



Studiengang: Bachelor of Science Biologie

Praxismodulbericht

Titel:

„Konformationsänderungen im Zebrafisch-GCAP4“

vorgelegt von: Alexander Kehl

Betreuender Gutachter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch

Oldenburg, den 29. 04. 2008

Zusammenfassung

Die Guanylate Cyclase-activating Proteins (GCAPs) stellen eine Subfamilie der Neuronal Calcium Sensor (NCS)-Proteine dar. Diese wiederum gehören zur Superfamilie der EF-Hand-Calcium-Bindungsproteine. Von den vier EF-Händen ist bei NCS-Proteinen die erste nicht funktionell. Zudem sind die NCS-Proteine überwiegend N-Terminal myristoyliert. Beides gilt auch für GCAPs. Bisher wurden neun Mitglieder der GCAP-Familie entdeckt. Neben den länger bekannten GCAP1-3 wurden kürzlich im Zebrafisch die zapfenspezifischen GCAP4, 5 und 7 (zGCAPs) entdeckt. Wohingegen gerade GCAP1-2 gut charakterisiert sind, ist über die zGCAPs wenig bekannt. Über GCAP1-2 ist bekannt, dass sie calciumabhängige Konformationsänderungen eingehen und ihr Zielenzym, die Guanylate Cyclase (GC), calciumabhängig regulieren. Bei hohen intrazellulären Calciumkonzentrationen inhibieren sie die GC, bei niedrigen aktivieren die GCAPs sie. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Phototransduktion und Lichtadaptation. Auch bei zGCAP4 konnten mittlerweile calciumabhängige Konformationsänderungen und eine calciumabhängige Regulation der GC gezeigt werden.

Durch die heterologe Expression in *E. coli* und Reinigung von bGCAP2 konnte in dieser Arbeit zunächst ein Referenzprotein gewonnen werden. Im Anschluss wurde zGCAP4 als Wildtyp, als A⁶S-Mutante (zur hinreichenden Myristoylierung) und als myristoylierte Mutante ebenso in ausreichenden Mengen gewonnen.

Mit dem gereinigten zGCAP4 konnten dann verschiedene Experimente zu calciumabhängigen Konformationsänderungen durchgeführt werden. Zum einen wurde die elektrophoretische Mobilität von zGCAP4 untersucht. Diese war unter Calciumeinfluss auch wie bei den bisher untersuchten GCAPs höher. Allerdings war dieser so genannte Calcium-Shift nicht so ausgeprägt wie bei den bisherigen GCAPs. Zum anderen wurden limitierte Proteolysen mittels Trypsin durchgeführt. Diese verliefen, ähnlich zu bisherigen GCAPs, ohne Calcium wesentlich schneller als mit Calcium. Allerdings war der Verdau der zGCAP4-Varianten ohne Calcium bedeutend langsamer als bei anderen GCAPs. Außerdem wurde der Dimerisierungsgrad von zGCAP4 mittels SEC analysiert. Es konnte bei allen zGCAP4-Varianten ohne Calcium ein höherer Dimerisierungsgrad beobachtet werden. Das Verhalten ähnelt in diesem Punkt mehr dem von bGCAP2 als dem von bGCAP1, wenn auch der Dimer-Anteil deutlich geringer als der bei bGCAP2 ist.

Insgesamt zeigen somit alle Experimente, dass zGCAP4 (in allen seinen Varianten) ebenso wie alle anderen bisher untersuchten GCAPs calciumabhängige Konformationsänderungen eingeht. Dies stützt schon bisher gewonnene Daten, die ebenfalls darauf hindeuteten.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
A	Stromstärke in Ampere oder Adenin
A ⁶ S	A ⁶ S-Austauschmutante des zGCAP4
AEC	Anion <i>Exchange Chromatography</i> (Anionenaustauschchromatographie)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Absorption <i>Units</i> (Absorptionseinheiten)
bGCAP	bovine GCAP (Rinder-GCAP)
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cystein
[Ca] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
cGMP	cyclic Guanosinmonophosphat (Guanosin-3':5'-monophosphat)
D ⁶ S	D ⁶ S-Austauschmutante des bGCAP1
Da	Molekulare Masse in <i>Dalton</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Schnelle Protein- Flüssigkeitschromatographie)
g	Masse in Gramm oder Normalfallbeschleunigung (9,81 m·s ⁻²)
G	Guanin
GC	Guanylate/Guanylyl Cyclase (Guanylat/-ylcyclase)
GCAP	GC-activating Protein (GC-aktivierendes Protein)
h	Zeit in Stunden (<i>hours</i>)
H ₂ O _{bide}	bidestilliertes Wasser
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography (Hochleistungs/-druck-Flüssigkeitschromatographie)
hGCAP	human GCAP (humanes GCAP)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
L	Volumen in Litern
LB	Luria-Bertani(-Medium)
M	Molar (mol·L ⁻¹)
m	Länge in Metern
min	Zeit in Minuten
mRNA	messenger RNA
MW _(app)	(<i>apparent</i>) Molecular Weight (apparentes Molekulargewicht)
myr	myristoylierte Variante der GCAPs
NCS	Neuronal Calcium Sensors (Neuronale Calcium-Sensoren)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
s	Zeit in Sekunden
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecyl- bzw. laurylsulfat)

SDS-PAGE	SDS- <i>Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
T	<i>Thymidin</i>
TEMED	N,N,N',N'- <i>Tetramethylethyldiamin</i>
Tris	<i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymaktivität in <i>Units</i> ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)
rpm	<i>Rounds per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
UV	<i>Ultra-Violett</i>
V	Spannung in Volt
wt	Wildtyp des zGCAP4
w/v	Gewichtsprozent
v/v	Volumenprozent
yNMT	<i>Yeast N-terminal Myristoyl-Transferase</i> (Hefe-NMT → aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
zGCAP	zebrafish GCAP (Zebrafisch-GCAP)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: NMR-Struktur von nichtmyristoyliertem bGCAP2 mit drei gebundenen Calcium-Ionen.....	2
Abbildung 3.1: Expressions- und Reinigungsverlauf von bGCAP2.....	16
Abbildung 3.2: Ammoniumsulfat-Fällungsreihe mit bGCAP2.....	17
Abbildung 3.3: SEC-Chromatogramm mit bGCAP2.....	18
Abbildung 3.4: SDS-PAGE-Analyse der gesammelten SEC-Fractionen mit bGCAP2.....	18
Abbildung 3.5: AEC-Chromatogramm mit bGCAP2.....	19
Abbildung 3.6: SDS-PAGE-Analyse der gesammelten AEC-Fractionen mit bGCAP2....	20
Abbildung 3.7: SDS-PAGE-Analyse der elektrophoretischen Mobilitätsänderung von zGCAP4.....	21
Abbildung 3.8: SDS-PAGE-Analyse der limitierten Proteolyse mittels Trypsin.....	23
Abbildung 3.9: SEC-Chromatogramme der HPLC mit den zGCAP4-Varianten.....	25
Abbildung A.1: mRNA-Sequenz von zGCAP4wt.....	39
Abbildung A.2: mRNA-Sequenz von zGCAP4A ^{6S}	39
Abbildung A.3: Der pET21a(+)-Vektor für die Heterologe Expression der verschiedenen GCAP-Varianten.....	39
Abbildung A.4: Der pBB131-Vektor zur Koexpression der yNMT.....	39
Abbildung A.5: SDS-PAGE-Kalibriergerade.....	42
Abbildung A.6: SEC-Kalibriergerade unter calciumfreien Bedingungen (2 mM EGTA)...	44
Abbildung A.7: SEC-Kalibriergerade unter calciumhaltigen Bedingungen (2 mM CaCl ₂).45	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Die apparenten Molekulargewichte der zGCAP4-Varianten bei der SDS-PAGE unter verschiedenen Bedingungen.....	21
Tabelle 3.2: Auswertung der SEC-Chromatogramme der HPLC mit den verschiedenen zGCAP4-Varianten.....	24
Tabelle A.1: Ein- und Dreibuchstabencode der 20 proteinogenen Aminosäuren.....	38
Tabelle A.2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.....	41
Tabelle A.3: Aus dem SDS-Gel zur elektrophoretischen Mobilität (→ Abbildung 3.7) bestimmte R _F -Werte der Größenstandardproteine.....	42

Tabelle A.4:	Gemessene und daraus errechnete Elutionswerte einer SEC (HPLC) der Größenstandardproteine unter EGTA-Bedingungen.....	43
Tabelle A.5:	Gemessene und daraus errechnete Elutionswerte einer SEC (HPLC) der Größenstandardproteine unter CaCl ₂ -Bedingungen.....	44

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Guanylate Cyclase-activating Proteins (GCAPs).....	1
1.1.1 Neuronal Calcium Sensor (NCS)-Proteine.....	1
1.1.2 GCAPs allgemein.....	1
1.2 Der Zebrafisch <i>Danio rerio</i> als visuelles Modellsystem.....	3
1.3 Fragestellung.....	3
2. Material und Methoden.....	4
2.1 Materialien.....	4
2.1.1 Chemikalien.....	4
2.1.2 Antibiotika.....	4
2.1.3 Enzyme.....	4
2.1.4 Vektoren.....	5
2.1.5 Bakterienstamm.....	5
2.1.6 Lösungen und Puffer.....	5
2.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	6
2.1.8 Geräte.....	6
2.2 Heterologe Expression und Reinigung der GCAPs.....	8
2.2.1 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	8
2.2.2 Heterologe Expression der verschiedenen GCAP-Varianten.....	9
2.2.3 Zellaufschluss und Ultrazentrifugation mit anschließender Dialyse für bGCAP2.....	9
2.2.4 Ammoniumsulfat-Fällung.....	10
2.2.5 Größenausschlusschromatographie (SEC).....	11
2.2.6 Anionenaustauschchromatographie (AEC).....	11
2.2.7 Einengen, Umpuffern und Lyophilisieren.....	12
2.3 Allgemeine Proteinanalyse.....	12

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	12
2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	13
2.4 Analyse der elektrophoretischen Mobilität.....	13
2.5 Limitierte Proteolyse mittels Trypsin.....	13
2.6 Bestimmung des Dimerisierungsgrades mittels analytischer SEC.....	14
3. Ergebnisse.....	15
3.1 Heterologe Expression und Reinigung der GCAPs.....	15
3.1.1 Heterologe Expression und Reinigung von bGCAP2.....	15
3.1.2 Heterologe Expression und Reinigung von zGCAP4.....	20
3.2 Die elektrophoretische Mobilitätsänderung von zGCAP4.....	20
3.3 Limitierte Proteolyse von zGCAP4.....	21
3.4 Der Dimerisierungsgrad von zGCAP4.....	24
4. Diskussion.....	27
4.1 Die elektrophoretische Mobilitätsänderung von zGCAP4.....	27
4.2 Limitierte Proteolyse von zGCAP4.....	28
4.3 Der Dimerisierungsgrad von zGCAP4.....	30
4.4 Synthese.....	31
4.5 Ausblick.....	32
Literaturverzeichnis.....	34
Anhang.....	38
A.1 Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren.....	38
A.2 Nukleotid-Sequenzen von zGCAP4wt und zGCAP4A ⁶ S.....	39
A.3 Verwendete Vektoren.....	40
A.4 SDS-PAGE.....	41
A.5 Auswertung der analytischen SEC.....	43

1. Einleitung

1.1 Guanylate Cyclase-activating Proteins (GCAPs)

1.1.1 Neuronal Calcium Sensor (NCS)-Proteine

Die GCAPs sind so genannte EF-Hand-Calcium-Bindungsproteine. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass alle Mitglieder dieser Protein-Superfamilie vier EF-Hand-Motive besitzen. Jedes EF-Hand-Motiv wird von einer Helix-Loop-Helix-Struktur gebildet, deren Loop die Calcium-Bindungsseite darstellt. EF-Hand-Calcium-Bindungsproteine sind somit potentiell in der Lage vier Calcium-Ionen zu binden.

Innerhalb dieser Superfamilie gehören die GCAPs zur Familie der NCS-Proteine. Diese Proteinfamilie, die überwiegend in Neuronen exprimiert wird, zeichnet sich dadurch aus, dass bei allen Mitgliedern die erste EF-Hand nicht funktionell ist. Außerdem kennzeichnet die NCS-Proteine eine N-terminale Acylierung, meist eine Myristoylierung. Diese erlaubt einigen NCS-Proteinen einen so genannten Calcium/Myristoyl-Switch, darunter Recoverin (Ames *et al.*, 1997). Dieser ist allerdings nicht bei den GCAPs zu beobachten, wo die Myristoyl-Gruppe scheinbar konstitutiv exponiert ist (Olshevskaya *et al.* 1997).

Die NCS-Proteine lassen sich in 5 Subfamilien einteilen: Frequentine, Visinin-like Proteins (VILIPs), Recoverine (deren vierte EF-Hand ebenfalls nicht funktionell ist), GCAPs und K_v-Channel interacting Proteins (KChIPs, die säugerspezifisch sind). Dabei sind die Recoverine und die GCAPs retinaspezifisch. Dort spielen sie eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und der Lichtadaptation in den Photorezeptoren (zur Übersicht: Palczewski *et al.*, 2000).

Zusammenfassungen und Übersichten der NCS-Proteine liefern Burgoyne und Weiss (2001) und Burgoyne (2007).

1.1.2 GCAPs allgemein

Der Name der GCAPs offenbart, dass sie mit den Guanylate/Guanylyl Cyclases (GCs) interagieren, die cGMP hydrolysieren. Deswegen spielen sie auch eine Rolle in der Signaltransduktion in Photorezeptoren.

Bisher umfasst diese NCS-Subfamilie neun Mitglieder. Nach der frühen Entdeckung von GCAP1 (Gorczyza *et al.* 1994, Palczewski *et al.* 1994 und Subbaraya *et al.* 1994) und GCAP2 (Dizhoor *et al.* 1994, Gorczyca *et al.* 1995 und Dizhoor *et al.* 1995) wurde zunächst ein GC-inhibitory Protein (GCIP, Li *et al.* 1998) und daraufhin das GCAP3 (Haeseleer *et al.* 1999 und Imanishi *et al.* 2002) identifiziert, bevor zuletzt GCAP4-8 (davon GCAP 4, 5 und 7 auch im Zebrafisch *Danio rerio*, Imanishi *et al.* 2004) gefunden wurden.

