funktion des Proteinkomplexes GC/GCAP. Es kommt zu einer Störung der Homöostase der sekundären Botenstoffe, da cGMP nicht wie vorgesehen bei einer bestimmten Ca^{2+} -Konzentration produziert, bzw. die Synthese inhibiert, wird. Das wirkt sich auf die Wiederherstellung des Dunkelzustandes aus. Hier übernimmt die von der GC gesteuerte cGMP-Produktion eine der wichtigsten Funktionen in der Photorezeptorzelle, nämlich die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der CNG-Kanäle (39, 105, 132). Aber warum hat die Mutante L176F so dramatische Auswirkungen auf den GCAP1/GC-Komplex und damit einhergehend auf die Wiederherstellung des Dunkelzustandes in der Zelle? Warum

ist der punktuelle Aminosäureaustausch schädlich für den Photorezeptor? Und warum führt diese Mutation zu dem beobachteten Krankheitsbild der Makula-Dystrophie?

Die veränderte Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung der Mutante

Eine Besonderheit der Mutation ist die Position. Die meisten der anderen bekannten GCAP1-Mutationen, die mit Netzhauterkrankungen korrelieren, befinden sich in der Nähe der EF-Hände 3 und 4 (siehe Tabelle 1). Meist hat eine Mutation eine Veränderung der Ca^{2+} -Affinität zur Folge (siehe 1.5.3). Ebenso wie bei der Mutante L176F ist der IC_{50} -Wert der GCAP1 Mutationen deutlich erhöht oder aber auch erniedrigt. Bei Mutationen, die direkt diesen Bereich betreffen, ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass hier die Funktionsweise des Ca^{2+} -Bindemotives gestört wird. Bei L176F ist jedoch keine aktive EF-Hand in näherer Umgebung.

Um zu erforschen, warum die Mutation trotzdem eine retinale Krankheit hervorruft, wurde über die Tryptophan-Fluoreszenz (siehe 4.1.6) die Konformationsänderung bei Ca^{2+} -Bindung untersucht. In diesem Verfahren wird die Fluoreszenz der drei im GCAP vorkommenden Tryptophane angeregt und die Emission detektiert. Die Konformationsänderung des Proteins wird durch Ca^{2+} -Bindung induziert, dies verändert die Umgebung der aromatischen Aminosäure. Zwischen 0 und 1 μM Ca^{2+} ist eine Beeinflussung der Konformationsänderung auf die Tryptophane 21 und 51 zu beobachten. Genau hier unterscheiden sich myr GCAP1 und myr L176F am Auffälligsten. Die erwartete Verringerung der Fluoreszenzemission bei steigender Ca^{2+} -Konzentration (bis zu 1 μM Ca^{2+}) ist bei der Untersuchung von myr L176F ausgeblieben. Die Veränderung der Fluoreszenzemission ist viel geringer, als die des GCAP1 (siehe Abbildung 20). Nmyr L176F zeigt hingegen ein, dem nmyr GCAP1 ähnliches Verhalten in dieser Phase. Ab einer Ca^{2+} -Konzentration von 1 μM wird vor allem die Konformationsänderung um das Tryptophan 94 detektiert. Hier verhalten sich nmyr und myr L176F wie GCAP1. Das Ergebnis kann demnach in zwei Phasen unterteilt werden. Das Tryptophan 51, deren Umgebung in der ersten Phase beeinflusst wird, befindet sich in der Umgebung der

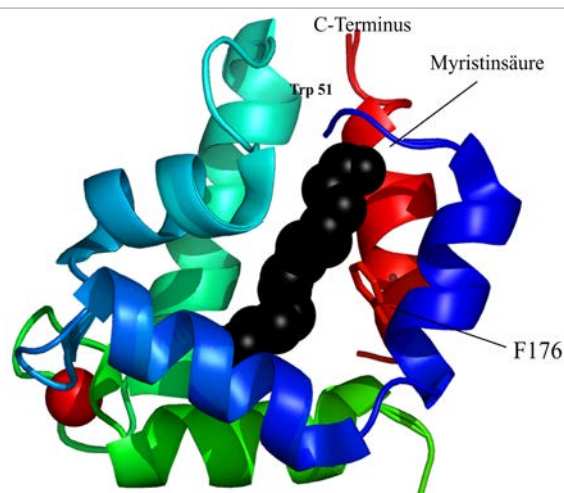


Abbildung 28: Lage der Mutation L176F. Berechnet mit Swiss-Model (142), visualisiert mit PyMOL (143). Grundlage: GCAP1 aus Huhn (132).

Myristinsäure. Die Myristinsäure befindet sich in einer Tasche, die sowohl C- als auch N-Terminus miteinschließt. Auf der gegenüber liegenden Seite dieses Tryptophans, befindet sich L176F (siehe Abbildung 28). Bei der GUCA1-Gen Mutation wurde ein Leucin durch ein Phenylalanin im GCAP1 ausgetauscht. Das Phenylalanin ist hydrophober als das Leucin, was auch die Mutante L176F in dem Bereich hydrophober macht. Die Myristinsäure ist eine posttranslationäre Modifikation des GCAPs, die durch ihre C₁₂ Kette stark hydrophob ist. Da bei der Mutation L176F eine Veränderung der Hydrophobizität in dieser Tasche erfolgt, ist es durchaus möglich, dass die geringe Änderung der Tryptophan-Emissionsfluoreszenz aufgrund der mangelnden Flexibilität dieser Region zustande kommt. Das Protein ist durch diese Mutation sozusagen starrer und kann sich nicht wie gewohnt formieren. Dadurch ist die Änderung der Tryptophan-Emissionsfluoreszenz bei niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen geringer.

Das gleiche Experiment wurde auch in Gegenwart von Mg²⁺ durchgeführt. Die Versuchsbedingungen liegen an den physiologischen Bedingungen im Photorezeptor, wo hohe millimolare Mg²⁺-Konzentrationen vorliegen. GCAPs binden neben Ca²⁺- auch Mg²⁺-Ionen, welche das Protein in ihrer Ca²⁺-freien Form stabilisieren. Bei der Messung der Tryptophan-Emissionsfluoreszenz in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen entfällt die erste Phase (siehe Abbildung 21). Dies kann dadurch erklärt werden, dass Mg²⁺-Ionen von GCAP1 gebunden und durch Ca²⁺-Ionen ausgetauscht werden. Die erwartete Konformationsänderung, kann erst bei höheren Ca²⁺-Konzentrationen beobachtet werden. Peshenko und Dizhoor (2006) erklären dieses Phänomen ausführlich in ihrer Arbeit (62). Die Fluoreszenz des Tryptophans 94 (Phase 2), zeigt aber trotz Mg²⁺-Anwesenheit eine Steigerung der Emission. Das Tryptophan 94 wird bei Ca²⁺-Bindung der vierten EF-Hand stärker in die Innenseite des Proteins gekehrt, als bei der recht lockeren Mg²⁺-Konformation (62).

In dieser Arbeit wurde auf Unterschiede zwischen GCAP1 und L176F bei diesem Experiment geachtet. Die Mutante L176F zeigt in ihrer myristylierten Form extrem geringe Änderung der Emission der Tryptophan-Fluoreszenz bei unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentration. Diese sind wesentlich geringer als beim GCAP1-WT. Dies kann mit einer erhöhten Mg²⁺-Sensitivität der L176F-Mutante im Gegensatz zum WT erklärt werden. In Daniele Dell'Orcos Arbeitsgruppe wurde mit der myr L176F eine Mg²⁺-Titration durchgeführt (siehe Anhang: Vocke et al, 2016). Diese Methode ist der Messung der Ca²⁺- abhängigen Tryptophan-Emissionsfluoreszenz sehr ähnlich, mit dem Unterschied, dass die Mg²⁺-Konzentration in einem Ca²⁺-freien System erhöht wird. Auch bei dieser Methode wird die Tryptophan-

Emissionsfluoreszenz gemessen. Bei dem Versuch konnte eine 10-fach erhöhte Mg^{2+} -Affinität von myr L176F im Gegensatz zum GCAP1-WT festgestellt werden (myr L176F \sim 120,6 μ M; myr GCAP1 \sim 1,22 mM). Außerdem erhöht die Mg^{2+} -Bindung die thermische Stabilität von L176F stärker als vom GCAP1-WT (siehe Anhang: Vocke et al, 2016). Die starke Affinität von myr L176F zu Mg^{2+} könnte dazu führen, dass das Protein schon eine vollständige Konformationsänderung am Anfang des Ca^{2+} -Tryptophan Fluoreszenz Experimentes in Anwesenheit von Mg^{2+} durchlaufen hat. Ca^{2+} wird nicht mehr vollständig gegen Mg^{2+} ausgetauscht. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration zeigt deshalb keine sichtbaren Unterschiede in der Fluoreszenz. Dieser Effekt wurde nicht beim nmyr L176F beobachtet. Hier sind die Änderungen der Fluoreszenzemission der einzelnen Ca^{2+} -abhängigen Tryptophan-Messung sogar auffälliger als beim GCAP1-WT. Die Myristinsäure scheint daher die Mg^{2+} -Affinität positiv zu beeinflussen.