Die dreidimensionale Struktur ist bisher nur von nichtmyristoyliertem bGCAP2 (Ames *et al.* 1999), die in Abbildung 1.1 zu sehen ist, und nichtmyristoyliertem hGCAP3 (Stephen *et al.*

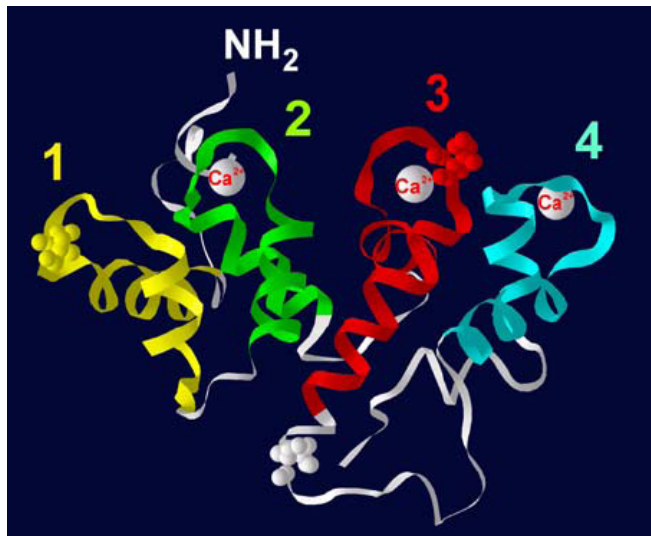


Abbildung 1.1: NMR-Struktur von nichtmyristoyliertem bGCAP2 mit drei gebundenen Calcium-Ionen. In: Gelb - EF-Hand 1, Grün - EF-Hand 2, Rot - EF-Hand 3, Cyan - EF-Hand 4. Als Kugelmodell sind die drei Cystein-Reste des Proteins dargestellt (Ames *et al.* 1999).

2006) bekannt. Die GCAPs zeigen im Vergleich zum Prototypen der EF-Hand-Calcium-Bindungsproteine, Calmodulin, eine kompaktere und stärker globuläre Struktur.

Da bisher bGCAP1 (23,5 kDa) und bGCAP2 (23,8 kDa) am besten untersucht worden sind, beziehen sich die getroffenen Aussagen im Wesentlichen auf diese beiden GCAP-Vertreter.

Die GCAPs sind wohl konstitutiv an die GCs gebunden, sodass sie Konformationsänderungen direkt

übertragen können. Konformationsänderungen treten in GCAPs calciumabhängig auf. Dabei regulieren GCAPs die GCs in einer Inhibitor-zu-Aktivator-Weise. Bei hohen intrazellulären Calciumkonzentrationen $[Ca]_i$, wie sie in einem dunkeladaptierten Photorezeptor zu finden sind, inhibieren die GCAPs die GCs (bei sehr hohen Konzentrationen sogar unter ihre Basalaktivität). Bei niedrigen $[Ca]_i$, wie sie in einem Photorezeptor unter Belichtung zu finden sind, dissoziieren die bis dahin gebundenen Calcium-Ionen vom GCAP, wodurch eine Konformationsänderung auftritt, die die GCAPs zu Aktivatoren der GC macht.

Im Gegensatz zu bGCAP1 und bGCAP2 sind die Zebrafisch-GCAPs (zGCAPs) bisher weniger gut untersucht. Neben dem zGCAP3 wurde nur das ebenfalls zapfenspezifische zGCAP4, mit einem Molekulargewicht von 21,3 kDa, näher charakterisiert. Nachdem zunächst lediglich eine den bisherigen GCAPs ähnliche GC-Aktivierung durch zGCAP4 festgestellt wurde (Imanishi *et al.* 2004), konnten auch calciumabhängige Konformationsänderungen gezeigt werden (Behnen 2007).

Eine Übersicht über GCAPs liefern Palczewski *et al.* (2004) oder Koch (2006).

1.2 Der Zebrafisch *Danio rerio* als visuelles Modellsystem

Der Zebrafisch *Danio rerio* bietet als visuelles Modellsystem eine Reihe von Vorteilen. Zum einen ist der Zebrafisch im Gegensatz zu anderen etablierten Modellsystemen (z. B. *Drosophila melanogaster*) ein Vertebrat. Das Gehirn allgemein und die Retina speziell sind im Vergleich mit anderen Vertebraten sehr ähnlich aufgebaut. Zum anderen weist der Zebrafisch eine schnelle Reproduktions- und Entwicklungszeit auf. Nicht zuletzt ist für dieses Modellsystem mittlerweile auch das gesamte Genom bekannt.

Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die Tatsache, dass die Retina des Zebrafisches (neben dem ähnlichen Aufbau zu anderen Vertebraten) im Vergleich zum Beispiel zur Rinderretina zapfendominiert ist. Es gibt vier Arten von Zapfen: Short Single Cones, Long Single Cones und zwei Typen an Double Cones. Daneben hat sich gezeigt, dass in diesen Zapfen zudem eine Vielfalt an GCAPs vorzufinden ist (→ 1.1.2). Da die Signaltransduktion bisher lediglich in Stäbchen gut charakterisiert worden ist, mögliche Unterschiede bei Zapfen aber weitestgehend unbekannt sind, liefert der Zebrafisch somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Signaltransduktion in Zapfen.

Eine Übersicht zum Zebrafisch geben Bilotta und Sascik (2001).

1.3 Fragestellung

Primär diene das Praxismodul zum Erlernen allgemeiner und auch spezieller experimenteller Techniken in einem biochemischen Labor. Dazu wurde die Expression und Reinigung eines Proteins an bGCAP2 und myristoyliertem (myr)bGCAP2 geübt. Gleichzeitig konnte damit ein gut charakterisiertes Referenzprotein gewonnen werden.

Darauf folgend wurden von zGCAP4 der Wildtyp (zGCAP4wt), die A⁶S-Austauschmutante (zGCAP4A⁶S) und die myristoylierte Mutante (myrzGCAP4A⁶S) exprimiert und gereinigt. Da bei der Entdeckung des zGCAP4 (Imanishi *et al.* 2004) lediglich festgestellt wurde, dass dieses wie die bisher charakterisierten GCAPs ein Aktivator der GC ist, liegen außer der Arbeit von Behnen (2007) keine weiteren Daten über zGCAP4 vor. Hauptsächlich wurde in letzterer Arbeit eine calciumabhängige Konformationsänderung des zGCAP4 durch SDS-PAGE-Analysen und Tryptophanfluoreszenzmessungen gezeigt.

In der hier vorliegenden Arbeit sollten die bisherigen Erkenntnisse zu den Konformationsänderungen im zGCAP4 im Wesentlichen bestätigt werden. Dazu wurden hier zunächst die SDS-PAGE-Analysen wiederholt. Außerdem wurden zur Bestätigung der calciumabhängigen Konformationsänderungen mit anderen experimentellen Ansätzen die limitierte Proteolyse mittels Trypsin und analytische SECs (an der HPLC-Anlage) angewandt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

- Acrylamid:Bis-Acrylamid
37,5:1-Fertiglösung (40%),
Sigma
- Ammoniumhydrogencarbonat,
VWR
- Ammoniumsulfat, *Roth*
- APS, *Merck*
- Bromphenolblau, *Sigma*
- BSA, *OmniLife Science*
- Coomassie Brilliant Blue R 250,
Serva
- Calciumchlorid, *Roth*
- DTT, *Roth*
- EGTA, *Roth*
- Essigsäure (100 %), *VWR*
- Ethanol (96 %, vergällt), *GBI-Lager*
- Ethanol p.a., *VWR*
- Glycerin, *Roth*
- Glycin, *Roth*
- Guanidiniumhydrochlorid, *Roth*
- IPTG, *Roth*
- Isobutanol p.a., *Merck*
- LB-Medium, *Sigma*
- β -Mercaptoethanol,
Fluka/Stratagene
- Myristoysäure (50mg/mL in
50 % Ethanol), *Sigma*
- Methanol p.a., *VWR*
- Natriumchlorid, *Fluka*
- PMSF, *OmniLife Science*
- Salzsäure (37 %, rauchend),
GBI-Lager
- SDS-Pellets, *Roth*
- TEMED, *Fluka*
- Tris, *Roth*

2.1.2 Antibiotika

- Ampicillin, *OLS* Konzentration der Stocklösung: 100 mg/mL
- Kanamycin, *OLS* Konzentration der Stocklösung: 30 mg/mL

2.1.3 Enzyme

- DNase, *Serva* Spezifische Aktivität: 3.747,8 Kunitz U/mg
- Lysozym, *Sigma* Spezifische Aktivität: 58.100 U/mg
- Trypsin, *Serva* Spezifische Aktivität: 3,6 U/mg

2.1.4 Vektoren

- pET21a(+) (Novagen) → zur Expression der verschiedenen GCAP-Varianten in *E. coli* (mit Ampicillin-Resistenz; Vektorkarte siehe Anhang)
- pBB131 (Dr. J.I. Gordon) → zur Expression der yNMT in *E. coli* (mit Kanamycin-Resistenz; Vektorkarte siehe Anhang)

2.1.5 Bakterienstamm

- *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP (*E. coli* B) (Novagen):
F – *ompT* [*lon*] *hsdS_B* (*rsm_B*⁺) *gal* [*dcm*] (*DE3*)

2.1.6 Lösungen und Puffer

LB-Medium:

- 0,1 % Baktotrypton
 - 0,5 % Hefeextrakt
 - 1 % NaCl
- zur Anzucht von *E. coli*-Zellen

Dialyse-Puffer:

- 20 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 1 mM DTT

SEC-Puffer:

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 150 mM NaCl
 - 1 mM DTT
 - 2 mM CaCl₂ für bGCAP2 bzw.
2 mM EGTA für zGCAP4
- für das FPLC- und HPLC-System

AEC-Puffer A:

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 50 mM NaCl
 - 1 mM DTT
 - 2 mM CaCl₂ für bGCAP2 bzw.
2 mM EGTA für zGCAP4
- für das FPLC-System

AEC-Puffer B:

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
 - 1 M NaCl
 - 1 mM DTT
 - 2 mM CaCl₂ für bGCAP2 bzw.
2 mM EGTA für zGCAP4
- für das FPLC-System

1x SDS-Elektrodenpuffer:

- 25 mM Tris
 - 192 mM Glycin
 - 0,1 % SDS
- für die SDS-PAGE

4x SDS-Probenpuffer:

- 25 % 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 50 % Glycerin
- 10 % β -Mercaptoethanol
- 4 % SDS
- 0,025 % Bromphenolblau
- für die SDS-PAGE

Färbelösung:

- 40 % (v/v) Ethanol (vergällt)
- 10 % (v/v) Essigsäure
- 0,2 % (w/v) Coomassie Blue
- für die SDS-PAGE

Entfärbelösung:

- 40 % (v/v) Ethanol (vergällt)
- 10 % (v/v) Essigsäure
- für die SDS-PAGE

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bradford-Reagenz:

- Protein-Assay, *Biorad*

Filter:

- GH Polypro (\varnothing 0,2 μ m), *Pall Life Sciences*

Flüssigkeitschromatographie-Säulen:

- HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (→ FPLC), *Amersham Biosciences*
- HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance (→ FPLC), *GE Healthcare*

- HiTrap Q XL (1 mL) (→ FPLC), *Amersham Biosciences*
- BioSep – SEC- S 2000 (300 mm x 4,6 mm) (→ HPLC), *Phenomenex*

Größenstandard für die SDS-PAGE:

- Precision Plus Protein Standard (unstained), *Biorad*

Konzentrierung von Proteinen:

- Amicon Ultra-4 Ultracel 10k, *Millipore*

2.1.8 Geräte

Autoklav:

- V-150, *Systec*

FPLC-System:

- ÄKTA-Anlage (Software: UNICORN 5.01), *Amersham*

Biosciences

- ÄKTA prime plus-Anlage
(Papierschreiber: REC 112),
Amersham Biosciences

HPLC-System:

- Anlage von *Waters* (Software:
Millennium)

Inkubatoren:

- Brutschrank, *Memmert*
- Heizblock: Standard Heatblock,
VWR
- Rollinkubator: Rotator SB3, *Stuard*
- Schüttelinkubator: Certomat IS,
Sartorius
- Thermomixer: Mixing Block
MB-102, *Bioer*
- Wasserbad, *Memmert*

Magnetheizrührer:

- MR 3001, *Heidolph*

pH-Messung:

- pH-Meter: inoLab 720, *WTW*
- pH-Elektrode: SenTix 41, *WTW*

Photometer:

- Ultrospec 1100pro, *Amersham*
Biosciences

Schüttler:

- Vibrax VXR, *IKA*

SDS-PAGE:

- System: Mini-Protean 3-Kammer,
Biorad
- Spannungsquelle: E835, *Consort*
- Dokumentation: AlphaImager
DE500 (Software: AlphaInnotech),
Biozym

Vakuumkonzentrator:

- Concentrator 5301, *Eppendorf*

Vakuumpumpe:

- PIZ 100, *Saskia*

Vortexer:

- lab dancer, *IKA*
- Vortex Genie 2, *Scientific*
Industries

Waagen:

- Feinwaage: Acculab ALC-210.4,
Sartorius
- 1104, *Sartorius*

Zentrifugen:

- Avanti J-E Centrifuge (Rotor: JLA-
10.500), *Beckmann Coulter*
- Biofuge stratos (Rotor: #3336),
Heraeus
- Biofuge Primo R (Rotor: #7588),
Heraeus
- Ultrazentrifuge: Discovery 90 SE
(Rotor: T865), *Sorvall*

- Mikro-Ultrazentrifuge: Discovery
M120 SE (Rotor: S100AT4),
Sorvall

- Tischzentrifuge: 5415 D, *Eppendorf*

2.2 Heterologe Expression und Reinigung der GCAPs

2.2.1 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Zum Einbringen von GCAP-codierender DNA in *E. coli* wurden bereits kompetente *E. coli*-Zellen mit rekombinanten pET21a(+)-Vektoren, in die eine GCAP-Sequenz eingebracht worden war, transformiert. Folgende Vektoren wurden dazu verwendet: pET21a(+)/bGCAP2, pET21a(+)/zGCAP4wt und pET21a(+)/zGCAP4A⁶S.

Eine Transformation wurde zum Einbringen von zGCAP4A⁶S-DNA in *E. coli* durchgeführt. Das erforderliche rekombinante Plasmid wurde mir freundlicherweise von Frau Petra Behnen zur Verfügung gestellt. Für bGCAP2 und zGCAP4wt dagegen wurden mir bereits transformierte Zellen zur Verfügung gestellt.

Für die Transformation wurde zunächst 1 µL Plasmid-DNA mit 100 µL kompetenter *E. coli*-Zellen vorsichtig gemischt. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurden die Zellen für 1 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Die Zellen wurden nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µL LB-Medium wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf einer LB-Agarplatte (mit 100 µg/mL Ampicillin (Amp)) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert (37 °C).

Um myristoylierte Varianten der GCAPs zu erhalten musste in *E. coli* zusätzlich die DNA für eine (Hefe-)Myristoyltransferase (yNMT), die im Vektor pBB131 enthalten ist, eingeführt werden. Dies wurde mithilfe vortransformierter Zellen bewerkstelligt.

Dabei wurden für die Myristoylierung von bGCAP2 schon pBB131-enhaltende *E. coli*-Zellen wie oben beschrieben mit pET21a(+)/bGCAP2 transformiert (nur dass 0,5 µl statt 1µl Plasmid-DNA verwendet wurden).

Für die Myristoylierung von zGCAP4A⁶S wurden schon pET21a(+)/zGCAP4A⁶S-enhaltende *E. coli*-Zellen wie oben beschrieben mit pBB131 transformiert.

Bei beiden Transformationen wurden indes Platten verwendet, die neben 100 µg/mL Amp auch 30 µL/mL Kanamycin (Kan) enthielten.

2.2.2 Heterologe Expression der verschiedenen GCAP-Varianten

Zur Expression von nichtmyristoyliertem bGCAP2, zGCAP4wt und zGCAP4A⁶S wurden zunächst 500 µL LB-Medium (mit 100 µg/mL Amp) mit den entsprechenden transformierten *E. coli*-Zellen (von einer LB-Agarplatte) angeimpft. Nach Inkubation über Nacht im Rollinkubator im Brutschrank (37 °C, 180 rpm) wurde diese Über-Nacht-Kultur verwendet um 500 mL LB-Medium (mit 100 µg/mL Amp) anzuimpfen. Dieser Ansatz wurde im Schüttelinkubator inkubiert (37 °C, 180 rpm), bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Die Expression der GCAPs wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach Weiterschütteln für 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (5.000 g, 10 min, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zunächst bei -80 °C gelagert.

Für die zGCAP4-Varianten wurden doppelte Mengen verwendet.

Zur Analyse des Expressions- und Reinigungsverlaufes von bGCAP2 wurden mehrere Proben von 500 µL genommen; bis hierhin: *Vor Induktion* mit IPTG, *Nach Induktion* mit IPTG und vor der Zellernte.

Der Ablauf für die Expression von myristoylierten Varianten (myr) von bGCAP2 und zGCAP4A⁶S (das durch die Mutation eine Consensussequenz für die Myristoylierung durch die yNMT enthält) entspricht im Grunde dem der nichtmyristoylierten Varianten. Die LB-Medien enthielten lediglich zusätzlich 30 µg/mL Kan. Außerdem wurde den Ansätzen bei einer OD₆₀₀ von 0,4 50 µg/mL Myristinsäure (Endkonzentration) zugefügt.

Für die zGCAP4-Variante wurde wiederum die doppelte Menge verwendet.

2.2.3 Zellaufschluss und Ultrazentrifugation mit anschließender Dialyse für bGCAP2

Zunächst wurden die nach der Zellernte bei -80 °C gelagerten Pellets in 20 mL 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert. Es folgte ein enzymatischer Zellaufschluss durch Zugabe von 100 µg/mL Lysozym (Endkonzentration) und 5 U/mL DNase (Endaktivität) und Inkubation im Wasserbad (30 min, 37 °C).

Auch hier wurde (bei bGCAP2) eine Probe von 500 µL zur Analyse genommen: *Nach Zellaufschluss* mit Lysozym und DNase.

Die bei der Expression genommenen Proben (→ 2.3.1) wurden durch das so genannte „Freeze and Thaw“ aufgeschlossen. Dazu wurden die Proben zuerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann in einem Heizblock (37 °C) wieder aufgetaut. Dies wurde anschließend noch mindestens fünfmal wiederholt.

Nach Versetzen der enzymatisch aufgeschlossenen Zellen mit 1 mM DTT und 0,1 mM PMSF (jeweils Endkonzentration) wurden die oberen Ansätze zentrifugiert (360.000g, 4 °C, 30 min; *Ultrazentrifugation*). Es entstanden zwei Fraktionen: löslicher Überstand und unlösliches Pellet.

Wie Behnen (2007) festgestellt hat, ist zGCAP4 überwiegend in der löslichen Fraktion vorzufinden, weswegen später mit dieser Fraktion weitergearbeitet wurde.

Für bGCAP2 und myrbGCAP2 wurde mit den unlöslichen Fraktionen fortgefahren. Vor Verwerfen der löslichen Fraktion wurde aber noch eine Probe von 500 µL genommen: *Überstand nach Ultrazentrifugation*.

Die unlösliche Fraktion, also das Pellet, wurde in 20 mL 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 1 mM DTT resuspendiert. Vom resuspendierten Pellet wurde eine Probe von 500 µL genommen: *Pellet nach Ultrazentrifugation*.

Die erhaltene Lösung wurde einmal für 5 h und einmal über Nacht gegen 3 L Dialyse-Puffer dialysiert. Unlösliches Material wurde danach durch erneute Ultrazentrifugation (360.000g, 30 min, 4 °C) präzipitiert und das entstandene Pellet verworfen.

2.2.4 Ammoniumsulfat-Fällung

Für eine erste grobe Reinigung wurden die GCAPs mit Ammoniumsulfat gefällt. Dafür wurde bei zGCAP4 jeweils die lösliche Fraktion der Ultrazentrifugation und bei bGCAP2 die dialysierte unlösliche Fraktion verwendet.

Die Menge an Ammoniumsulfat, die für die jeweilige Fällungsstufe zugegeben werden musste, wurde mithilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{1,77 \cdot (x - x_0)}{3,54 - x} \cdot V_{\text{Fraktion}} = m_{\text{Zugabe}} \quad (1)$$

mit: x = gewünschte Ammoniumsulfat-Konzentration (w/v), x_0 = Ammoniumsulfat-Konzentration (w/v) vor Zugabe, V_{Fraktion} = Volumen der eingesetzten Fraktion in mL,
 m_{Zugabe} = Menge an nötigem Ammoniumsulfat in g

Nach Berechnen der nötigen Ammoniumsulfat-Menge wurde dieses unter vorsichtigem Rühren auf Eis portionsweise zugegeben, bis alles gelöst war. Danach wurde zentrifugiert (20.000 rpm, 4 °C, 20 min).

Entsprach die Ammoniumsulfat-Zugabe schon der gewünschten Endkonzentration, wurde der Überstand verworfen und das Pellet weiter aufgearbeitet. Ansonsten (bei einer Fällungsreihe) wurde das Pellet verworfen, der Überstand einer erneuten Ammoniumsulfat-Fällung mit höherer Konzentration unterzogen und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde solange mit steigenden Ammoniumsulfat-Konzentrationen wiederholt, bis die gewünschte Endkonzentration erreicht war.

Dabei wurde für bGCAP2 eine Fällungsreihe durchgeführt, die folgende Stufen für die Ammoniumsulfat-Konzentration (w/v) umfasste: 40 %, 60 %, 80 %. Diese Reihe wurde per SDS-PAGE analysiert.

Für myrbGCAP2 wurde eine Fällungsreihe mit den Stufen 30 % und 70 % durchgeführt.

Für die zGCAP4-Varianten hat sich gezeigt, dass eine Fällungsreihe mit den Stufen 40 % und 70 % am geeignetsten ist. Entsprechend wurde dies auch so angewandt.

Die am Ende mit der gewünschten Ammoniumsulfat-Konzentration erhaltenen Pellets, also die ausgefällten GCAPs, wurden in je 2 mL SEC-Puffer resuspendiert.

2.2.5 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die eigentliche Reinigung der GCAPs erfolgte durch einen zweistufigen Prozess. Dieser umfasste an der FPLC-Anlage erst eine SEC und dann eine AEC (→ 2.3.6)

Verwendet wurde eine HiLoad Superdex-Säule, die mindestens mit einem Säulenvolumen entgastem SEC-Puffer äquilibriert worden war.

Das in SEC-Puffer resuspendierte Pellet der Ammoniumsulfat-Fällung wurde zunächst noch einmal zentrifugiert (100.000 g, 4 °C, 15 min), um die unlöslichen Bestandteile zu entfernen. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand bei einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule appliziert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 5 mL aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Fraktionen, die am meisten GCAP enthielten, wurden für die AEC vereint.

2.2.6 Anionenaustauschchromatographie (AEC)

Der zweite Schritt der Reinigung der GCAPs erfolgte durch eine AEC an der FPLC-Anlage.

Dazu wurde entweder eine HiTrap Q XL-Säule (für bGCAP2, myrbGCAP2, zGCAP4wt und myrzGCAP4A^{6S}) oder eine HiLoad Q Sepharose-Säule (für zGCAP4A^{6S}) mindestens mit einem Säulenvolumen entgastem AEC-Puffer A äquilibriert.

Die vereinigten SEC-Fractionen wurden mit einem entsprechenden Volumen 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM DTT 1:3 verdünnt und mit einer Flussrate von 0,5 mL/min (bGCAP2) oder 1 mL/min (myrbGCAP2 und zGCAP4-Varianten) auf die Säule appliziert.

Für bGCAP2 und myrbGCAP2 wurde zum Eluieren ein linearer Gradient von 0-55 % AEC-Puffer B in 13 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 3 mL/min (bGCAP2) oder 1 mL/min (myrbGCAP2) angewandt. Die Eluate wurden in Fraktionen von 1 mL gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die zGCAP4-Varianten wurde dagegen ein Stufengradient verwendet, der die Stufen 26 % (0,3 M), 37 % (0,4 M) und 47 % (0,5 M) AEC-Puffer B (in Klammern NaCl-Konzentration) umfasste. Die Eluate bei 0,4 M und 0,5 M NaCl wurden in Fraktionen von 1 mL (zGCAP4^{wt} und myrzGCAP4) bzw. 5 mL (zGCAP4A^{6S}) gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Fraktionen, die am meisten GCAP enthielten, wurden vereint.

2.2.7 Einengen, Umpuffern und Lyophilisieren

Die vereinigten AEC-Fractionen wurden durch Zentrifugation in Amicon-Gefäßen eingengt (7.500 g, 4 °C). Zum Lyophilisieren wurden die Proben umpuffert. Dazu wurde die eingengte Probe mindestens mit dem dreifachen Ausgangsvolumen an 50 mM Ammoniumhydrogenphosphat eingengt (7.500 g, 4 °C). Nach Konzentrationsbestimmung (→ 2.3.2) der Probe wurden 100 µg- und 500 µg-Aliquots erstellt und im Vakuumkonzentrator lyophilisiert. Diese Aliquots konnten bei -80 °C gelagert werden.

2.3 Allgemeine Proteinanalyse

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die allgemeine Analyse eines Experimentes oder für die Bestimmung des Molekulargewichtes der GCAPs wurde die denaturierende SDS-PAGE angewandt.

Die SDS-Gele wurden laborüblich gegossen. Das Trenngel war entweder 12%- oder 15%ig, das Sammelgel jeweils 5%ig (deren Zusammensetzung im Anhang zu finden ist). Nach Vorbereitung des auspolymerisierten Gels wurden die mit 4x SDS-Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Zusätzlich wurden immer auch 5 µL eines Größenstandards aufgetragen. Die Elektrophorese verlief jeweils bei einer konstanten Spannung von 200 V in 30-50 min. Nach Beenden der Elektrophorese wurden die Gele laborüblich mit Coomassie gefärbt und am AlphaImager dokumentiert.

Die Erläuterung der Auswertung der Gele hinsichtlich der apparenten Molekulargewichte ist im Anhang zu finden.

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Protein- bzw. GCAP-Konzentration einer Lösung wurde die Proteinbestimmung nach Bradford angewandt.

Dazu wurde eine ausreichend verdünnte Probe mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 800 μL aufgefüllt, mit 200 μL Bradford-Reagenz versetzt und gut gemischt. Dieses Gemisch wurde für 15 min stehen gelassen und anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Nullwert diente 800 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit 200 μL Bradford-Reagenz. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden mithilfe einer laborinternen BSA-Kalibriergeraden ausgewertet ($1 \mu\text{g Protein} \hat{=} 0,05 \text{ AU}$).

2.4 Analyse der elektrophoretischen Mobilität

Die Analyse der elektrophoretischen Mobilität bei verschiedenen Bedingungen (calciumfrei oder calciumhaltig) erfolgte im Grunde durch eine SDS-PAGE (\rightarrow 2.3.1).

Dazu wurden zunächst drei Ansätze erstellt: jeweils 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ $z\text{GCAP4}_{\text{wt}}$, $z\text{GCAP4A}^{\text{6S}}$ oder $\text{myr}z\text{GCAP4A}^{\text{6S}}$ in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT.

Von diesen Ansätzen wurden jeweils 2-4 μL mit 5 μL 4x SDS-Probenpuffer, 4 μL 10 mM EGTA bzw. CaCl_2 (Endkonzentration: 2 mM) und 7-9 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ vermischt. Die Gemische wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und einer Elektrophorese unterworfen.

Die Bestimmung der apparenten Molekulargewichte erfolgte mit einer Kalibriergeraden, die im Anhang zu finden ist.

2.5 Limitierte Proteolyse mittels Trypsin

Für einen Vergleich in der Konformation zwischen bGCAP2 und zGCAP4 und für eine Untersuchung von calciumabhängigen Konformationsänderungen des zGCAP4 (und auch des bGCAP2) wurde eine limitierte Proteolyse mittels Trypsin durchgeführt.