Der Grund für die verschobenen Ca^{2+} -Sensitivität der L176F-Mutante

Die Ergebnisse werfen die Frage auf, warum die Ca^{2+} -Sensitivität der L176F-Mutante geringer ist, oder um konkreter zu werden, ob die EF-Hände des Sensorproteins durch die Inflexibilität und die Mg^{2+} -Affinität beeinflusst werden? Um das zu untersuchen wurde ein Chelator-Assay durchgeführt (siehe 4.1.4). Bei diesem Experiment wird untersucht, wie viel Ca^{2+} an GCAP1 bindet. Er misst im Gegensatz zum IC_{50} -Assay die direkte Interaktion zwischen Ca^{2+} und GCAP1 und nicht die Ca^{2+} -abhängige, durch GCAP-gesteuerte Aktivität der GC. Die Ca^{2+} -Bindeeigenschaften der EF-Hände von L176F wurden untersucht und mit dem GCAP1-WT verglichen. Es konnten zwar kleine Unterschiede festgestellt werden, allerdings keine auffallenden, die den hohen IC_{50} -Wert der Mutante erklären würden (siehe Abbildung 18). Die EF-Hände scheinen also nicht direkt beeinflusst. Allerdings verdeutlicht dieser Test, dass eine hohe Mg^{2+} -Affinität der Mutante die Ca^{2+} -Sensitivität nicht dramatisch beeinflusst.

Wieso hat der L176F/GC-Komplex aber dann eine verringerte Ca^{2+} -Sensitivität? Wieso zeigt die Mutante eine veränderte Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung, wenn doch die Ca^{2+} -Sensitivität der EF-Hände nicht beeinflusst ist?

Schaut man sich die Ergebnisse des EC_{50} -Wertes an, so sieht man, dass die Affinität der Mutante zur GC höher ist, als die des WT (siehe Abbildung 17). Dies kann ebenfalls durch eine stärkere Bindung des GCAPs an die GC erklärt werden, wie bei Peshenko et al. (2014)

postuliert. Durch die C-terminale Mutante des GCAP1 L176F und die damit einhergehende höhere Hydrophobizität (Austausch von Leucin zu Phenylalanin) ist die Seite des GCAP1 weniger mobiler, die als Bindungsstelle mit der GC gilt. Die Bindung zwischen GCAP1 und GC wird bei der Mutante L176F intensiviert, was die Möglichkeit einer Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung vermindert. Die Mutante ist sozusagen weniger flexibel. Durch die Fixierung von L176F an GC-E kann die Ca^{2+} -abhängige Konformations-Information, nicht in der Effektivität des GCAP1/GC-Komplex, vermittelt werden. Somit stützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Theorie eines „ Ca^{2+} -Myristoyl-Tugs“ von Peshenko et al. (2012) (siehe Abbildung 11) (88). Erst bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ist die Konformationsänderung von L176F so stark, dass die GC inhibiert werden kann.

Ein weiteres Indiz für eine verstärkte GC-Bindung ist auch die hohe x-fache Aktivierung der Mutante. Sowohl myristyliert, als auch nicht myristyliert ist die Produktion von cGMP der GC in Verbindung mit der Mutante L176F erhöht (siehe Abbildung 16). Dieser Effekt weist ebenfalls auf eine starke L176F/GC-Bindung hin. L176F triggert eine höhere Produktionsrate durch eine stärkere Interaktion. Das mutierte GCAP1 kann die GC besser aktivieren, auch wenn die Information über die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration nicht wie beim GCAP1/GC Komplex übermittelt werden kann.

Zusammenfassend konnte durch die Testreihe herausgestellt werden, dass die erhöhte Hydrophobizität der Mutante, die Affinität zur GC erhöht und die Flexibilität, die notwendig ist um auf geringe Ca^{2+} -Konzentrationen zu reagieren, senkt.

Auswirkungen der Mutation auf die Sehfähigkeit

L176F sorgt für eine sehr viel längere und höhere cGMP-Produktion des GCAP/GC-Systems im Photorezeptor, trotz ansteigender Ca^{2+} -Konzentrationen (siehe x-fache Aktivierung Abbildung 16). cGMP ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff des Photorezeptors. Bei der Mutante L176F kann aufgrund des höheren IC_{50} -Wertes, schon ein geringer Rückgang der Ca^{2+} -Konzentration die cGMP-Produktion der GC anregen. Auch die Tatsache, dass L176F mehr cGMP produziert als der WT stört die cGMP/ Ca^{2+} -Homöostase des Photorezeptors. Eine Veränderung der cGMP-Homöostase kann eklatante Folgen für den Photorezeptor haben. So führt beispielsweise eine Akkumulation von cGMP zum Absterben des Photorezeptors (133). Warum sterben die Photorezeptoren dann aber erst mit zunehmendem Alter des Patienten ab? Und warum nur in dem Bereich der Makula?

Über diese Ursache lässt sich bisher nur spekulieren.

Eventuell wird auf Proteinlevel den Auswirkungen der Mutante L176F entgegengewirkt. Zwei Proteine kommen in Frage um hier regulierend zu wirken. Zum einen die Phosphodiesterase (i) und zum anderen GCAP2 (ii):

(i) Die Phosphodiesterase (PDE) ist der Antagonist der GC. Sie wandelt cGMP in GMP um und wirkt somit der cGMP-produzierenden Guanylatzyklase entgegen.

(ii) GCAP2 reguliert die GC in einem anderen Ca^{2+} -Bereich als GCAP1. Eine Inhibierung durch GCAP2 erfolgt bei viel geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen oder anders ausgedrückt: eine Aktivierung der GC mit ausschließlich GCAP2 erfolgt erst nach einem sehr starken Abfall der Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen (Ausführliche Beschreibung siehe 1.5.1). Ohne vorhandene GCAP1-Mutation ist vor allem die Ca^{2+} -Sensitivität des GCAP1 ausschlaggebend für eine normale Funktionsweise des GCAP/GC Komplexes. Die Regulierung über GCAP2 kann vernachlässigt werden (81). In unserer Arbeitsgruppe favorisieren wir ein Modell, bei dem GCAP1 und GCAP2 unterschiedliche Andockstellen an der GC haben (134). Auch wenn die Mutante an der GC gebunden ist, bindet also auch noch das GCAP2, was generell die Guanylatzyklase regulieren kann.

PDE und GCAP2 könnten, rein spekulativ, aufgrund ihrer Aktivität oder ihres Expressionsniveaus die Auswirkungen der GCAP1 Mutante L176F ausgleichen. Eine erhöhte Expression oder Aktivität der PDE könnte beispielsweise die zu große cGMP-Konzentration im Photorezeptor abbauen. Auch könnte GCAP2 in Verbindung mit L176F mehr Einfluss auf die GC-Aktivität haben. Es könnten natürlich auch andere Rückkopplungsmechanismen im Photorezeptor die erhöhte cGMP-Konzentration, die durch die GCAP1 Mutante L176F ausgelöst wird, abbauen. Vielleicht wird das übermäßig gebildete cGMP von der Zelle in Einschlüssen oder ähnlichem aufgefangen. Diese oder ähnliche Prozesse könnten die Photorezeptorzellen schützen. Erst mit zunehmendem Alter der Patienten versagen die Ausgleichmechanismen der Photorezeptoren, sodass es zu Dystrophien kommt. Die Alterung des Systems wird durch verschiedene Umwelteinflüsse begünstigt. Der Effekt wird besonders in der Makula, die Region im Auge mit der höchsten Zapfendichte, sichtbar. Allerdings ist dies rein spekulativ und müsste erst experimentell bewiesen werden.

Dass die Mutation sich vor allem im Bereich der Makula auswirkt, kann viele Ursachen haben. Es sei auch erwähnt, dass in einer Patientenfamilie ebenfalls Zapfen-Dystrophie festgestellt wurde (siehe Anhang: Vocke et al., 2016). Ein Absterben der Zapfen außerhalb der Makula wird also auch durch diese Mutation bedingt, kommt aber durch die hohe

Zapfendichte in der Makula mehr zum Tragen. Gerade dieser Bereich der Retina wird durch äußere Einflüsse wie beispielsweise blaues Licht, stark beansprucht (135). Jedes Bild, das wir scharf sehen, fokussieren wir über Photorezeptorzellen der Makula. Viele Makula Degenerationen und Makula-Dystrophien werden durch äußere Einflüsse begünstigt. Auch die Alterung der Retina und des genetischen Materials sowie die damit einhergehende Ansammlung von Abbauprodukten im Pigmentepithel, begünstigt das Absterben der Photorezeptorzellen. Bei der Makula-Dystrophie, die durch die Mutante L176F hervorgerufen wird, werden solchen Prozesse wahrscheinlich dazu beitragen, dass die Ausgleichmechanismen der Photorezeptorzellen im zunehmenden Alter der Patienten versagen und die Krankheit ausbricht.