Dazu wurden zunächst vier Ansätze erstellt:

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">- <i>bGCAP2</i> mit 10 mM <i>EGTA</i>- <i>zGCAP4</i> mit 10 mM <i>EGTA</i>- <i>bGCAP2</i> mit 10 mM <i>CaCl</i>₂- <i>zGCAP4</i> mit 10 mM <i>CaCl</i>₂ | } | jeweils 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ GCAP
in 50 mM Tris, pH 8,0 |
|---|---|---|

Es wurden 90 µL der jeweiligen Ansätze mit 10 µL frisch angesetztem 0,5 mg/ml Trypsin, 1 mM HCl vermischt und bei 37 °C inkubiert (Proteolysestart). Nach 2 min, 5 min und 10 min wurden der Mischung jeweils 15 µL entnommen, mit 5 µL 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 4 min bei 95 °C inkubiert (Proteolysestop). Zusätzlich wurden als Kontrolle (Inkubationszeit: 0 min) 15 µL direkt aus den Ansätzen mit 5 µL 4x SDS-Probenpuffer gemischt und für 4 min bei 95 °C inkubiert. Der Ausgang der Proteolyse wurde per SDS-PAGE analysiert.

Die Proteolyse wurde für alle drei zGCAP4-Varianten durchgeführt, wobei für zGCAP4wt und zGCAP4A⁶S bGCAP2 und für myrzGCAP4A⁶S myrbGCAP2 als Referenz diente.

2.6 Bestimmung des Dimerisierungsgrades mittels analytischer SEC

Zur Analyse des Dimerisierungsgrades der verschiedenen zGCAP4-Varianten und zur Bestimmung der apparenten Molekulargewichte wurden analytische SECs an der HPLC-Anlage durchgeführt.

Dazu wurden zunächst für alle drei zGCAP4-Varianten jeweils zwei Ansätze erstellt: je 0,5 µg/µL zGCAP4 in *calciumfreien* SEC-Puffer (2 mM EGTA) bzw. in *calciumhaltigen* SEC-Puffer (2 mM CaCl₂).

Es wurde eine BioSep-Säule mit mindestens einem Säulenvolumen entgastem SEC-Puffer (entweder mit 2 mM EGTA oder mit 2 mM CaCl₂) äquilibriert. Darauf wurden jeweils 20 µL der Ansätze appliziert und bei einer Flussrate von 0,35 mL/min in 15 min eluiert.

Die Berechnung des Dimerisierungsgrades erfolgte durch Flächenintegration der korrespondierenden Maxima auf dem Chromatogramm.

Die Erläuterung der Auswertung der Chromatogramme hinsichtlich der apparenten Molekulargewichte ist im Anhang zu finden.

3. Ergebnisse

Um ausreichende Mengen an zGCAP4 für die einzelnen Experimente zur Verfügung zu haben, wurde dieses in seinen verschiedenen Ausführungen (zGCAP4wt, zGCAP4A⁶S und myrzGCAP4A⁶S) heterolog in *E. coli* exprimiert und, nach enzymatischem Zellaufschluss, aus der löslichen Fraktion der Ultrazentrifugation weiter gereinigt. Dazu folgte nach einer Ammoniumsulfat-Fällung an der FPLC-Anlage erst eine SEC und dann eine AEC mit einem Stufengradienten (mit drei Stufen) zur Elution des zGCAP4. Danach wurde das Protein zur Lagerung lyophilisiert.

Neben den zGCAP4-Varianten wurde auch bGCAP2, sowohl nichtmyristoyliert als auch myristoyliert, gewonnen. Dabei wurde allerdings die unlösliche Fraktion der Ultrazentrifugation weiter gereinigt, weswegen vor der Ammoniumsulfat-Fällung eine Dialyse nötig war. Bei der der SEC folgenden AEC wurde dann zur Elution des bGCAP2 ein linearer Gradient verwendet.

Nachdem ausreichend zGCAP4 (und auch bGCAP2) gewonnen wurde, konnten verschiedene Experimente zur Untersuchung von calciumabhängigen Konformationsänderungen des zGCAP4 durchgeführt werden.

Diese umfassten zum einen die Untersuchung der calciumabhängigen Änderung der elektrophoretischen Mobilität des zGCAP4 in seinen drei Varianten mittels SDS-PAGE.

Zum anderen wurden alle drei Varianten, sowohl mit Calcium als auch ohne, der limitierten Proteolyse mittels Trypsin unterworfen; mit bGCAP2 als Referenz.

Zuletzt wurde der Dimerisierungsgrad aller drei Varianten unter calciumfreien und unter calciumhaltigen Bedingungen mittels analytischer SEC an der HPLC-Anlage untersucht.

3.1 Heterologe Expression und Reinigung der GCAPs

3.1.1 Heterologe Expression und Reinigung von bGCAP2

Der Expressions- und Reinigungsverlauf der einzelnen GCAP-Varianten soll exemplarisch anhand des nichtmyristoylierten bGCAP2 erfolgen. Die ersten Schritte, von der Expression über den Zellaufschluss bis zur Ultrazentrifugation, fasst Abbildung 3.1 zusammen.

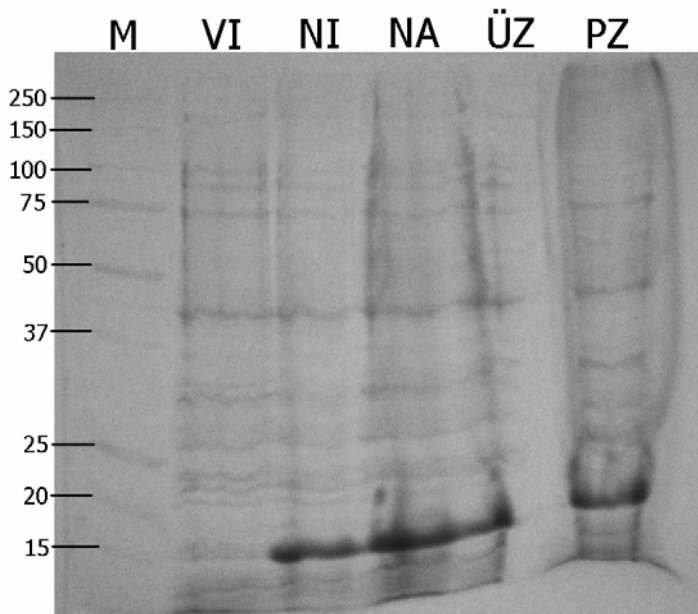


Abbildung 3.1: Expressions- und Reinigungsverlauf von bGCAP2. Aufgetragen wurden auf ein 12%iges SDS-Gel jeweils 20 µL Probe mit 6,7 µL 4x SDS-Probenpuffer. Daneben wurden 5 µL des Größenstandard-Markers M aufgetragen (Molekulargewichte in kDa sind angegeben). Die Elektrophorese dauerte 30 min. VI = Vor Induktion mit IPTG, NI = Nach Induktion mit IPTG, NA = Nach Zellaufschluss, ÜZ = Überstand nach Ultrazentrifugation, PZ = Pellet nach Ultrazentrifugation; siehe auch 2.2.

Vor der Induktion durch IPTG sind zwar viele Banden schwacher Intensität zu erkennen, eine prominente Bande tritt jedoch erst nach Induktion mit IPTG auf. Diese Bande auf Höhe von ca. 15 kDa entspricht also dem exprimierten bGCAP2. Das Bandenmuster verändert sich nach Zellaufschluss nicht wesentlich, was auch nicht zu erwarten war. Allerdings tritt durch die Ultrazentrifugation eine deutliche Trennung auf. Im Überstand nach Ultrazentrifugation sind sehr wenige Banden und diese auch nicht sehr deutlich zu sehen. Dahingegen ist im Pellet nach Ultrazentrifugation der Großteil der Banden aus den vorherigen Proben zu finden; darunter

die bGCAP2-Bande. Aufgrund dessen wurde das bGCAP2 im Folgenden auch aus dem Pellet der Ultrazentrifugation, also der unlöslichen Fraktion, gereinigt, die eine Dialyse erforderte.

Dass das SDS-Gel so verzerrt war, lag wohl daran, dass die letzte Probe PZ noch Guanidiniumhydrochlorid enthielt.

Der Dialyse folgte eine Ammoniumsulfatfällung, für die für bGCAP2 eine Fällungsreihe mit den Stufen 40%, 60 % und 80 % Ammoniumsulfat-Konzentration durchgeführt wurde. Diese ist in Abbildung 3.2 zusammengefasst.

Es ist für jede Fällungsstufe ein charakteristisches Bandenmuster zu beobachten, da verschiedene Proteine bei verschiedenen Konzentrationen an Ammoniumsulfat ausfallen. Jedoch ist festzustellen, dass bei jeder Fällungsstufe bGCAP2 ausfällt. Dies könnte daran liegen, dass das bGCAP2 in sehr hoher Konzentration vorliegt. Allerdings ist bei 60 % Ammoniumsulfat deutlich am meisten bGCAP2 ausgefallen.

Aufgrund dieses Fällungsmusters wurde für myrGCAP2 zunächst eine Vorfällung bei 30 % und dann die eigentliche Fällung bei 70 % Ammoniumsulfat durchgeführt.

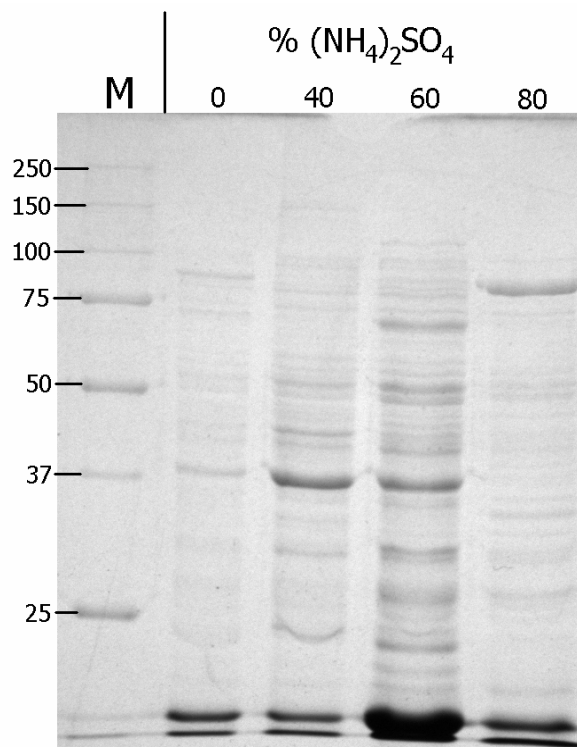


Abbildung 3.2: Ammoniumsulfat-Fällungsreihe mit bGCAP2. Aufgetragen auf das 12%ige SDS-Gel wurden jeweils 4 μL der jeweiligen Fällungsstufe mit 5 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 3 μL 4x SDS-Probenpuffer. Daneben wurden 5 μL des Größenstandard-Markers M aufgetragen (Molekulargewichte in kDa sind angegeben). Die Elektrophorese dauerte 45 min.

Als erster eigentlicher Reinigungsschritt folgte nun an der FPLC-Anlage eine SEC. Das dabei entstandene Chromatogramm und das korrespondierende SDS-Gel geben die Abbildungen 3.3 und 3.4 wieder.

Das Chromatogramm zeigt zwei prominente Maxima. Das erste Maximum ist der für die SEC charakteristische „Non bound-Peak“, der die großen schnell durch die Gelmatrix durchwandernden Proteine darstellt. Das zweite Maximum wurde in 5 mL-Fractionen gesammelt und per SDS-PAGE analysiert. Auf dem SDS-Gel sieht man bei den mit dem ersten Maximum korrespondierenden Fractionen (1-7) deutliche Banden auf Höhe von 20 kDa. Das erste Maximum entspricht also dem bGCAP2, das somit bei ca. 165 mL eluierte.

bGCAP2

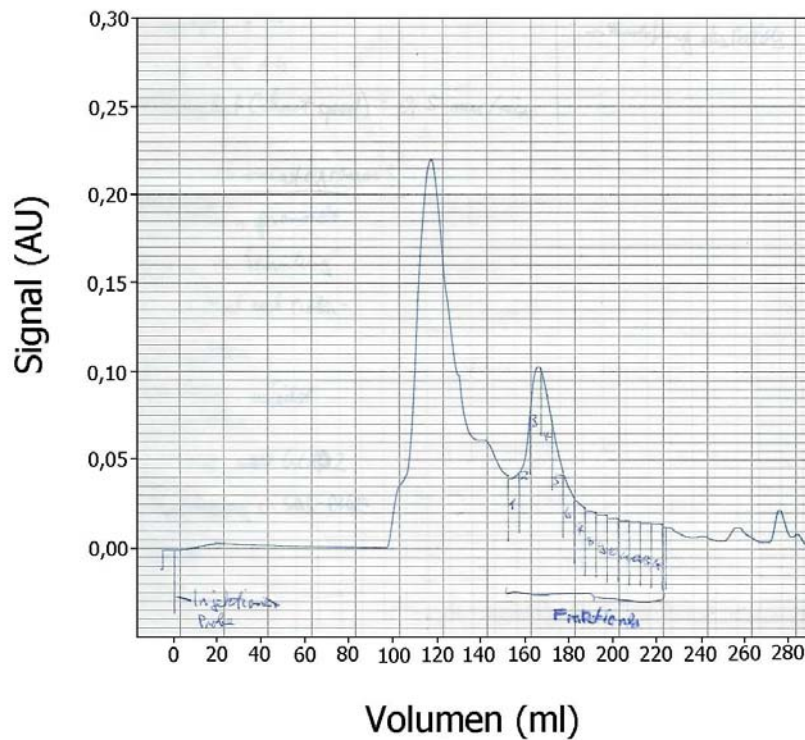


Abbildung 3.3: SEC-Chromatogramm mit bGCAP2. Es wurden die 2 mL des nach Ammoniumsulfat-Fällung in SEC-Puffer resuspendierten Pellets auf eine HiLoad Superdex-Säule appliziert und bei einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Aufgetragen ist das bei 280 nm gemessene Absorptionssignal in AU des Eluates gegen das Elutionsvolumen in mL. Markiert sind die Injektion/Applikation und die gesammelten 5 mL-Fractionen.

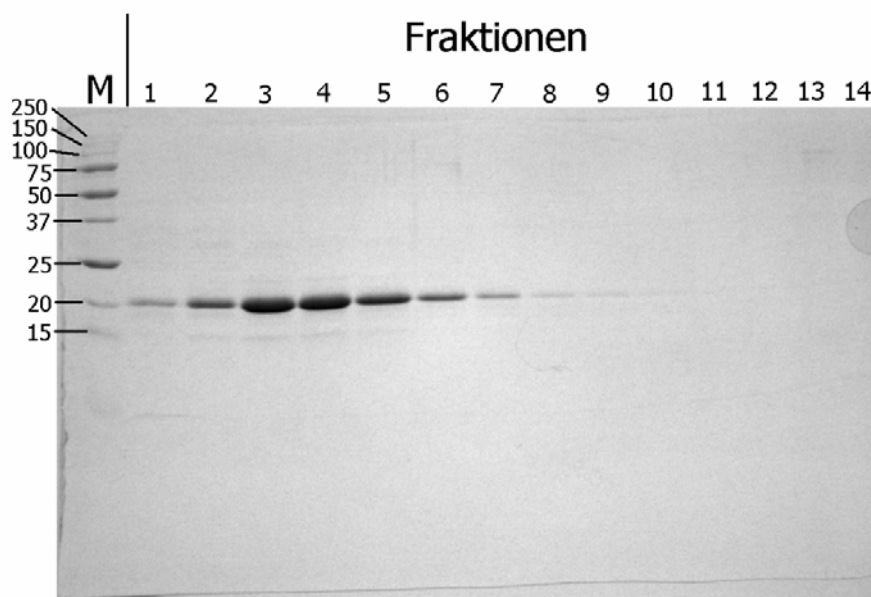


Abbildung 3.4: SDS-PAGE-Analyse der gesammelten SEC-Fractionen mit bGCAP2. Aufgetragen wurden auf ein 12%iges Gel jeweils 12 μ L der Fraktion mit 4 μ L 4x SDS-Probenpuffer. Daneben wurden 5 μ L des Größenstandard-Markers M aufgetragen (Molekulargewichte in kDa sind angegeben). Die Elektrophorese dauerte 35 min.

Die vereinigten SEC-Fractionen wurden nach Verdünnung einer AEC unterworfen. Das dabei entstandene Chromatogramm und das korrespondierende SDS-Gel geben die Abbildungen 3.5 und 3.6 wieder.

Auch das AEC-Chromatogramm zeigt zwei prominente Maxima. Vergleicht man die gesammelten Fraktionen im SDS-Gel, so wird deutlich, dass das erste Maximum mit dem bGCAP2 korrespondiert. Im Gel ist nämlich auf Höhe von 20 kDa bei den entsprechenden Fraktionen (7-13) eine deutliche Bande zu beobachten. Es erfolgte also eine Elution des bGCAP2 bei 55 % AEC-Puffer B.

Das zweite Maximum rührt vermutlich von anderen Proteinen her, die im Gel allerdings nicht zu beobachten sind (Fraktionen 14-19). Deren hohe Absorption liegt wohl an einem höheren Anteil aromatischer Aminosäuren.

Die Expression und Reinigung von myrbGCAP2 zeigte keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zu dem von nichtmyristoyliertem bGCAP2.

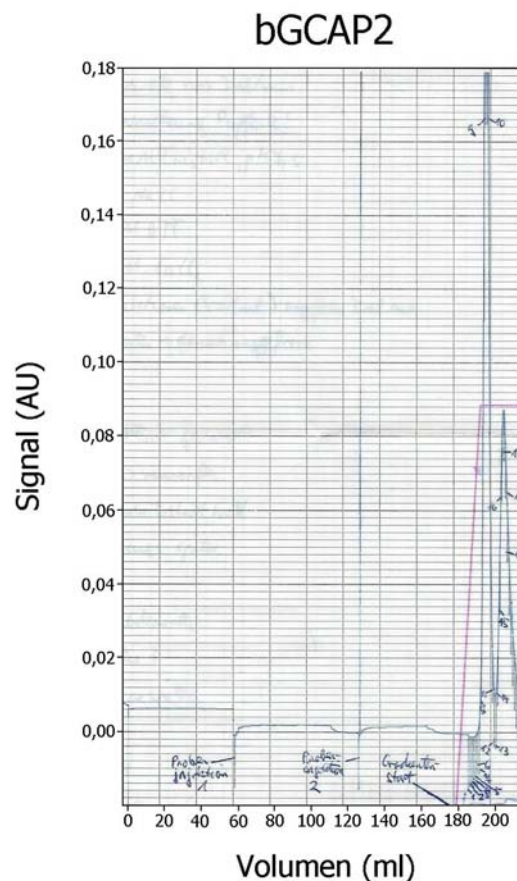


Abbildung 3.5: AEC-Chromatogramm mit bGCAP2. Es wurden die vereinigten und 1:3 verdünnten SEC-Fractionen mit einer Flussrate von 0,5 mL/min auf eine HiTrap Q XL-Säule appliziert und bei einer Flussrate von 3 mL/min mit einem linearen Gradienten von 0-55 % AEC-Puffer B in 13 mL eluiert. Aufgetragen ist das bei 280 nm gemessene Absorptionssignal in AU des Eluates gegen das Elutionsvolumen in mL. Markiert sind die Injektionen/Applikationen und die gesammelten 1 mL-Fractionen. Zudem ist die Leitfähigkeit in rot zu sehen.

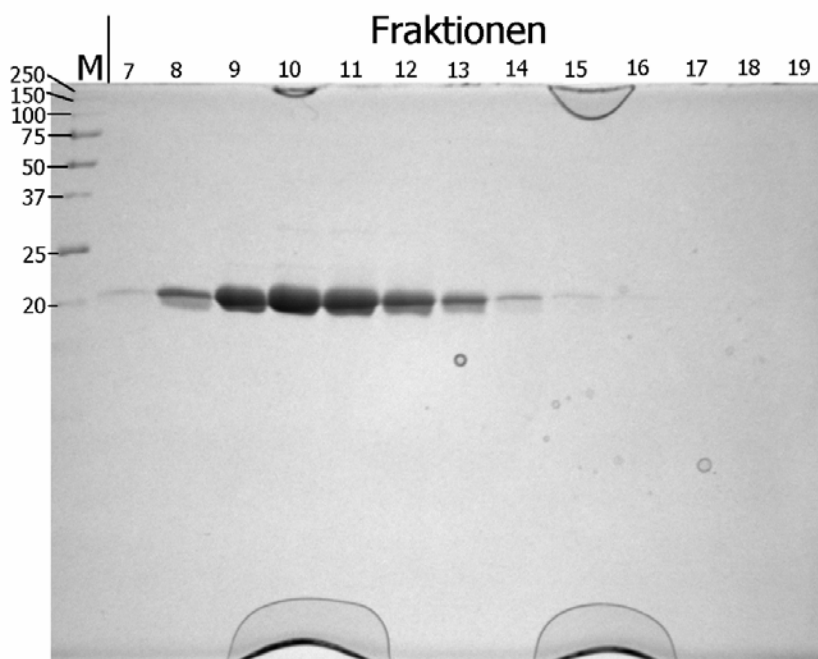


Abbildung 3.6: SDS-PAGE-Analyse der gesammelten AEC-Fraktionen mit bGCAP2. Aufgetragen wurden auf ein 12%iges Gel jeweils 10 μL der Fraktion mit 3,3 μL 4x SDS-Probenpuffer. Daneben wurden 5 μL des Größenstandard-Markers M aufgetragen (Molekulargewichte in kDa sind angegeben). Die Elektrophorese dauerte 35 min.

3.1.2 Heterologe Expression und Reinigung von zGCAP4

Die Unterschiede in der Durchführung sind hinreichend beschrieben (\rightarrow 2.2).

Nennenswert bei der Analyse sind Elutionswerte des zGCAP4.

Im Gegensatz zu bGCAP2 eluierten bei der *SEC* die zGCAP4-Varianten schon bei ca. 140 mL, also deutlich früher.

Bei der *AEC* eluierten die zGCAP4-Varianten sowohl bei 0,4 M als auch bei 0,5 M NaCl (Stufe 2 und 3 des Stufengradienten) in bedeutenden Mengen, sodass Fraktionen von beiden Stufen vereinigt und zum Lyophilisieren verwendet wurden.

3.2 Die elektrophoretische Mobilitätsänderung von zGCAP4

Um eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität unter calciumfreien und calciumhaltigen Bedingungen festzustellen, wurde eine SDS-PAGE angewandt, deren Ergebnis in Abbildung 3.8 zu sehen ist.

Die Bestimmung der apparenten Molekulargewichte MW_{app} gibt Tabelle 3.1 wieder.

Im direkten Vergleich (untere Werte der Tabelle 3.1) lässt sich feststellen, dass von den drei zGCAP4-Varianten die A⁶S-Mutante mit 17,4 kDa die größte elektrophoretische Mobilität und die myristoylierte Mutante mit 18,2 kDa die kleinste aufweist. Der Wildtyp liegt mit 17,8 kDa dazwischen. Zumindest die große Mobilität von zGCAP4A⁶S war reproduzierbar.

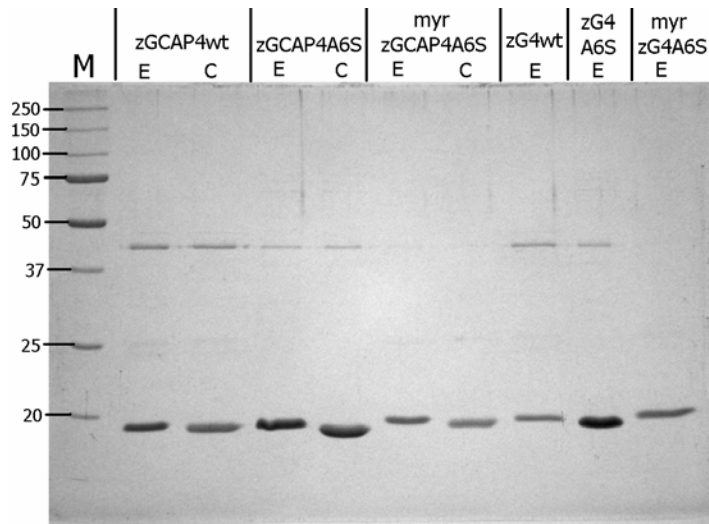


Abbildung 3.7: SDS-PAGE-Analyse der elektrophoretischen Mobilitätsänderung von zGCAP4. Aufgetragen auf ein 12%iges Gel wurden jeweils 20 μ L Probe (4 μ g Protein). Daneben wurden 5 μ L des Größenstandard-Markers M aufgetragen (Molekulargewichte in kDa sind angegeben). Die Elektrophorese dauerte 35 min. E = 2 mM EGTA, C = 2 mM CaCl_2 (jeweils Endkonzentration).

Vergleicht man die Mobilitätsänderungen unter calciumfreien und calciumhaltigen Bedingungen (obere Werte der Tabelle 3.1), so weist jede der Varianten unter Calciumeinfluss eine höhere elektrophoretische Mobilität auf. Dabei ist der Unterschied bei zGCAP4A⁶S mit 0,8 kDa im Gegensatz zu zGCAP4wt und myrzGCAP4A⁶S mit je 0,4 kDa am größten, was auch reproduzierbar war.

Tabelle 3.1: Die apparenten Molekulargewichte der zGCAP4-Varianten bei der SDS-PAGE unter verschiedenen Bedingungen. MW_{app} = apparentes Molekulargewicht in kDa. E = 2mM EGTA, C = 2mM CaCl_2 (jeweils Endkonzentration).

Probe	MW_{app} (kDa)	$\Delta\text{MW}_{\text{app}}$ (kDa)
zGCAP4wt, E	17,4	0,4
zGCAP4wt, C	17,0	
zGCAP4A ⁶ S, E	17,4	0,8
zGCAP4A ⁶ S, C	16,6	
myrzGCAP4A ⁶ S, E	17,8	0,4
myrzGCAP4A ⁶ S, C	17,4	
zGCAP4wt, E	17,8	-
zGCAP4A ⁶ S, E	17,4	-
myrzGCAP4A ⁶ S, E	18,2	-

3.3 Limitierte Proteolyse von zGCAP4

Die mit den verschiedenen zGCAP4-Varianten unter verschiedenen Bedingungen (und mit bGCAP2 als Referenz) gewonnenen SDS-Gele fasst Abbildung 3.8 zusammen.

Vergleicht man zGCAP4wt unter EGTA- und CaCl_2 -Bedingungen (A und D rechts in Abbildung 3.8), so ist zu sehen, dass sich das Muster an Proteolyse-Produkten unter

Calciumeinfluss (CaCl_2 -Bedingungen) deutlich anders darstellt als ohne Calcium (EGTA-Bedingungen). Zum einen läuft die Proteolyse unter Calciumeinfluss deutlich langsamer ab, von dem zGCAP4wt ist nach 10 min also noch eindeutig mehr vorhanden. Zum anderen treten unter dem nicht verdauten zGCAP4wt andere Banden, also Proteolyse-Produkte, auf. Insbesondere die zwei prominenten Proteolyse-Banden nach 10 min unter Calciumeinfluss kurz unter 15 kDa sind so nicht unter EGTA-Bedingungen zu finden. Zwar sind anfangs (2 min) auch noch zwei Banden auf ungefähr der gleichen Höhe zu sehen; aber von diesen (sofern es überhaupt zu den CaCl_2 -Bedingungen korrespondierende Banden sind) ist zumindest die obere nach 10 min nicht mehr zu finden.

Betrachtet man dagegen das bGCAP2 (A und D links), so sind die Unterschiede zwischen den Bedingungen wesentlich drastischer als beim zGCAP4wt. Wohingegen ohne Calcium spätestens nach 10 min das eigentliche bGCAP2 komplett verdaut wurde, ist mit Calcium nach 10 min noch eine deutliche Menge vorhanden. Dieser Effekt war aber schon bekannt und deswegen diente bGCAP2 auch als Referenz.

Der Unterschied in der Proteolysegeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Bedingungen ist bei zGCAP4A⁶S (B und E rechts) nicht mehr so eindeutig. Dies könnte aber daran liegen, dass die Konzentration der Ansätze wohl höher war als $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, weswegen dann mehr Protein aufs Gel aufgetragen wurde. Das könnte die Unterschiede z. T. verschleiert haben. Denn der charakteristische Unterschied in den Proteolyse-Produkten mit den zwei prominenten Banden ist auch hier zu sehen.

Ein ziemlich ähnliches Bild ergibt sich bei myrzGCAP4A⁶S (C und F rechts). Hier tritt der Unterschied ebenfalls nicht so deutlich auf, auch wenn hier gleichfalls wohl höhere Konzentrationen der Ansätze Unterschiede verdeckt haben könnten. Denn auch hier sind die zwei charakteristischen Banden nach 10 min unter Calciumeinfluss zu beobachten; wenn auch die schwache Färbung der Proteolyse-Produkte konkrete Aussagen zum Vergleich mit den EGTA-Bedingungen schwierig macht.