5.2 CaF₂-Nanopartikel als Wirkstoff-Transport-System für GCAPs

CaF₂-Partikel als Transportsystem für GCAPs

Wirkstoff-Transportsysteme werden immer häufiger genutzt, um gezielt gegen Krankheiten vorzugehen (107, 136). Für GCAPs wurde so ein Transportsystem noch nicht entwickelt obwohl zahlreiche GCAP1-Mutationen, die retinale Krankheiten hervorrufen, bekannt sind. GCAPs binden drei Ca²⁺-Ionen. Ein Transport durch die Bindung an eine Ca²⁺-tragende Oberfläche ist naheliegend. Dass GCAPs an die Nanopartikel binden, konnte durch die SPR-Experimente von Daniele Dell'Orco (siehe 4.2.1) und die ITC-Experimente dieser Arbeit (siehe 4.2.3) bewiesen werden. Um zu analysieren, ob CaF₂-Partikel für GCAPs als Transportsystem in Frage kommen, muss die Funktionalität des GCAPs unbeeinflusst bleiben. Außerdem muss die Stöchiometrie einer GCAP/CaF₂-Bindung bestimmt werden um das Bindungsverhalten zu analysieren und eine exakte Dosierung für spätere Anwendungen berechnen zu können.

Stöchiometrie: Unterschied zwischen gemessenem und berechnetem Wert

Um zu untersuchen ob das rechnerische Verhältnis von 1:144 (Nanopartikel: GCAP) (siehe 4.2.1) realistisch ist, wurde eine isotherme Titrationskalorimetrie (siehe 4.2.3) durchgeführt. Die Ergebnisse der Titrations sind allerdings nicht ganz so hoch, wie erwartet. Gemessen

wurde ein Verhältnis von $16 \pm 0,02$ für die Bindung von WT an Nanopartikel und von $54 \pm 1,4$ für die Mutante D100E. Aber warum liegen diese Werte so stark unter den Berechneten?

Bei der Berechnung von $N_{max}^{myrGCAP1}$ (1:144) geht man von vielen Vereinfachungen aus (siehe 4.2.1). So werden die Nanopartikel als sphärisch betrachtet, GCAPs haben eine uneingeschränkter Affinität zu den Nanopartikeln und ordnen sich darüberhinaus immer in gleicher geometrischer Anordnung an die CaF_2 -Partikel an. Der theoretische $N_{max}^{myrGCAP1}$ -Wert ist demzufolge nur eine Annäherungslösung, die wie erwartet über dem gemessenen Wert liegt.

Für D100E und GCAP1 wurde die gleiche Ausgangslösung an CaF_2 -Nanopartikel genutzt. Der Stöchiometrieunterschied der beiden untereinander ist also durchaus aussagekräftig. Die Menge an D100E die an einen CaF_2 -Partikel gebunden werden kann ist 3 Mal so hoch wie die Menge an GCAP1 (siehe 4.2.3).

Warum können CaF_2 -Partikel mehr D100E als WT GCAP1 binden?

Dies könnte mehrere Gründe haben: GCAP1-Mutanten sind häufig nicht so stabil wie der GCAP1-WT und anfälliger gegenüber Temperaturunterschieden, Aggregation und Missfaltungen. Daniele Dell'Orco et al. (2014) zeigten, dass D100E nicht so temperaturstabil ist wie der WT (105). Es könnte demnach sein, dass einige D100E Moleküle nicht voll funktionsfähig sind. Dies könnte die ITC-Werte beeinflusst haben. Da jedoch die EC_{50} - und IC_{50} -Messungen keine Auffälligkeiten zeigten, ist dieser Erklärungsansatz eher unwahrscheinlich.

Die Reaktionen von CaF_2 und GCAP1 bzw. D100E sind stark exotherm mit auffallend hohen Werten (siehe 4.2.3). Ob es sich bei diesen Werten um eine Bindung von D100E an CaF_2 -Partikel oder einer anderen exothermen Reaktion die bei 25°C eingeleitet wird (wie Aggregation) handelt, kann schwer bestimmt werden. Natürlich wurden Blindwerte aufgenommen und von den Ergebnissen abgezogen. Aggregatbildung an der CaF_2 -Partikeloberfläche können allerdings experimentell nicht von einer wirklichen Bindung an die Ca^{2+} -Ionen der Oberfläche der Partikel unterschieden werden. Es könnte sein, dass die Mutante D100E anfälliger für eine Aggregatbildung an der CaF_2 -Oberfläche ist.

Eine andere Erklärung für die höhere Stöchiometrie von D100E an Nanopartikel könnte aber auch die Art der Mutation von D100E liefern. Die Position D100E befindet sich in der Nähe

der EF-Hand 3. Durch diese Mutation wird die Funktionalität und die Ca^{2+} -Sensitivität des Proteins stark beeinflusst (105). Der WT hat drei funktionelle Ca^{2+} -Bindestellen mit denen er an die Oberfläche des Nanopartikels binden kann. Eventuell kann die Mutante D100E nur mit einer oder zwei EF-Händen (am wahrscheinlichsten) an die CaF_2 -Partikel binden, da die Mutation nicht nur die Ca^{2+} -Sensitivität sondern auch die Konformation des Proteins beeinflusst. Dies würde bedeuten, dass drei Mal so viele Moleküle an der Oberfläche Platz finden würden, insofern es keine sterische Hinderung gibt. Da der Wert des WT genau 1/3 des Wertes der Mutante ist, könnte diese Erklärung sehr wohl zutreffen. Daniele Dell'Orco konnte in seinen Vorversuchen (siehe 4.2.1) eine 1,5 Mal schnellere Dissoziation der D100E/ CaF_2 -Bindung im Vergleich zur GCAP1/ CaF_2 -Bindung feststellen. Auch diese schnelle Dissoziation könnte durch weniger Bindungsstellen von D100E im Vergleich zu GCAP1 an CaF_2 -Partikel hervorgerufen werden. Dies zu beweisen ist allerdings schwer. Ein Volumenzuwachs an der Oberfläche mag noch durch spektroskopische Methoden wie DLS oder einer Veränderung des Interferenzmusters (z.B. BSI: „back scattering interferometry“) nachzuweisen sein. Ob es sich hier um Aggregationen an der Oberfläche oder eine Bindung direkt an die CaF_2 -Partikel unter anderer Ausrichtung bzw. über weniger Bindestellen handelt, ist nicht so einfach zu unterscheiden. Da jedoch genau die 3-fache Menge D100E an die Nanopartikel gebunden wird, ist die Möglichkeit, dass D100E nur über eine und der WT über drei EF-Hände gebunden wird, durchaus wahrscheinlich.

Einfluss der Nanopartikel auf GCAP1

Der IC_{50} -Wert ist ein Maß für die Ca^{2+} -Sensitivität des GCAP/GC Komplexes. Dieser Wert wird für die Charakterisierung der verschiedenen GCAPs und deren Mutationen stets gemessen. Eine Verschiebung in der Ca^{2+} -Sensitivität des Komplexes wirkt oft letal auf die Photorezeptoren (137). Aus diesem Grund wurde der IC_{50} -Wert von GCAP1 und D100E in Gegenwart der Nanopartikel bestimmt. Änderungen der Ca^{2+} -Sensitivität würden CaF_2 -Partikel als Transportsystem ausschließen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings keine dramatischen Änderungen des IC_{50} -Wertes (siehe 4.2.4). Die x-fache Aktivierung und die Maximale Aktivität der GC ist hingegen durch die Anwesenheit der Nanopartikel stark beeinflusst (siehe 4.2.4). Der Wert für x-fachen Aktivierung der GC des GCAP1-WT ohne Nanopartikel liegt bei $20,4 \pm 2,2$, in Anwesenheit von CaF_2 (N) sinkt er auf $10,4 \pm 1,7$, während er bei der Zugabe der Nanopartikel zu der GC produzierenden Zellkultur (NK) nur noch $2,7 \pm 0,6$ beträgt. Ebenso sinkt die maximal produzierte Menge an cGMP (siehe 4.2.4).

Bei der Mutante D100E verhält es sich ähnlich. Wieso wirken die Nanopartikel sich dermaßen stark auf die x-fache Aktivierung und auch auf die Maximale Aktivität, aber nicht auf die Ca^{2+} -Affinität aus?