Vergleicht man myrbGCAP2 (C und F links) unter den verschiedenen Bedingungen mit bGCAP2 (A und D links), so ist unter Calciumeinfluss die Proteolyse sehr ähnlich, sowohl vom Fortschreiten als auch von den Proteolyse-Produkten her. Lediglich ohne Calcium zeigen sich Unterschiede bei den Proteolyseprodukten insofern, als dass die auffälligen zwei Banden kurz unter 15 kDa nach 2 min beim nichtmyristoylierten bGCAP2 bei myrbGCAP2 so nicht mehr zu finden sind.

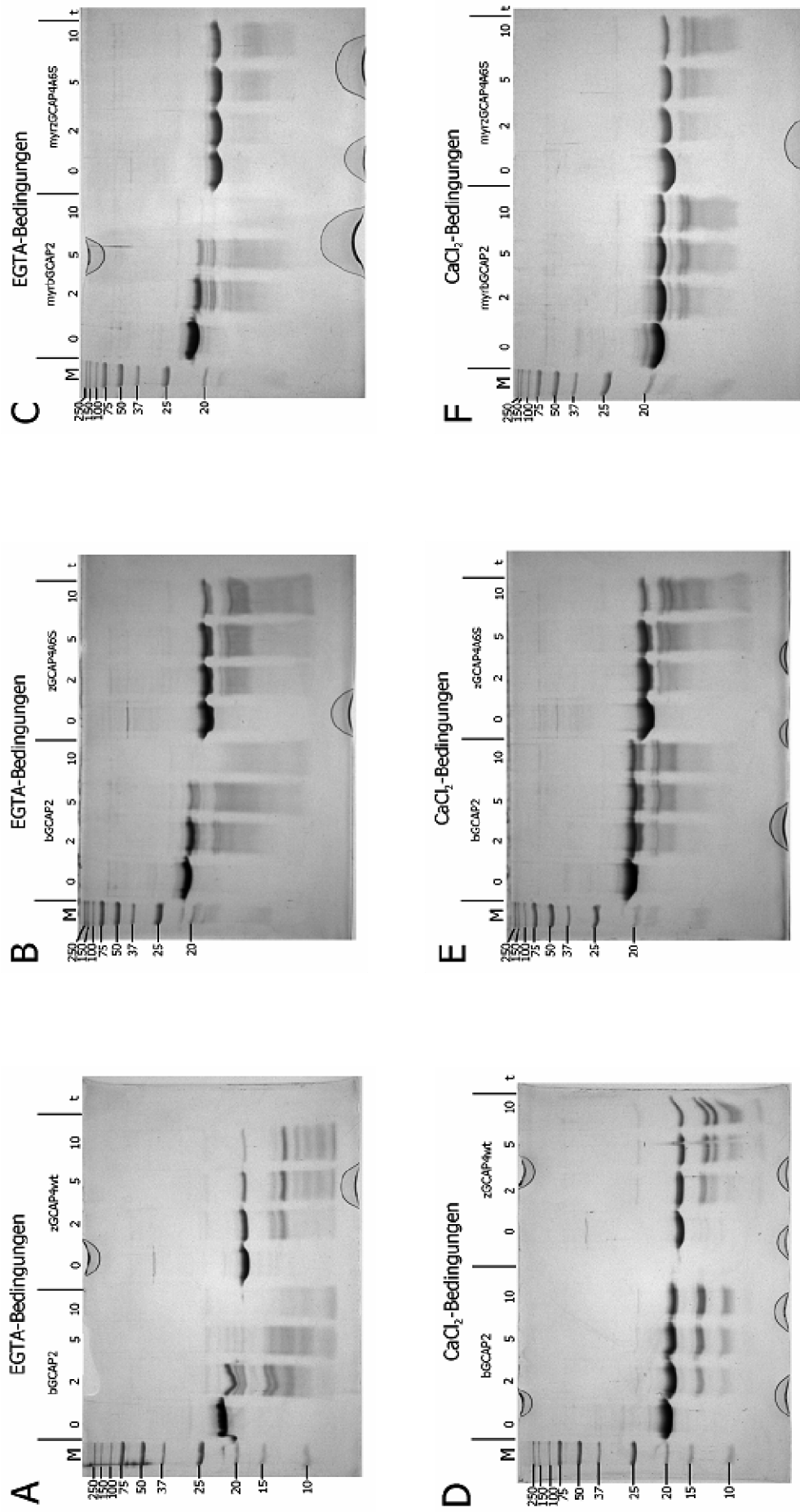


Abbildung 3.8: SDS-PAGE-Analyse der limitierten Proteolyse mittels Trypsin. 90 μ L Probe der GCAPs (je 0,5 μ g/ μ L) wurden mit 10 μ L frischem 0,5 mg/mL Trypsin, 1mM HCl gemischt und bei 37 °C inkubiert. 15 μ L wurden entweder direkt aus dem Ansatz (Zeit t = 0) oder aus dem Gemisch nach 2 min, 5 min und 10 min entnommen (t = 2, 5, 10) und mit 5 μ L 4x SDS-Probepuffer auf ein Gel (15 %) aufgetragen. Daneben wurden 5 μ L des Größenstandard-Markers M aufgetragen (Molekulargewichte in kDa sind angegeben). Die Elektrophorese dauerte jeweils 45 min. EGTA-Bedingungen: 10 mM EGTA und CaCl₂-Bedingungen: 10 mM CaCl₂ (jeweils Endkonzentration). Proteolyse mit: A und D - bGCAP2 und zGCAP4wt; B und E - bGCAP2 und zGCAP46S; C und F - myr2GCAP2 und myr2GCAP46S.

3.4 Der Dimerisierungsgrad von zGCAP4

Die Chromatogramme der verschiedenen zGCAP4-Varianten, die bei den unter calciumfreien und calciumhaltigen Bedingungen durchgeführten analytischen SECs an der HPLC-Anlage gewonnen wurden, stellt Abbildung 3.10 dar. Die gezeigten Chromatogramme zeigen repräsentative Einzelmessungen. Durchgeführt wurden Doppelmessungen. Ausgewertet wurden die Chromatogramme zum einen hinsichtlich ihres Dimerisierungsgrades durch Flächenintegration und zum anderen hinsichtlich der MW_{app} der zGCAP4-Varianten (siehe Anhang). Die Ergebnisse fasst Tabelle 3.2 zusammen.

Tabelle 3.2: Auswertung der SEC-Chromatogramme der HPLC mit den verschiedenen zGCAP4-Varianten. Angegeben sind für alle zGCAP4-Varianten die apparenten Molekulargewichte MW_{app} in kDa unter EGTA- oder $CaCl_2$ -Bedingungen (SEC-Puffer mit entweder 2 mM EGTA oder 2 mM $CaCl_2$) für das erste Maximum (Max.) (entspricht Dimer) und für das zweite Maximum im Chromatogramm (entspricht Monomer). Außerdem ist der Dimerisierungsgrad in % für die verschiedenen Bedingungen angegeben. Bei den mit * versehenen Werten konnten nur Einzelmessungen ausgewertet werden; bei den anderen Werten wurden Doppelmessungen ausgewertet.

	MW_{app} (kDa)			% Dimer	
	EGTA	$CaCl_2$		EGTA	$CaCl_2$
zGCAP4wt – Max. 1	47	46	zGCAP4wt	22 ± 1	15*
zGCAP4wt – Max. 2	35	32	zGCAP4A ⁶ S	35 ± 1	34 ± 2
zGCAP4A ⁶ S – Max. 1	45	48	myrzGCAP4A ⁶ S	32 ± 2	10*
zGCAP4A ⁶ S – Max. 2	37	33			
myrzGCAP4A ⁶ S – Max. 1	48	45			
myrzGCAP4A ⁶ S – Max. 2	35	35			

Bei den MW_{app} lässt sich feststellen, dass bei allen zGCAP4-Varianten die Werte für das erste Maximum (45-48 kDa) größer als für das zweite Maximum (32-37 kDa) waren. Da eine SEC angewandt wurde, kann also das erste Maximum mit einem putativen Dimer der GCAPs und das zweite Maximum mit einem Monomer korreliert werden.

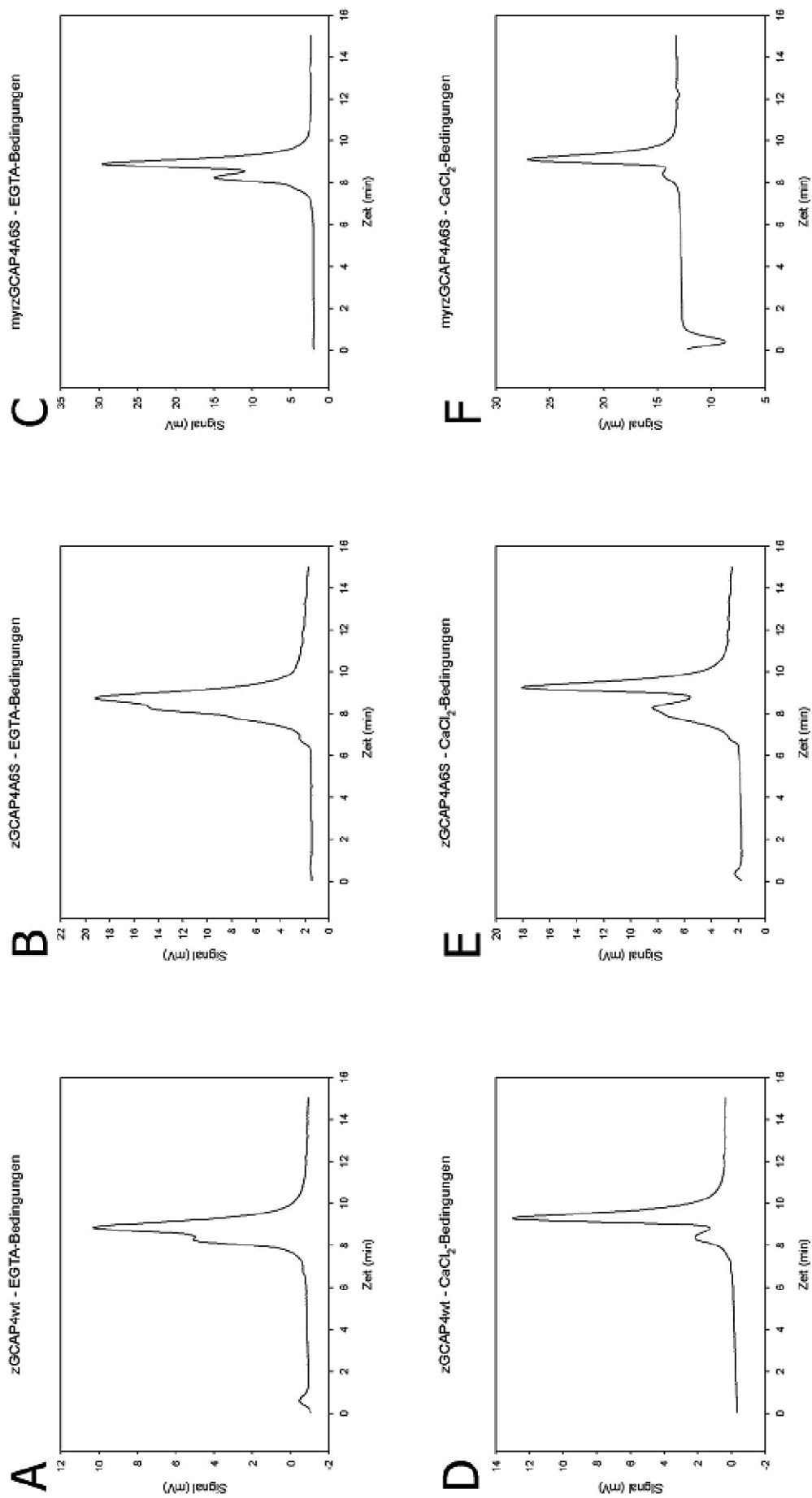


Abbildung 3.9: SEC-Chromatogramme der HPLC mit den zGCAP4-Varianten. Es wurden 20 μL von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ zGCAP4 in SEC-Puffer auf eine BioSep-SEC-Säule appliziert und bei einer Flussrate von 0,35 mL/min in 15 min eluiert. Aufgetragen ist das Signal des Eluates in mV gegen die Elutionszeit in min. EGTA-Bedingungen: SEC-Puffer mit 2mM EGTA, CaCl₂-Bedingungen: SEC-Puffer mit 2 mM CaCl₂. Messung mit: A und D - zGCAP4wt, B und E - zGCAP4 Δ 6S, C und F - myrGCAP4 Δ 6S.

Zudem fällt auf, dass die MW_{app} unter EGTA-Bedingungen bei einigen Maxima (um 1-4 kDa) größer ausfallen. Davon betroffen sind allerdings nicht das Dimer-Maximum (Max. 1) von zGCAP4A⁶S, bei dem es umgekehrt ist, und das Monomer-Maximum (Max. 2) von myrzGCAP4A⁶S, bei dem die MW_{app} unter beiden Bedingungen gleich sind. Insgesamt lässt sich somit kein klares Gesamtbild ableiten.

Dahingegen fällt der Dimerisierungsgrad bei allen drei Varianten unter EGTA-Bedingungen größer aus. Der größte Unterschied ist mit 22 ± 2 % bei myrzGCAP4A⁶S im Gegensatz zu 7 ± 1 % bzw. 1 ± 2 % bei zGCAP4wt bzw. zGCAP4A⁶S zu finden. Innerhalb einer Bedingung weist zGCAP4A⁶S jeweils mit 35 ± 1 bzw. 34 ± 2 kDa das größte MW_{app} im Gegensatz zu 22 ± 1 und 15 kDa bzw. 32 ± 2 und 10 kDa bei zGCAP4wt bzw. myrzGCAP4A⁶S auf. Allerdings ist bei den Dimerisierungsgraden zu beachten, dass für zGCAP4wt und myrzGCAP4A⁶S unter CaCl₂-Bedingungen jeweils nur Einzelmessungen ausgewertet werden konnten.

4. Diskussion

Im Laufe dieser Arbeit konnten sowohl bGCAP2 (nicht myristoyliert und myristoyliert) als auch zGCAP4 (als Wildtyp, A⁶S-Austauschmutante und myristoylierte Mutante) erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend über einen zweistufigen Reinigungsprozess mittels FPLC (SEC und AEC) gereinigt werden.