Daniele Dell'Orco konnte in DLS- und SPR-Dissoziationsexperimenten belegen, dass GCAP1 zwar an die Nanopartikel bindet, jedoch auch wieder dissoziiert (siehe 4.2.1). Kann es sein, dass durch die Bindung an die CaF_2 -Partikel die Funktion des GCAPs beeinträchtigt wird? Dagegen spricht, dass der IC_{50} -Wert unverändert ist. Würde GCAP1 durch die Bindung an die Nanopartikel Schaden nehmen, würde sich wahrscheinlich auch dieser Wert verändern. In der Theorie geht man davon aus, dass die GCAPs mit den EF-Händen an die Nanopartikel binden. Somit müsste sich die Ca^{2+} -Sensitivität der Proteine verändern, wenn das Protein nicht dissoziiert oder Schaden durch die CaF_2 -Bindung nimmt. Eine Änderung in der x-fachen Aktivierung und der maximalen GC-Aktivität spricht eher für eine Konzentrationsänderung von GC oder GCAP in dem experimentellen Ansatz: Ist im Testansatz eines der beiden Proteine nicht in ausreichender Menge vorhanden, kann kein bzw. nur wenig cGMP hergestellt werden. Die Ca^{2+} -Sensitivität des gebildeten Komplexes wird dadurch nicht beeinflusst. Das bedeutet, dass durch die Bindung von GCAP oder GC an die Nanopartikel, diese dem Gleichgewicht für die Bildung eines GCAP/GC-Komplexen entzogen sind. Die Nanopartikel könnten die GCAPs zu so hohen Teilen binden, dass die GC-Aktivierung beeinflusst wird. Es ist auch möglich, dass durch die Bindung von GCAP an die Nanopartikel der Bereich des GCAPs verändert wird, der für die Bindung an die GC zuständig ist. Diese Erklärung ist aber sehr unwahrscheinlich, da nur ein bestimmter Bereich des GCAPs durch die CaF_2 -Bindung Schaden nehmen müsste. Desweiteren könnte vermutet werden, dass eine nicht gewollte, irreversible Faltung durch die CaF_2 -Partikel ausgelöst wird. Auch könnte die Bindung an die CaF_2 -Oberfläche einen Verlust einer O- oder OH-Gruppe einer EF-Hand an die Partikel nach sich ziehen. Solche chemischen Reaktionen ohne Katalysator in einem physiologischen System sind aber eher unwahrscheinlich. Außerdem müsste bei einer Veränderung der EF-Hände auch der IC_{50} -Wert verändert sein. Es würde ebenfalls nicht erklären, warum gerade bei Zugabe der Nanopartikel zu der GC exprimierenden Zellkultur die x-fache Aktivierung den geringsten Wert beträgt. Der Unterschied hierbei liegt nicht in der Inkubationsdauer von GCAP mit Nanopartikeln, sondern in der Inkubationszeit von GC mit Nanopartikeln.

Wenn die Nanopartikel einen negativen Einfluss auf die GCAPs haben, dann wahrscheinlich durch eine zu starke Bindung, so dass sie im Versuchsansatz nicht in der gewollten Menge zur

Verfügung stehen. Eine chemische Modifikation oder dauerhafte Konformationsveränderung ist eher unwahrscheinlich.

Einfluss der Nanopartikel auf die GC

Bei der mit Nanopartikeln behandelten, GC-exprimierenden Zellkultur sind die CaF₂-Partikel fünf Tage lang, während des Wachstums der Zellen, anwesend (NK) (siehe 4.2.2). Die Reaktions- bzw. Anbindungsdauer sind somit höher, als bei dem zweiten Versuchsansatz, in dem die CaF₂-Partikel erst kurz vor dem Versuch zu der GC Zellsuspension dazu gegeben werden (N). Die Reaktions- bzw. Assoziationsdauer von CaF₂ mit der GC scheint ausschlaggebend für die erhaltenen Werte der x-fachen Aktivierung. Es könnte eine Reaktion/ Bindung/ Aggregation von Nanopartikel und GC vorliegen. Um diese Theorie zu beweisen, wurde die Ernte einer hGC-E stabil produzierenden HEK-293-Zelllinie über 1, 2 und 4 Stunden mit Nanopartikeln bei Raumtemperatur inkubiert und hinterher über einen immunchemischen Nachweis, die Bandenstärke der GC bestimmt (siehe 4.2.6). Die abnehmende GC-Bandenstärke und die zunehmenden Reste in den Taschen des SDS-Gels, lassen darauf schließen, dass die GC wider Erwarten an die Nanopartikel bindet oder die Nanopartikel eine Aggregation der GC fördern (siehe Abbildung 27). Dies sorgt dafür, dass nur eine geringe Konzentration der GC in das Gel einwandern kann. Der Rest bleibt mit den Nanopartikeln in den Taschen des SDS-Gels zurück. Trägt man die Zellernte einer NK gegen eine unbehandelte GC-Zellernte auf ein SDS-Gel auf, sieht man, dass fast gar keine GC mehr in der NK zur Verfügung steht (siehe Abbildung 26). Wie die GCs an die Nanopartikel anbinden ist unklar. Es könnte sein, dass die GC selbst an die Nanopartikel bindet. Als GC-Quelle wurde Zellaufschluss genutzt, der hGC-E enthält. Die GC-Quelle ist also nicht gereinigt. Die Membranbestandteile können also auch an die Nanopartikel binden und die GC dabei mitziehen.

Eine Aggregation der hGC-E würde auch noch einen weiteren Effekt der Nanopartikel erklären: Durch die Zugabe von CaF₂ zu den stabilen hGC-E-HEK-293 Zellen konnte eine Wachstumszunahme detektiert werden. Die Zellen teilen sich im Gegensatz zu den nicht behandelten Zellen viel schneller. Dies könnte daran liegen, dass die Expression der GC toxisch auf die Zellen wirken kann. Nicht transfezierte Zellen wachsen schneller, als die hGC-E-HEK-293-Zellen (138). Durch Aggregation der GC an die Nanopartikel, belastet die exprimierte GC die HEK-293-Zellen vielleicht nicht mehr. Eventuell verliert die GC auch ihre Funktion oder kann sie nur eingeschränkt wahrnehmen. Vielleicht werden die großen

Membranmoleküle aber auch zusammengehalten und verändern die Viskosität der HEK-Zellmembran nicht weiter.

Da das Expressionslevel des im Vektor eingebauten GFP Proteins, unverändert war, ist ein Einfluss auf die Expression eher unwahrscheinlich. Viel wahrscheinlicher ist, dass die GC nach der Expression durch die Nanopartikel gebunden wird, was sich positiv auf das Zellwachstum auswirkt.

Einfluss der Nanopartikel auf die GC-GCAP Affinität

Auch der EC_{50} -Wert verändert sich durch Zugabe von Nanopartikeln. Durch Zugabe von CaF_2 erhöht sich der Wert beim GCAP1-WT aber auch bei der getesteten Mutante D100E. Dies könnte ebenfalls mehrere Gründe haben. Zum einen wäre es denkbar, dass durch die Nanopartikel die funktionelle GCAP-Konzentration im Versuchsansatz durch Aggregation oder ähnlichem gemindert wird. Das konnte bisher noch nicht endgültig ausgeschlossen werden. Der EC_{50} -Wert gibt die GCAP-Konzentration an, die benötigt wird, um die GC halbmaximal zu aktivieren. Dieser Wert wird indirekt über die Menge an gebildetem cGMP bestimmt. Dieser Wert ist zwar nicht Ca^{2+} -abhängig, seine Ermittlung wird aber in Gegenwart von EGTA erleichtert, da die erhaltenen cGMP-Werte höher und damit einfacher detektierbar sowie auswertbar sind. Verändern die CaF_2 -Partikel vielleicht die Ca^{2+} -Konzentration im Ansatz und der verändern somit indirekt den EC_{50} -Wert?

Eine Abgabe von Ca^{2+} -Ion aus den Nanopartikeln ist unwahrscheinlich, da CaF_2 sich im Labor in konzentrierter Schwefelsäure und nur schwer in Wasser, bzw. unter physiologischen Bedingungen auflöst. Eine Abgabe von Ca^{2+} -Ionen hätte auch bereits den IC_{50} -Wert beeinflusst. Sehr wahrscheinlich ist hingegen, dass auch beim höheren EC_{50} -Wert in Gegenwart von Nanopartikeln, die Aggregation der GC eine entscheidende Rolle spielt. Allerdings kann durch diese These nicht erklärt werden, warum die Kurve der EC_{50} -Messungen nicht schneller ihr Maximum erreicht. Würden die Nanopartikel nur GC (bzw. die GC-enhaltene Membran) binden und diese inhibieren, müsste eine geringe Menge GCAPs ausreichen, um die noch freien GC Moleküle zu aktivieren. Der Kurvenverlauf müsste demnach viel schneller sein Maximum erreichen und dieses auch halten, auch wenn natürlich das Maximum aufgrund der geringeren Produktionsrate tiefer liegen würde. Dem ist aber nicht so (siehe Abbildung 25).

Eine weitere Theorie wäre, dass die CaF_2 -Moleküle nicht nur Proteine, sondern auch andere Komponenten wie beispielsweise GTP oder cGMP binden und somit das Produkt oder Edukt

der enzymatischen Reaktion aus dem Assay herausfiltern. GTP ist ein Anion mit vierfach negativer Ladung, dass durch die an der Oberfläche exponierten Ca^{2+} -Ionen theoretisch gebunden werden könnte. Dies ist allerdings auch eher unwahrscheinlich, da Mg^{2+} dem Assay beigemischt ist, das an die negativen Ladungen des GTP binden soll. Bei cGMP würde eine Ca^{2+} -Bindung an die Oberfläche der Nanopartikel nur über eine polare Grenzstruktur funktionieren. Das ist zwar auch unwahrscheinlich, kann aber auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ein Argument gegen eine CaF_2 /cGMP bzw. CaF_2 /GTP Bindung ist, dass die Nanopartikel-Konzentration bei den EC_{50} / IC_{50} -Assays bei Verwendung einer NK geringer sein müsste, als bei dem N-Versuchsansatz. Das ergibt sich aus der Vorbereitung der hGC-E/Nanopartikel-Quelle: Bei der NK werden die Nanopartikel noch während der Anzucht der Zellen in einem Endverhältnis von 1:144 (GCAP: Nanopartikeln) zugegeben. Anschließend vergehen noch 5 Tage Inkubation. Bei der Ernte werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, abzentrifugiert, aufgeschlossen und in Resuspensionspuffer aufgenommen.

Diese notwendigen Arbeitsschritte entziehen der NK also wahrscheinlich CaF_2 -Partikel. Hingegen wurde bei dem N-Versuchsansatz 5 μl einer 15 mg/ml CaF_2 Lösung direkt zur Membran des Zellaufschlusses der GC exprimierenden Zellen hinzugegeben. Eine Ca^{2+} -Konzentrationsverringering liegt hier nicht vor. N bringt daher wahrscheinlich mehr Nanopartikel in das Experiment ein als NK. Trotzdem wurden bei allen Testreihen mit N höhere cGMP Konzentrationen gemessen als bei NK (siehe Abbildungen 24 und 25). Abschließend kann also nicht ausgeschlossen werden, dass Pufferbestandteile wie GTP oder cGMP an die Nanopartikel binden, signifikant für die erhaltenen EC_{50} - und IC_{50} -Werte sind diese Bindungen allerdings nicht.

Wahrscheinlicher ist, dass die die in dieser Arbeit herausgestellte Bindung der GC in Konkurrenz steht mit der zuvor bewiesenen Bindung der GCAPs an die CaF_2 -Partikel (siehe 4.2.1). Diese CaF_2 -Bindung ist zwar reversibel, benötigt aber eine hohe Konzentration an GCAP-Molekülen damit sich die GC von den Nanopartikeln löst. CaF_2 -Partikel und GCAP stehen quasi in Konkurrenz zueinander. Bei der Testreihe mit der NK wurden durch die Waschung und den Aufschluss mit den Nanopartikeln schon viele gebundene GC-Moleküle ausgewaschen. Die restlichen GC-Moleküle sind an Nanopartikel gebunden, weshalb in dem Nachweis (siehe 4.2.6) auch nur geringe bis keine Mengen GC detektiert werden konnten. Dafür konnten Proteinreste in den Geltaschen angefärbt werden, wahrscheinlich Proteine mit Nanopartikeln die nicht ins Gel einwandern konnten. Der Rest an GC in der eingesetzten NK ist demzufolge wahrscheinlich noch an Nanopartikel gebunden. Erst durch die Zugabe von

GCAP1 lösen sich einige GCs vom CaF_2 ab und bilden mit GCAP den cGMP-produzierenden GC/GCAP Komplex. An den CaF_2 -Partikeln wird Platz frei, den wiederum die GCAPs besetzen können. Die freien GCAP- und GC-Proteine können aber miteinander interagieren. Dies würde auch den Kurvenverlauf des EC_{50} -Wertes erklären. Mit zunehmender GCAP Konzentration steigt die Kurve an, jedoch hat der höhere Nanopartikeleinsatz der N nicht die stärkste Senkung der cGMP Produktion zur Folge. Könnte man hier die geringste maximale cGMP-Produktion beobachten, würde nur das GCAP an die Nanopartikel binden und der GC nicht mehr als Aktivator zur Verfügung stehen. Viel weniger cGMP wird aber bei Einsatz der NK produziert, wo wahrscheinlich weniger Nanopartikel eingesetzt wurden. Die Inkubationszeit mit der GC, sowie der wahrscheinliche Abtrag der GC durch die Waschschriffe beeinflussen die cGMP-Produktion des GCAP/GC-Systems.

GCAPs und GC konkurrieren demnach um die Bindungsstellen an den CaF_2 -Partikeln (siehe 4.2.3). Diese Affinität ist stärker als die Affinitäten von GCAP und GC zueinander und sorgt somit für die geringe cGMP-Produktion im EC_{50} - und IC_{50} -Assay.

Nanomedizin – Ein neuer Weg zur Heilung verschiedener Krankheiten?

CaF_2 ist nur ein Nanopartikel von vielen, die momentan untersucht werden, um als Wirkstoff-Transport System bei unterschiedlichen Krankheiten zu fungieren. Die Nanomedizin und generell Nanotechnologie ist in der heutigen Zeit von großer Bedeutung. Es gibt bereits verschiedenste Produkte in denen Nanomaterialien vorhanden sind, allerdings sind die Folgen für Mensch, Tier und Umwelt noch weitläufig unbekannt. Hier steckt die Forschung noch in den Kinderschuhen, obwohl Nanomaterialien schon seit mehreren Jahrzehnten in verschiedenen Pflegeprodukten, Materialien und Chemikalien, Elektrotechnik, Pharmazeutika und vielen weiteren Produkten eingesetzt werden und auch natürliche Ursprünge haben. Es konnten bisher schon Auswirkungen auf aquatische Organismen durch Ionen wie Silber oder Zinkoxid, negative Auswirkungen auf Mäuselungen, und sogar Schädigungen der menschlichen DNA nachgewiesen werden. Nanopartikel sind im Stande die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen und können, wenn sie toxische Stoffe transportieren schwere Schäden im Gehirn verursachen. Trotzdem ist der Einsatz von Nanopartikeln in vielen Bereichen der Medizin sehr vielversprechend und kann sogar eine Alternative zur Chemotherapie bei Krebs darstellen (107, 111, 139).

Diese Arbeit konnte zeigen, dass Nanopartikel die Aggregation der GC fördern. Außerdem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Proteine negativ durch die Partikel

beeinflusst werden. Eine Ursache für die GC-Aggregation konnte nicht gefunden werden. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die GC nicht das einzige Protein ist, das an die Nanopartikel aggregiert. Vielleicht beeinflussen CaF_2 -Partikel auch Funktionen weiterer Proteine oder anderer Zellbestandteile. Auch wenn die HEK-Zellen überlebens- und vermehrungsfähig bleiben, ist noch nicht bewiesen, dass ein ganzer Organismus durch die Anwendung dieser Partikel nicht geschädigt wird. Die Versuche dieser Arbeit können aber helfen, Schaden/Nutzen-Abschätzungen bezüglich möglicher Tierversuche zu machen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Purves, D., Augustine, G.J. et al.** Neuroscience. 4. Sinauer, 2008.
2. **Lang, F. und Schmidt, R.F.** Physiologie des Menschen. 30. Springer Verlag, 2005.
3. www.blickcheck.de. [Online]
4. **Cajal, S.** La rétine des vertébrés. Cellule. 1893, 9, pp. 121-125.
5. **Rodieck, R.W.** The first steps in seeing. Sinauer, 1988.
6. **Masland, R.H.** Neuronal diversity in the retina. Curr. Opin. Neurobiol., 2001, 4 (11), pp. 102-111.
7. **Ortmann, I.** Live beobachtet: der Richtungsdetektor im Auge. Spektrum der Wissenschaft, 2002, 11, pp. 12 ff.
8. **Macneil, M.A., Heussy, J.K., et al.** The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rapid retina and comparison with other mammalian species. *J. Comp. Neurol.*, 1999, 413 (2), pp. 305-326.
9. **Haverkamp, S., Grunert, U., et al.** The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron*. 2000, 1 (27), pp. 85-96.
10. **Wässle, H.** Parallel processing in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004, 10 (5), pp. 747-757.
11. **Cursio, C.A., Sloan, K.R., et al.** Human photorezeptor topography. *Comp. Neurol.* 1990, 292 (2), pp. 497-523.
12. **Williams, D.R. and Roorda, A.** The arrangement of three cone classes in the living human eye. *Nature*. 1999, 397, pp. 520-522.
13. **Behnen, P.** Funktionelle Charakterisierung von GCAP1-Mutanten als Ursache erblicher Zapfen-Dystrophien. Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg : s.n., 2010. Dissertation.
14. **Menzel, R. and Synder, A.W.** Photoreceptor optics. 1. Springer Verlag, 1975.
15. **Tobey, F.L. and Enoch, J.M.** Vertebrate photoreceptor optics. Springer Verlag, 1981.
16. **Gilbertson, T.A., Scorbey, R., et al.** Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. *Science*. 1991, 251 (5001), pp. 1613-1615.
17. **DeVries, S.H. and Schwartz, E.A.** Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and OFF bipolar cells in a mammalian retina. *Nature*. 1999, 6715 (397), pp. 157-160.