Im Anschluss wurde zGCAP4 in seinen drei Varianten bezüglich calciumabhängiger Konformationsänderungen mittels dreier Experimente näher charakterisiert. Diese umfassten eine Untersuchung der elektrophoretischen Mobilität, die limitierte Proteolyse mittels Trypsin und eine Bestimmung des Dimerisierungsgrades mittels analytischer SEC.

Bei allen drei Experimenten konnte festgestellt werden, dass sich Unterschiede zwischen calciumfreien und calciumhaltigen Versuchsbedingungen ergaben.

4.1 Die elektrophoretische Mobilitätsänderung von zGCAP4

Sowohl bei zGCAP4wt als auch bei zGCAP4A⁶S und myrzGCAP4A⁶S hat sich gezeigt, dass die elektrophoretische Mobilität unter calciumfreien Bedingungen geringer war als unter calciumhaltigen (→ Abbildung 3.7). Das apparente Molekulargewicht aller drei Varianten war mit 2 mM CaCl₂ niedriger als mit 2 mM EGTA (→ Tabelle 3.1). Dieses Phänomen wird auch als „Calcium-Shift“ bezeichnet. Daraus lässt sich schließen, dass das zGCAP4, wenn es Calcium gebunden hat, in seiner Konformation kompakter zu sein scheint, als wenn es kein Calcium gebunden hat. Somit deutet das darauf hin, dass zGCAP4 calciumabhängige Konformationsänderungen eingeht. Wie diese Konformationsänderungen im Detail aussehen, lässt sich mit dieser Methode allerdings nicht sagen.

Der Calcium-Shift ist bei bGCAPs auch schon hinreichend charakterisiert worden (GCAP1: Frins *et al.* 1996, Hwang *et al.* 2004 und Hwang und Koch 2002; GCAP2: Hwang und Koch 2002). Auch für die Zebrafisch-GCAPs konnten Calcium-Shifts festgestellt werden (GCAP3: Imanishi *et al.* 2002; GCAP4: Imanishi *et al.* 2004 und Behnen 2007). Allerdings ist bei der Größe des Calcium-Shifts eine eindeutige Diskrepanz festzustellen. Wohingegen GCAP1 und GCAP2 einen deutlichen Shift von ungefähr 5 kDa aufweisen, ist der Shift bei GCAP3 und GCAP4 sehr gering. Die calciumabhängigen Konformationsänderungen scheinen bei GCAP3 und GCAP4 somit in wesentlich geringerem Maße abzulaufen bzw. die dreidimensionale Struktur wesentlich weniger zu beeinflussen als bei GCAP1 und GCAP2.

Bei Behnen (2007) lag der Calcium-Shift für nichtmyristoyliertes zGCAP4 bei 1 kDa und für myristoyliertes zGCAP4 bei 1,6 kDa. Dies zeigt auch einen weiteren Effekt: Wie auch schon

bei GCAP1 und GCAP2 festgestellt werden konnte, weisen die myristoylierten Varianten einen größeren Shift auf. Die Myristoyl-Gruppe scheint somit also die calciumabhängigen Konformationsänderungen zu beeinflussen und zwar derart, dass die Konformation bei Calcium-Bindung stärker verändert wird.

Vergleicht man nun die hier vorliegenden Ergebnisse, so lässt sich zunächst feststellen, dass der beobachtete Calcium-Shift bei allen drei Varianten noch geringer ausfiel (0,4-0,8 kDa) als bei Behnen (2007); und dies trotz mehrmaliger Wiederholung. Eine Erklärung kann nicht gegeben werden. Auch ist auffällig, dass bei dieser Messung kein Unterschied beim Shift zwischen zGCAP4 und myrzGCAP4A⁶S (jeweils 0,4 kDa) festgestellt werden konnte. Dies könnte aber daran liegen, dass ein möglicher Unterschied angesichts des sehr geringen Shifts verschleiert worden sein könnte.

Abgesehen davon lassen sich zum ersten Mal Aussagen über zGCAP4A⁶S treffen. Dieses hatte mit 0,8 kDa den größten Shift bzw. einen größeren als der Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass die Mutante (die erstellt wurde um eine ausreichende Myristoylierung zu erreichen) gewisse Auswirkungen auf die Konformationsänderungen des zGCAP4 zu haben scheint. Diese nicht nativen Auswirkungen könnten durch die Myristoyl-Gruppe aufgehoben worden sein, da der Shift bei myrzGCAP4A⁶S schließlich dem bei zGCAP4wt entspricht. Es könnte allerdings auch eine mögliche Auswirkung der Myristoyl-Gruppe verdeckt worden sein. Die genaue Folge dieser Mutation bleibt somit zunächst unklar.

Außerdem ließ sich reproduzierbar feststellen, dass zGCAP4A⁶S nicht nur den größten Shift aufwies, sondern zudem generell die größte elektrophoretische Mobilität zeigte. Dies deutet ebenfalls auf eine strukturelle Auswirkung der eingeführten Mutation hin. Und zwar dahingehend, dass die Struktur des zGCAP4 noch kompakter zu sein scheint.

4.2 Limitierte Proteolyse von zGCAP4

Bei allen drei untersuchten zGCAP4-Varianten hat sich gezeigt, dass sich sowohl beim Fortschreiten der Proteolyse als auch hinsichtlich der Proteolyse-Produkte deutliche Unterschiede zwischen EGTA- und CaCl₂-Bedingungen ergaben. Und zwar derart, dass unter EGTA-Bedingungen die Proteolyse deutlich schneller verlief (→ Abbildung 3.8).

Trypsin spaltet Polypeptide und Proteine C-terminal nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Eine schnellere Proteolyse deutet also darauf hin, dass diese Spaltstellen innerhalb des Proteins ohne Calcium (EGTA-Bedingungen) zugänglicher waren als unter Calciumeinfluss

(CaCl₂-Bedingungen). Dies ist somit also ein weiteres Indiz dafür, dass zGCAP4 calciumabhängige Konformationsänderungen eingeht. Hat zGCAP4 das Calcium gebunden, scheint es, auf diese Ergebnisse gestützt, in seiner Konformation kompakter zu sein, da die Spaltstellen für das Trypsin schwerer zugänglich waren.

Für bGCAP2 haben sich ähnliche Ergebnisse gezeigt, jedoch mit gewissen Abweichungen. Allerdings war dies schon bekannt für bGCAP2, jedoch nicht publiziert. Lediglich für bGCAP1 liegen publizierte Ergebnisse vor (Rudnick-Nawrot *et al.* 1998). Vergleicht man bGCAP1 und bGCAP2, so fällt eine sehr ähnliche Proteolyse bei beiden Proteinen auf. Bei beiden ist unter EGTA-Bedingungen schon sehr früh das Hauptprotein komplett verdaut, wohingegen es unter CaCl₂-Bedingungen selbst nach 10 min nicht komplett verdaut war.

Abgesehen davon sind zum ersten Mal Aussagen über myristoyliertes bGCAP2 bzw. über mögliche Auswirkungen der Myristoyl-Gruppe auf die Proteolyse möglich. Zwar ist unter Calciumeinfluss kein signifikanter Unterschied sowohl im Fortschreiten der Proteolyse als auch bezüglich der Proteolyse-Produkte zu finden; aber ohne Calcium ist sehr wohl ein Unterschied festzustellen. Zwei auffällige Banden an Proteolyse-Produkten bei bGCAP2 (siehe Ergebnisse) sind nämlich bei myrbGCAP2 so nicht zu sehen. Und schließlich ist der calciumfreie Zustand der physiologisch aktive des bGCAP2. Dies ist also ein Hinweis dafür, dass die Myristoyl-Gruppe einen Einfluss auf die Konformation des bGCAP2 zu haben scheint. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass die Myristoyl-Gruppe bei bGCAP2 nicht unbedingt notwendig ist um die GC zu aktivieren (Olshevskaya *et al.* 1997 und Hwang und Koch 2002), wohingegen sie für eine physiologische Aktivierung der GC durch bGCAP1 nötig ist (Frins *et al.* 1996). Dies würde also bedeuten, dass der hier beobachtete Einfluss der Myristoyl-Gruppe auf die Konformation keine Auswirkung auf die Interaktion des bGCAP2 mit der GC hat.

Vergleicht man nun bGCAP1 und bGCAP2 mit zGCAP4, so ist der Verdau zwar bei allen drei Varianten unter Calciumeinfluss von ähnlicher Geschwindigkeit, ohne Calcium ist der Verdau bei ersteren jedoch wesentlich schneller als bei zGCAP4 (und das in allen seinen Varianten). Insgesamt deutet das also darauf hin, dass zGCAP4 in seiner Konformation unter physiologischen Bedingungen, wo es aktiv ist (EGTA-Bedingungen), kompakter zu sein scheint als bGCAP1 und bGCAP2. Zwar wird zGCAP4 in seiner dreidimensionalen Struktur wohl im Groben der von bGCAP2 (→ Abbildung 1.1) ähneln; allerdings sind durchaus Unterschiede zu erwarten, wenn man neben den hier gezeigten Ergebnissen die Tatsache

beachtet, dass zGCAP4 auch wesentlich hydrophober als zumindest bGCAP1 ist (Behnen 2007). Bisher wurde die dreidimensionale Struktur von zGCAP4 aber noch nicht aufgeklärt. Inwiefern diese putativen Unterschiede in der Struktur Auswirkungen auf die Interaktion mit der GC haben, ist schwer zu sagen, da darüber bisher keine näheren Untersuchungen gemacht wurden.

Betrachtet man hingegen zGCAP4A⁶S und myrzGCAP4A⁶S, so fällt der geringere Unterschied mit oder ohne Calcium im Vergleich zu zGCAP4wt auf. Ohne Calcium scheint der Verdau bei diesen beiden Varianten noch langsamer abzulaufen. Aber wie schon in den Ergebnissen vermerkt, könnte dies an einer zu hohen Menge der GCAPs gelegen haben. Lag es aber nicht daran, so wäre das ebenfalls ein Hinweis dafür, dass die A⁶S-Mutation eine Auswirkung auf die Konformation des zGCAP4 hat. So wie es sich hier darstellt, wäre die Konformation kompakter als bei zGCAP4wt. Da die Proteolyse von myrzGCAP4A⁶S ähnlich verlief, ist somit auch nicht zu unterscheiden, ob dies ebenfalls an der A⁶S-Mutation lag oder ob die Myristoyl-Gruppe eventuell einen ähnlichen Effekt bewirkt hat bzw. bewirkt haben könnte.

4.3 Der Dimerisierungsgrad von zGCAP4

Auch für den Dimerisierungsgrad ließen sich deutliche Unterschiede zwischen EGTA- und CaCl₂-Bedingungen feststellen (→ Abbildung 3.9 und Tabelle 3.2); er fiel bei allen drei Varianten größer aus (wobei zu beachten ist, dass nicht bei allen Werten Doppelmessungen ausgewertet werden konnten). Dies zeigt wiederum, dass alle drei Varianten des zGCAP4 wohl calciumabhängige Konformationsänderungen eingehen. Diese befähigen das zGCAP4 scheinbar dazu unter calciumfreien Bedingungen mehr Dimere auszubilden. Es scheint also eine mögliche Dimerisierungsdomäne des zGCAP4 ohne Calcium durch eine solche postulierte Konformationsänderung zugänglicher zu sein.

Bei bGCAP1 und bGCAP2 ergaben sich im Laufe der Jahre mehrere Hinweise, die darauf schließen lassen, in welcher Form sie physiologisch aktiv sind. Bei bGCAP1 stellt es sich so dar, dass es wohl als Monomer aktiv ist bzw. calciumunabhängig so vorliegt (Sokal *et al.* 2001 und Hwang *et al.* 2004). Bei bGCAP2 konnte dagegen ein calciumabhängiges Monomer-Dimer-Gleichgewicht festgestellt werden (Olshevskaya *et al.* 1999). Dabei liegt das bGCAP2 unter Bedingungen, bei denen es physiologisch aktiv ist (calciumfrei mit EGTA),

überwiegend als Dimer und unter calciumhaltigen Bedingungen (physiologisch inaktiv) als Monomer vor.

Vergleicht man damit die hier vorliegenden Befunde, so wäre es durchaus möglich wie für bGCAP2 ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht (mit einem aktiven Dimer) für zGCAP4 zu postulieren. Diese Vermutung kann jedoch mit den hier angewandten Methoden nicht abschließend bestätigt werden. Es bleibt jedoch die Frage stehen, inwiefern ein solches Gleichgewicht physiologisch ist bzw. wäre. Denn schließlich liegen bei bGCAP2 Dimerisierungsgrade über 50 % vor, hier bei zGCAP4 übersteigen sie jedoch nicht 35 %.

Diskussionswürdige Punkte liefert auch ein Vergleich der drei zGCAP4-Varianten untereinander. Dabei fällt vor allem auf, dass der Dimerisierungsgrad von zGCAP4A^{6S} unter EGTA-Bedingungen mit 35 ± 1 % nicht nur am höchsten ist, er ist nahezu genauso hoch (34 ± 2 %) unter CaCl₂-Bedingungen. Auch hier zeigt sich wieder, dass die A^{6S}-Mutation verglichen mit dem Wildtyp wohl eine Auswirkung auf die Konformation bzw. auf Konformationsänderungen hat.

Das dann der Dimerisierungsgrad von myrzGCAP4A^{6S} unter CaCl₂-Bedingungen wieder so niedrig ist (10 %) bzw. näher an zGCAP4wt liegt (15 %), könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Myristoyl-Gruppe in der Lage ist die durch die Mutation induzierten Auswirkungen auf die Konformation des zGCAP4 auszugleichen. Allerdings bleibt unklar, ob der hohe Dimerisierungsgrad von myrzGCAP4A^{6S} unter EGTA-Bedingungen (mit 32 ± 2 % fast so hoch wie bei zGCAP4A^{6S}) im Vergleich mit zGCAP4wt (22 ± 1 %) ein Hinweis darauf ist, dass die Myristoyl-Gruppe ebenfalls eine Rolle bei der Dimerisierung spielt. Schließlich ist das zGCAP4 *in vivo* myristoyliert, dennoch scheint die Myristoyl-Gruppe, ähnlich wie bei bGCAP2 (Hwang und Koch 2002), nicht essentiell für die Aktivierung der GC zu sein (Behnen 2007). Jedoch kann dieser hohe Dimerisierungsgrad genauso gut an der A^{6S}-Mutation liegen, was bedeuten würde, dass die Myristoyl-Gruppe die Mutation nicht ausgleichen kann. Auch diese Frage kann hier nicht abschließend beantwortet werden.