18. **DeVries, A.H.** Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron*. 2000, 28 (3), pp. 847-856.
19. **Shiells, R.A., Falk, G., et al.** Action of glutamate and aspartate analogues on rod horizontal and bipolar cells. *Nature*. 1981, 294 (5841), pp. 592-594.
20. **Slaughter, M.M. and Miller, R. F.** 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science*. 1981, 211 (4478), pp. 182-185.
21. **Kolb, H. und Famigliatti, E.V.** Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science*. 1974, 186 (4158), pp. 47-49.
22. **Fahrenfort, I., Klooster, J., et al.** The involvement of glutamate-gated channels in negative feedback from horizontal cells to cones. *Prog. Brain. Res.* 2005, 147, pp. 219-229.
23. **Yang, X.L.** Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog. Neurobiol.* 2004, 73 (2), pp. 127-150.
24. **Kolb, H.** Anatomical pathway for color vision in the human retina. *Vis. Neurosc.* 1991, 7 (1-2), pp. 61-74.
25. **Boycott, B.B.** Horizontal cells of mammalian retinae. *Neurosci. Res. Suppl.* 1988, 8, pp. 97-111.
26. **Cook, J.E. und Becker, D.L.** Gap junctions in the vertebrate retina. *Microsc. Res. Tech.* 1995, 31 (2), pp. 408-419.
27. **Connors, B.W. und Long, M.A.** Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 2004, 27, pp. 393-418.
28. **Seeliger, M., Brombas, A., et al.** Modulation of rod photoreceptor output by HCN1 channels is essential for regular mesopic cone vision. *Nature Commun.* 2011, 2 (532).
29. **Balasubramanian, R. und Gan, L.** Development of retinal amakrine cells and their dendritic stratification. *Curr. Ophthalmol. Rep.* 2014, 2 (3), pp. 100-106.
30. **You, K.W. und Nakatani, K.** Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the rod outer segment. *J. Physiol.* 1988, 395, pp. 731-753.
31. **McNaughton, P.A., Nunn, B.J., et al.** The ionic selectivity and calcium dependence of the light-sensitive pathways in toad rods. *J. Physiol.* 1985, 358, pp. 447-468.
32. **Kaupp, U.B. und Molday, R.S.** Ion channels of vertebrate photoreceptors. *HBP*. 2000, 3, pp. 143-181.
33. **Schetkamp, P.P.** Na^+ - Ca^{2+} or Na^+ - Ca^{2+} - K^+ exchange in rod photoreceptors. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1989, 1 (54), S. 1-29.
34. **Senin, I.I., Koch, K. W. et al.** Ca^{2+} dependent control of rhodopsin phosphorylation: recoverin and rhodopsin kinase. *Exp. Med. Biol.* 2006, 514, pp. 69-99.

35. **Chen, C.K., Inglese, J., et al.** Ca^{2+} dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J. Biol. Chem.* 1995, 30 (270), pp. 18060-18066.
36. **Fries, R.** Das retinale Guanylatecyclase-System des Zebrafisches (*Danio rerio*). Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg : s.n., 2013. Dissertation.
37. **Farrens, D.L., Altenbach, C., et al.** Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science.* 1996, 5288 (176), pp. 768-770.
38. **Ratto, G.M., Payne, R., et al.** The concentration of cytosolic free calcium in vertebrate rod outer segments measured with fura-2. *J. Neurosci.* 1988, 9 (8), pp. 3240-3246.
39. **Matthews, H.R., Lamb, T.D., et al.** Role of calcium in regulating the cyclic GMP cascade of phototransduction in retinal rods. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986, 83 (18), pp. 7109-7113.
40. **Cote, R.H., Biernbaum, M.S., et al.** Light-induced decreases in cGMP concentration precede changes in membrane permeability in frog rod photoreceptors. *Biol. Chem.* 1984, 259, pp. 9635-9641.
41. **Fain, G.L., Matthews, H.R., et al.** Adaption in vertebrate photoreceptors. *Physiol. Rev.* 2001, 81, pp. 117-151.
42. **Scholten, A. und Koch, K.W.** Differential calcium signaling by cone specific guanylate cyclase-activating proteins from the zebrafish retina. *PLoS ONE.* 2011, 8 (6), pp. 23116-23126.
43. **Koch, K.W. und Stryer, L.** Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature.* 1988, 6177 (224), pp. 64-66.
44. **Dizhoor, A.M., Lowe, D.G., et al.** human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron.* 1994, 12, pp. 1345-1352.
45. **Venkataraman, V., Nagele, R., et al.** Rod outer segment membrane guanylate cyclase type 1-linked stimulatory and inhibitory calcium signaling systems in the pineal gland: biochemical, molecular, and immunohistochemical evidence. *Biochem.* 2000, 39, pp. 6042-6052.
46. **Strada, S.J., Kirkegaard, L., et al.** Studies of rat pineal gland guanylate cyclase. *Neuropharmacology.* 1976, 15 (4), pp. 261-266.
47. **Helten, A., Säftel, W., et al.** Expression level and activity profile of membrane bound guanylate cyclase type 2 in rod outer segments. *J. Neurochem.* 2007, 103 (4), pp. 1439-1446.
48. **Wedel, B.J. and Garbers, D.L.** Guanylyl cyclases: approaching year thirty. *Trends. Endocrinol. Metab.,* 1998 6 (9), pp. 213-219.

49. **Koller, K.J., De Sauvage, F.J., et al.** Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12 (6), pp. 2581-2590.
50. **Wilson, E.M. and Chinkers, M.** Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochem.* 1995, 34 (14), pp. 4696-4701.
51. **Schulz, S., Wedel, B.J., et al.** The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J. Biol. Chem.* 1998, 273 (2), pp. 1032-1037.
52. **Foster, D.C., Wedel, B.J., et al.** Mechanisms of regulation and function of guanylyl cyclases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1999, 135, pp. 1-39.
53. **Yang, R.B., Foster, D.C., et al.** Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1995, 92 (2), pp. 602-606.
54. **Kashles, O., Szapary, D., et al.** Ligand-induced stimulation of epidermal growth factor receptor mutants with altered transmembrane regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, 85 (24), pp. 9567-9571.
55. **Lange, C., Duda, T., et al.** Regions in vertebrate photoreceptor guanylyl cyclase ROS-GC1 involved in Ca^{2+} -dependent regulation by guanylyl cyclase-activating protein. *FEBS Lett.* 1999, 460, pp. 27-31.
56. **Aparicio, J.G. und Applebury, M.L.** The photoreceptor guanylate cyclase is an autophosphorylating protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1996, 271 (43), pp. 27083-27089.
57. **Tucker, C.L., Woodcock, S.C., et al.** Biochemical analysis of a dimerization domain mutation in RetGC-1 associated with dominant cone-rod dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1999, 96 (16), pp. 9039-9044.
58. **Koch, K.W., Eckstein, F., et al.** Stereochemical course of the reaction catalyzed by guanylate cyclase from bovine retinal rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 1990, 265 (17), pp. 9659-9663.
59. **Krupinski, J., Coussen, F., et al.** Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science.* 1989, 244 (4912), pp. 1558-1564.
60. **Tucker, C.L., Hurley, J.H., et al.** Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1998, 95 (11), pp. 5993-5997.
61. **Duda, T., Fik-Rymarkiewicz, E., et al.** The calcium-sensor guanylate cyclase activating protein type 2 specific site in rod outer segment membrane guanylate cyclase type 1. *Biochem.* 2005, 35, pp. 8478-8482.
62. **Peshenko, I.V. und Dizhoor, A.M.** Ca^{2+} and Mg^{2+} binding properties of GCAP-1. *Journ. Biol. Chem.* 2006, 281(31), pp. 23830-23841.

63. **Burgoyne, R.D.** Neuronal calcium sensor proteins generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nature*. 2007, 8, pp. 182-193.
64. **Burgoyne, R.D. and Weiss, J.L.** The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺- binding proteins. *Biochem. J.* 2001, 353, pp. 1-12.
65. **Burgoyne, R.D., O'Callaghan, D.W., et al.** Neuronal calcium sensor proteins: multitasking regulators of neuronal functions. *Trends Neurosci.*, 2007, 27, pp. 203-209.
66. **Pruunslid, P. and Timmusk, T.** Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family. *Genomics*. 2005, 86, pp. 581-593.
67. **Palczewsky, K., Sokal, I., et al.** Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function and diversity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004, 322, pp. 1123-1130.
68. **Imanishi, Y., Yang, L., et al.** Diversity of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in teleost fish: characterization of three novel GCAPs (GCAP2, GCAP5, GCAP7) from zebrafish (*Danio rerio*) and prediction of eight GCAPs (GCAP1-8) in pufferfish (*Fugu rubripes*). *J. Mol. Evol.* 2004, 59, pp. 204-217.
69. **Haeseleer, F., Sokal, I., et al.** Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, pp. 6526-6535.
70. **Palczewski, K., Subbaraya, I., et al.** Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein. *Neuron*. 1994, 13, pp. 395-404.
71. **Hwang, J.Y., Lange, C., et al.** Regulatory modes of rod outer segment membrane guanylate cyclase differ in catalytic efficiency and Ca²⁺ sensitivity. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, pp. 3814-3821.
72. **Olshevskaya, E.V., Peshenko, I.V., et al.** Retinal guanylyl cyclase isozyme 1 is the preferential *in vivo* target for constitutively active GCAP1 mutants causing congenital degeneration of photoreceptors. *J Neurosci.* 2012, 32 (21), pp. 7208-7217.
73. **Goraczniak, R.M, Duda und, T. und Sharma, R.K.** Calcium modulated signaling site in type 2 rod outer segment membrane guanylate cyclase (ROSGC2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, Bd. 245 (2), pp. 447-453.
74. **Olshevskaya, E.V., Ermilov, A.N., et al.** Dimerization of guanylyl cyclase-activating protein and a mechanism of photoreceptor guanylyl cyclase activation. *J. Biol. Chem.* 1999, 272 (22), pp. 14327-14333.
75. **Hwang, J.-Y., Schlesinger, R. et al.** Irregular dimerization of guanylate cyclase-activating protein 1 mutants causes loss of target activation. *FEBS*. 2004, 271 (18), pp. 3785-3793.
76. **Dizhoor, A. M.** Regulation of cGMP synthesis in photoreceptors: role in signal transduction and congenital diseases of the retina. *Cell Signal*. 2000, 12 (11-12), pp. 711-719.

77. **Sokal, I., Li, N., et al.** Calcium-sensitive regions of GCAP1 as observed by chemical modifications, fluorescence, and EPR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (46), pp. 43361-43373.
78. **Koch, K.W. and Dell'Orco, D.** A calcium-relay mechanism in vertebrate phototransduction. *ACS Chem. Neurosci.* 2013, 6, pp. 909-9017.
79. **Woodruff, M.L., Sampath, A.P., et al.** Measurement of cytoplasmic calcium concentration in the rods of wild-type and transducin knock out mice. *J. Physiol.* 2002, 542, pp. 843-854.
80. **Peshenko, I.V. and Dizhoor, A.M.** Guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs) are $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ sensors. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, pp. 16903-16909.
81. **Koch, K.W.** GCAPs, the classical neuronal calcium sensors in the retina. A Ca^{2+} -relay. *Calcium Binding Proteins.* 2006, 1, pp. 3-6.
82. **Olshevskaya, E.V., Hughes, R.E., et al.** Calcium binding, but not a calcium myristoyl switch, controls the ability of guanylyl cyclase-activating protein GCAP-2 to regulate photoreceptor guanylyl cyclase. *Jour.Biol.Chem.* 1997, 272, pp. 14327-14333.
83. **Hwang, J.Y. and Koch, K.W.** Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and protein-2. *Biochemistry.* 2002, 41, pp. 13021-13028.
84. **Hwang, J.Y., Lange, C., et al.** Regulatory mode of outer segment membrane guanylate cyclase differ in catalytic efficiency and Ca^{2+} -sensitivity. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, pp. 3814-3821.
85. **Gifford, J.L., Walsh, M.P., et al.** Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. Journ.* 2007, 2 (405), pp. 199-221.
86. **Lim, S., Peshenko, I., et al.** Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and myristoylation on GCAP1 structure and stability. *Biochem.* 2009, 48 (5), pp. 850-862.
87. **Peshenko, I.V., Olshevskaya, E.V., et al.** Binding of guanylyl cyclase-activating protein 1 (GCAP1) to retinal guanylyl cyclase (RetGC1). *J. Biol. Chem.* 2008, 283, pp. 21747-21757.
88. **Peshenko, I.V., Olshevskaya, E.V., et al.** Calcium-myristoyl tug is a new mechanism for intermolecular tuning of calcium sensitivity and target enzyme interaction for guanylyl cyclase-activating protein 1. *Jour. Biol.Chem.* 2012, 17 (28), S. 13972-13984.
89. **Woodruff, M.L., Olshevskaya, E.V., et al.** Constitutive excitation by Gly90Asp rhodopsin rescues rods from degeneration caused by elevated production of cGMP in the dark. *J. Neurosci.* 2007, 27 (33), pp. 8805-8815.
90. **Xu, J., Morris, L., et al.** cGMP accumulation causes photoreceptor degeneration in CNG channel deficiency: Evidence of cGMP cytotoxicity independent of enhanced CNG channel function. *J. Neurosci.* 2013, 33 (37), pp. 14939-14948.

91. **Sahaboglu, A., Paquet-Durand, O., et al.** Retinitis pigmentosa: rapid neurodegeneration is governed by slow cell death mechanisms. *Cell Death Dis.* 2013, 4, pp. e488.
92. **Behnen, P., Dell' Orco, D., et al.** Involvement of the calcium sensor GCAP1 in hereditary cone dystrophies. *Biol. Chem.* 2010, 391 (6), pp. 631-637.
93. **Hunt, D.M., Buch, P., et al.** Guanylate cyclase and associated activator proteins in retina disease. *Mol. Cell. Biochem.* 2010, 334 (1-2), pp. 631-637.
94. **Downes, S.M., Holder, G.E., et al.** Autosomal dominant cone and cone-rod dystrophy with mutations in the guanylate cyclase activator 1A gene-encoding guanylate cyclase-activating protein-1. *Arch. Ophthalmol.* 2001, 119 (1), pp. 96-105.
95. **Michaelides, M., Wilkie, S.E., et al.** Mutation in the gene GUCA1A, encoding guanylate cyclase-activating protein 1, causes cone, cone-rod and macular dystrophy. *Ophthalmol.* 2005, 8 (112), pp. 1442-1447.
96. **Sokal, I., Surgusheva, I., et al.** GCAP1(Y99C) mutant is constitutively active in autosomal dominant cone dystrophy. *Mol. Cell.* 1998, 1 (2), S. 129-133.
97. **Dizhoor, A.M., Boikov, S.G., et al.** Constitutive activation of photoreceptor guanylate cyclase by Y99C mutant of GCAP1. Possible role in causing human autosomal dominant cone degeneration. *J. Biol. Chem.* 1998, 273 (28), pp. 17311-17314.
98. **Wilkie, S.E., Li, Y., et al.** Identification and functional consequences of a new mutation (E155G) in the gene for GCAP1 that causes autosomal dominant cone dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 2001, 69 (3), pp. 471-480.
99. **Jiang, L., Wheaton, D., et al.** A novel GCAP1(N104K) mutation in EF-hand3 (EF3) linked to autosomal dominant cone dystrophy. *Vis. res.* 2008, 48 (23-24), pp. 2425-2432.
100. **Dell' Orco, D., Behnen, P., et al.** Calcium binding, structural stability and guanylate cyclase activation in GCAP1 variants associated with human cone dystrophy. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010, 67 (6), pp. 973-984.
101. **Newbold, R.J., Deery, E.C., et al.** The destabilization of human GCAP1 by a proline to leucine mutation might cause cone-rod dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2001, 10 (1), pp. 47-54.
102. **Nishiguchi, K.M., Sokal, I., et al.** A novel mutation (I143NT) in guanylate cyclase-activating protein 1 (GCAP1) associated with autosomal dominant cone dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004, 45 (11), pp. 3863-3870.
103. **Kamenarova, K., Chrminikova, S., et al.** A novel locus for autosomal dominant cone-rod dystrophy maps to chromosome 10q. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013, 21 (3), pp. 338-342.
104. **Kitiratschky, V. B. D., Behnen, P., et al.** Mutations in the GUCA1A gene involved in hereditary cone dystrophies impair calcium-mediated regulation of guanylate cyclase. *Hum. Mutat.* 2009, 30, S. 782-796.

105. **Dell'Orco, D., Sulmann, S., et al.** Impact of cone dystrophy-related mutations in GCAP1 on a kinetic model of phototransduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014, 71 (19), S. 3829-3840.
106. **European Commission. Introduction into nanotechnologies.**
http://ec.europa.eu/nanotechnology/index_en.html. [Online] 2013.
107. **Garnett, M. und Kallinteri, P.** Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup. Med.* 2006, 56, S. 307-311.
108. **Liu, Y., O'Brien, S.C., et al.** Negative carbon cluster ion beams: new evidence for the special nature of C60. *Chemical physics letters.* 1986, 126 (2), S. 215-217.
109. **Robinson, A.L.** Electron microscope inventors share Nobel physics prize. *Science.* 1986, 234, S. 821+.
110. **Nel, A., Xia, T. und Li, N.** Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006, 311, S. 622-627.
111. **Hoet, P., Bruske-Holfeld, I., et al.** Nanoparticles - known and unknown health risks. *Journ. Nanobiotech.* 2004, 2, S. 12-27.
112. **Oberdorster, G., Oberdorster, E et al.** Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113, S. 823-839.
113. **Katz, L., Burkhalter, A. et al.** Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for *in vivo* and *in vitro* studies of visual cortex. *Nature.* 1984, 310, S. 798-500.
114. **Rehmer, A.** Bildung von nanoskopischem Calciumfluorid über Sol-Gel-Synthese. 1. Cuvillier Verlag, 2016.
115. **Howarth, M., Liu, W., et al.** Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nature Methods.* 2008, 5, S. 397-399.
116. **Loo, C., Lin, A., et al.** Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. *Technol. cancer research & treatment.* 2004, 3, S. 33-40.
117. **Wagner, V., Dullaart, A., et al.** The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnol.* 2006, 24, S. 1211-1218.
118. **Wason, M.S. und Zhao, J.** Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases. *Am. J. Transl. Research.* 2013, 5, S. 126-131.
119. **Fissell, W., Fleischman, A.J., et al.** Development of continuous implantable renal replacement: past and future. *Trans Research.* 2007, 150, S. 327-336.
120. **Cai, X., Seal, S., et al.** Non-toxic retention of nanocerium in murine eyes. *Mol. Vis.* 2016, 22, S. 1176-1187.

121. **Astegno, A., Maresi, E., et al.** Structural plasticity of calmodulin on the surface of CaF₂ nanoparticles preserves its biological function. *Nanoscale*. 2014, 24 (6), S. 15037-15047.
122. **Sambrook, J. und Russell, D.W.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York), 1989.
123. **Holtzhauer, M.** Biochemische Labormethoden. 3 . Springer Verlag (Berlin), 1997.
124. **Lottspeich, F.** Bioanalytik. 2. Springer Verlag (Heidelberg), 2009.
125. **Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*. 1970, 227, S. 680-685.
126. **Khyse-Anderson, J.J.** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamides to nitrocellulose. *Biochem. Biophys. Meth.* 1984, 10, S. 203-209.
127. **Tsien Y.R.** New calcium indicators with high selectivity against magnesium and protons. *Biochem.* 1980, 19, S. 2396-2404.
128. **André, I. und Linse, S.** Measurement of Ca²⁺-binding constants of proteins and presentation of the CaLigator Software. *Anal. Biochem.* 2002, 305, S. 195-205.
129. **Liang, Y.** Application of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta Biochem. Biophys.* 2008, 40, S. 565-576.
130. **Praefke, G.J. K. und Hermann, C.** Isothermale Titrationskalorimetrie zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen. *BIOspektrum*. 2005, 1/05, S. 44-47.
131. **Stephen, R., Bereta, G., et al.** Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal calcium sensor, guanylate cyclase-activating protein 1. *Structure*. 2007, 15 (11), pp. 1392-1402.
132. **Palczewski, K., Polans, A.S., et al.** Ca²⁺-binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *BioEssays*. 2000, 22, S. 337-350.
133. **Farber, D.B. und Lolley, R.N.** Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science*. 1974, 186, S. 449-451.
134. **Sulmann, S., Kussrow, A., et al.** Label-free quantification of calcium-sensor targeting to photoreceptor guanylate cyclase and rhodopsin kinase by backscattering interferometry. *scientific reports*. accepted 28.02.2017.
135. **Leicht, K.** www.pro-retina.de. [Online]
136. **Cho, K., Wang, X.U., et al.** Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008, 14 (5), S. 1310-1316.
137. **Newbold, R. J., deery, E.C., et al.** Guanylate cyclase-activating proteins, guanylate cyclase and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 514, S. 411-438.

138. **Vocke, F.** Myristoylation and localization of zGCAP-GFP constructs in HEK-293 cells. Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg. 2014. Master thesis.
139. **Umweltbundesamt.** Nanomaterialien in der Umwelt - Aktueller Stand der Wissenschaft und Regulierung zur Chemikaliensicherheit. 2016.
140. <http://www.kienzle-lojewski.de/medizin/makulardeg.html>. [Online]
141. **Liang, L., Frederick, J.M., et al.** RNA interference gene therapy in dominant retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy mouse models caused GCAP1 mutations. *Front. Mol. Neurosci.* 25 (7), S. 1-8.
142. **Biasini, M., Bienert, S., et al.** SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, pp. W252-W258
143. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC

7 Anhang

8 Publikationen, Abstracts, Vorträge

8.1 Publikationen

Sulmann, S.; Vocke, F.; Scholten, A.; Koch, K. W. (2015) Retina specific GCAPs in zebrafish acquire functional selectivity in Ca^{2+} -sensing by myristoylation and Mg^{2+} -binding, *Scientific Reports* 5, Article number: 11228

Vocke, F.; Weisschuh, N.; Marino, V.; Malfatti, S.; Jacobson, S. G.; Reiff, C. M.; Dell'Orco, D.; Koch, K.-W. (2017) Dysfunction of cGMP signalling in photoreceptors by a macular dystrophy-related mutation in the calcium sensor GCAP1, *Hum mol Genet* 26 (1): 133-144

Wichmann, H.; Vocke, F.; Brinkhoff, T.; Simon, M.; Richter-Landsberg, C. (2015) Cytotoxic Effects of Tropeanthic Acid on Mammalian Clonal Cell Lines of Neuronal and Glial Origin, *Mar. Drugs* 13(12) 7116-7123

Marino, V.; Borsatto, A.; Vocke, F.; Koch, K.W.; Dell'Orco, D. CaF_2 nanoparticles as surface carriers of GCAP1, a calcium sensor protein involved in retinal dystrophies; **in progress**

8.2 Abstracts und Poster

Myristoylation of zebrafish GCAPs (29.11.2013) *Kick-off Meeting*, Delmenhorst

Dysfunction of cGMP signaling in photoreceptors by a Macular Dystrophy related mutation in the calcium sensor GCAP1 (27.-28.03.2015) *Pro Retina "Retinal Degeneration"*, Potsdam

A GCAP1 mutant causes Macular dystrophy (20-22.06.2015) *Molecular Neurodegeneration: News and views in molecular neuroscience in health and disease*, Delmenhorst

A GCAP1 mutant causes Macular dystrophy (6-10.10.2015) *International Symposium on Quantumbiology affecting Sensory Biology*, Barcelona

Macular Dystrophy related mutation in the calcium sensor GC (08.-09.04.2016) *Pro Retina "Retinal Degeneration"*, Potsdam

Macular Dystrophy related mutation in the calcium sensor GC (02.-03.11.2016) *Kick-Off/Fare-well Meeting*, Potsdam

Macular Dystrophy related mutation in the calcium sensor GC (04-07.12.2016) *Neuronal Calcium Sensors in health and disease*, Potsdam

8.3 Vorträge

A GCAP1 mutant causes Macular dystrophy (20-22.06.2015) *Molecular Neurodegeneration: News and views in molecular neuroscience in health and disease*, Delmenhorst

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (siehe 8).

Ort, Datum Unterschrift

10. Lebenslauf

<u>Geboren</u>	07.11.1985 in Osnabrück
<u>Staatsangehörigkeit</u>	Deutsch
<u>Familienstand</u>	verheiratet

Schulischer Werdegang

- 1992 bis 1995 Grundschule Lechtingen
- 1995 bis 1997 Orientierungsstufe Hollage
- 1997 bis 2001 Realschule Wallenhorst
- 2001 bis 2004 Gymnasium Carolinum (Abitur)

Beruflicher Werdegang

2004 bis 2007 Ausbildung zur Chemielaborantin, bei der LUFA Nord-West in Oldenburg/
Abschluss als Chemielaborantin (Gesamtnote: sehr gut)

Studium

Seit Oktober 2007 an der Universität Oldenburg als Studentin/Promotionsstudentin eingeschrieben

- November 2010 2-Fach Bachelor in Chemie/Biologie (Gesamtnote 1,39)
- Januar 2014 Fach Master in Chemie (Gesamtnote 1,36)
- September 2014 Fach Master in Microbiology (Gesamtnote 1,33)

Promotion

Seit Dezember 2013 Promotionsstudentin an der Universität Oldenburg in der AG Biochemie (Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch). Voraussichtliches Ende der Promotion: Mai 2017.

Seit Juli 2014 assoziiertes Mitglied der Graduiertenschule Oltech im GRK: Sensory Biology
Voraussichtlicher Abschluss: Mai 2017.

Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch sowie Daniele Dell'Orco für die Bereitstellung der Themen, ihrem mitgeteilten Fachwissen und vor allem für die liebe Betreuung über all die Jahre. Danke, dass ihr stets ein offenes Ohr hattet!

Herrn Dr. Alexander Scholten für all die Jahre Hilfe, Freundschaft, Fachwissen, Bereitstellung von Plasmiden, DNA etc. Es war toll, sich mit dir ein Büro zu teilen. Danke, dass du einfach da bist!

Der ganzen AG für ihr Wissen und ihre Hilfe, allen voran danke ich Dr. Stefan Sulman, Dana Elbers und Hanna Wimberg für einfach alles. Es war eine schöne Zeit die ohne euch nicht so toll gewesen wäre! Ihr habt mir viel geholfen.

Zum Schluss danke ich natürlich noch meinen ganzen Freunden, meiner Mutter und meinem Mann für die mentale Unterstützung. Danke, dass ihr stets da ward um mich auf andere Gedanken zu bringen, mir Beizustehen und vor allem: Danke fürs Durchhalten!