4.4 Synthese

Bei allen drei Experimenten konnten Ergebnisse festgestellt werden, die die Postulierung einer calciumabhängigen Konformationsänderung des zGCAP4 stützen.

Dazu wurden mit der Untersuchung der elektrophoretischen Mobilität zum einen Experimente wie bei Behnen (2007) durchgeführt. Zum anderen wurden mit der limitierten Proteolyse

mittels Trypsin und der Bestimmung des Dimerisierungsgrades mittels analytischer SEC neue Experimente angewandt. Zusammen mit den Messungen der Tryptophanfluoreszenz von Behnen ergibt sich so ein abgerundetes Gesamtbild, da alle Ergebnisse eine calciumabhängige Konformationsänderung stützen. Und zwar ist die dreidimensionale Konformation des zGCAP4 unter Calciumeinfluss wesentlich kompakter als ohne Calcium.

Leider hat sich bei allen Experimenten ebenfalls gezeigt, dass die A⁶S-Mutante merkliche Auswirkungen auf das Verhalten des zGCAP4 hat. Für bGCAP1 existiert eine äquivalente D⁶S-Mutante, die allerdings nicht solche Effekte aufweist. Da aber alle myristoylierten Varianten von zGCAP4 gleichzeitig diese Mutation beinhalten, ist es schwierig Aussagen über die Auswirkung der Myristoyl-Gruppe zu treffen. Bei sämtlichen festgestellten Unterschieden zwischen zGCAP4wt und myrzGCAP4A⁶S bleibt es unklar, ob diese eventuell nicht auf die Mutation zurückzuführen sind.

Dennoch kann man sowohl zGCAP4A⁶S als auch myrzGCAP4A⁶S calciumabhängige Konformationsänderungen nicht absprechen.

4.5 Ausblick

Auch wenn die Fragestellung dieser Arbeit hinreichend bearbeitet werden konnte, wurden dennoch einige Fragen aufgeworfen bzw. bleiben einige Frage unbeantwortet.

Theoretisch lassen sich alle Experimente, die bisher für GCAP1-3 umfassend durchgeführt wurden, prinzipiell auch für zGCAP4 anwenden. Da aber zGCAP4 bisher, ebenso wie die anderen Zebrafisch-GCAPs, nicht gut charakterisiert wurde, müssen zunächst grundlegende Experimente angewandt werden. Auch wenn sich die zGCAPs im Großen und Ganzen vermutlich ähnlich wie die bisher charakterisierten GCAPs verhalten, muss dies dennoch im Einzelfall zunächst festgestellt werden.

Calciumabhängige Konformationsänderungen konnten durch Behnen (2007) und diese Arbeit festgestellt werden. Dennoch bleibt unklar, wie genau und an welcher Stelle diese Konformationsänderungen stattfinden.

Diese Frage könnte am elegantesten durch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des zGCAP4 in calciumfreier und calciumgebundener Form durch bspw. NMR-Studien beantwortet werden. Da dies aber für nichtmyristoyliertes bGCAP2 und hGCAP3 in

calciumgebundener Form nur unter großer Anstrengung gelang, ist dieser Ansatz für zGCAP4 zunächst nicht vielversprechend.

Dennoch könnten Aussagen diesbezüglich durch andere experimentelle Ansätze gewonnen werden. Diese umfassen bspw. Mutagenese-Studien (insbesondere mit Tryptophan-Resten) oder Messungen der Cystein-Zugänglichkeiten.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Rolle der Myristoyl-Gruppe im zGCAP4, zumal sie für eine Aktivierung der GC nicht essentiell zu sein scheint. Da diesbezüglich auch schon Unterschiede zwischen bGCAP1 und bGCAP2 festgestellt wurden, sind auch bei den Zebrafisch-GCAPs Unterschiede zu erwarten, zumal zGCAP4 deutlich hydrophober als bGCAP1 ist. Dies könnte eine mögliche Membranbindungsfunktion der Myristoyl-Gruppe entweder redundant oder aber auch wahrscheinlicher werden lassen.

Auch wenn ein Calcium/Myristoyl-Switch (und damit eine mögliche Membranbindung) unwahrscheinlich erscheint, muss dies z. B. mit SPR-Spektroskopie zunächst gezeigt werden. Bei allen Untersuchungen zur Myristoyl-Gruppe muss aber beachtet werden, dass die A⁶S-Mutation die Ergebnisse beeinflussen könnte. Dies sollte möglichst ausgeschlossen oder aber zumindest bedacht werden.

Bezüglich des Dimerisierungsgrades wäre eine Überprüfung eines möglichen Gleichgewichtes wünschenswert. Dazu müsste man die Dimer- bzw. Monomer-Fractionen getrennt sammeln und erneut einer SEC unterwerfen. Zudem wären Mutagenese-Studien wie bei Olshevskaya *et al.* (1999) von Interesse.

Nicht zuletzt sind GC-Aktivierungsstudien essentiell. Zwar wurden bisher einige durchgeführt (Imanishi *et al.* 2004 und Behnen 2007). Bei diesen Studien ist allerdings das Problem, dass sie an Stäbchenaußensegment-Präparationen von Rindern durchgeführt wurden. Wünschenswert wären für das zGCAP4 (wie auch für die anderen zGCAPs) Studien entweder an physiologischen Zapfenußensegment-Präparationen vom Zebrafisch oder aber an klonierten GCs aus dem Zebrafisch. Beides ist jedoch in Vorbereitung.

Zudem sind Charakterisierungen der anderen zGCAPs, insbesondere der anderen zapfenspezifischen (3, 5, und 7) unabdingbar. Nur dadurch kann zGCAP4 eventuell in einen physiologischen Kontext gebracht und unter Umständen eine Erklärung für die Vielfalt an GCAPs im Zebrafisch geliefert werden. Auch dies ist in Vorbereitung.

Literaturverzeichnis

- Ames, J. B., Ishima, R., Tanaka, T., Gordon, J. I., Ikura, M. (1997): Molecular mechanics of calcium-myristyl switches, *Nature* **389**, 198-202
- Ames, J. B., Dizhoor, A. M., Ikura, M., Palczewski, K., Stryer, L. (1999): Three-dimensional structure of guanylyl cyclase activating protein-2, a calcium-sensitive modulator of photoreceptor guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **274**, 19329-19337
- Behnen, P. (2007): Biochemische Charakterisierung von zGCAP4 aus Zebrafischen. Diplomarbeit, Institut für Biologie und Umweltwissenschaften, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
- Bilotta, J. und Saszik, S. (2001): The zebrafish as a model visual system. *Int. J. Devl. Neurosci.* **19**, 621-629
- Burgoyne, R. D. (2007): Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca^{2+} signaling. *Nat. Rev. Neurosci.* **8** (3), 182-193
- Burgoyne, R. D. und Weiss, J. L. (2001): The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+} -binding proteins. *Biochem. J.* **353**, 1-12
- Dizhoor, A. M., Lowe, D. G., Olshevskaya, E. V., Laura, R. P., Hurley, J. B. (1994): The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron* **12**, 1345-1352
- Dizhoor, A. M., Olshevskaya, E. V., Henzel, W. J., Wong, S. C., Stults, J. T., Ankoudinova, I., Hurley, J. B. (1995): Cloning, sequencing, and expression of a 24-kDa Ca^{2+} -binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **270**, 25200-25206
- Frins, S., Bönigk, W., Müller, F., Kellner, R., Koch, K.-W. (1996): Functional characterization of a guanylyl cyclase-activating protein from vertebrate rods. Cloning, heterologous expression, and localization. *J. Biol. Chem.* **271**, 8022-8027

- Gorczyca, W. A., Gray-Keller, M. P., Detwiler, P. B., Palczewski, K. (1994): Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating proteins from retinal rods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4014-4018
- Gorczyca, W. A., Polans, A. S., Surgucheva, I. G., Subbaraya, I., Baehr, W., Palczewski, K. (1995): Guanylyl cyclase activating protein. A calcium-sensitive regulator of phototransduction. *J. Biol. Chem.* **270**, 22029-22036
- Haeseleer, F., Sokal, I., Li, N., Pettinati, M., Rao, N., Bronson, D., Wechter, R., Baehr, W., Palczewski, K. (1999): Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily. *J. Biol. Chem.* **274**, 6526-6535
- Hwang, J.-Y. und Koch, K.-W. (2002): Calcium- and myristoyl-dependent properties of guanylate cyclase-activating protein-1 and -2. *Biochem.* **41**, 13021-13028
- Hwang, J.-Y., Schlesinger, R., Koch, K.-W. (2004): Irregular dimerization of guanylate cyclase-activating protein 1 mutants causes loss of target activation. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3785-3793
- Imanishi, Y., Li, N., Sokal, I., Sowa, M. E., Lichtarge, O., Wensel, T. G., Saperstein, D. A., Baehr, W., Palczewski, K. (2002): Characterization of retinal guanylate cyclase-activating protein 3 (GCAP3) from zebrafish to man. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 63-78
- Imanishi, Y., Yang, L., Sokal, I., Filipek, S., Palczewski, K., Baehr, W. (2004): Diversity of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in teleost fish: characterization of three novel GCAPs (GCAP4, GCAP5, GCAP7) from zebrafish (*Danio rerio*) and prediction of eight GCAPs (GCAP1-8) in pufferfish (*Fugu rubripes*). *J. Mol. Evol.* **59**, 204-217
- Koch, K.-W. (2006): GCAPs, the classical neuronal calcium sensors in the retina. *Calcium Binding Proteins* **1**, 3-6
- Li, N., Fariss, R. N., Zhang, K., Otto-Bruc, A., Haeseleer, F., Bronson, D., Qin, N., Yamazaki, A., Subbaraya, I., Milam, A. H., Palczewski, K., Baehr, W. (1998):

- Guanylate-cyclase-inhibitory protein is a frog retinal Ca^{2+} -binding protein related to mammalian guanylate-cyclase-activating proteins. *Eur. J. Biochem.* **252**, 591-599
- Olshevskaya, E. V., Hughes, R. E., Hurley, J. B., Dizhoor, A. M. (1997): Calcium binding, but not a calcium-myristoyl switch. Controls the ability of guanylyl cyclase-activating protein GCAP-2 to regulate photoreceptor guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **272**, 14327-14333
- Olshevskaya, E. V., Ermilov, A. N., Dizhoor, A. M. (1999): Dimerization of guanylyl cyclase-activating protein and a mechanism of photoreceptor guanylyl cyclase activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 25583-25587
- Palczewski, K., Subbaraya, I., Gorczyca, W. A., Helekar, B. S., Ruiz, C. C., Ohguro, H., Huang, J., Zhao, X., Crabb, J. W., Johnson, R. S., Walsh K. A., Gray-Keller, M. P., Detwiler, P. B., Baehr, W. (1994): Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein. *Neuron* **13**, 395-404
- Palczewski, K., Polans, A. S., Baehr, W., Ames, J. B. (2000): Ca^{2+} -binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *Bioessays* **22**, 337-350
- Palczewski, K., Sokal, I., Baehr, W. (2004): Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **322**, 1123-1130
- Peshenko, I. V., Olshevskaya, E. V., Dizhoor, A. M. (2004): Ca^{2+} -dependent conformational changes in guanylyl cyclase-activating protein 2 (GCAP-2) revealed by site-specific phosphorylation and partial proteolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 50342-50349
- Rudnicka-Nawrot, M., Surgucheva, I., Hulmes, J. D., Haeseleer, F., Sokal, I., Crabb, J. W., Baehr, W., Palczewski, K. (1998): Changes in biological activity and folding of guanylate cyclase-activating protein 1 as a function of calcium. *Biochem.* **37**, 248- 257

- Sokal, I., Li, N., Klug, C. S., Filipek, S. B., Hubbell, W. L., Baehr, W., Palczewski, K. (2001): Calcium-sensitive regions of GCAP1 as observed by chemical modifications. *J. Biol. Chem.* **276**, 43361-43373
- Stephen, R., Palczewski, K., Sousa, M. C. (2006): The crystal structure of GCAP3 suggests molecular mechanism of GCAP-linked cone dystrophies. *J. Mol. Bio.* **359**, 266-275
- Subbaraya, I, Ruiz, C. C., Helekar, B. S., Zhao, X., Gorczyca, W. A., Pettenati, M. J., Rao, N., Palczewski, K., Baehr, W. (1994): Molecular characterization of human and mouse photoreceptor guanylate cyclase-activating protein (GCAP) and chromosomal localization of the human gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 31080-31089

Anhang

A.1 Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Tabelle A.1: Ein- und Dreibuchstabencode der 20 proteinogenen Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

A.2 Nukleotid-Sequenzen von zGCAP4wt und zGCAP4A⁶S

```

1  ATGGGTAACA ACCATGCCAG TCTGGATGAC ATCCTCGCGG AGGACATGCA CCAGTGGTAT
   TACCCATTGA TGGTACGGTC AGACCTACTG TAGGAGCGCC TCCTGTACGT GGTCACCATA

61  AACAAATTCA TGAGAGAGTC TCCGTCAGGC CTCATCACTC TCTTTGAGCT CAAGTCTATT
   TTGTTTAAGT ACTCTCTCAG AGGCAGTCCG GAGTAGTGAG AGAAACTCGA GTTCAGATAA

121 CTGGGGCTGC AGGGAATGAA TGAGGACGCC AACAGTTACG TGGATCAGGT GTTCTGCACT
   GACCCCGACG TCCCTTACTT ACTCCTGCGG TTGTCAATGC ACCTAGTCCA CAAGACGTGA

181 TTCGACATGG ACAGGGATGG ATATATCGAC TTTGTGGAGT ACATCGCTGC TATTAGCTTA
   AAGCTGTACC TGTCCTTACC TATATAGCTG AAACACCTCA TGTAGCGACG ATAATCGAAT

241 ATGCTCAAGG GAGAAATCAA CCAGAAACTC AAGTGGTACT TCAAACTTTT TGACCAGGAT
   TACGAGTTCC CTCTTTAGTT GGTCTTTGAG TTCACCATGA AGTTTGAAAA ACTGGTCCTA

301 GGAAACGGGA AGATTGACAA GGACGAATTG GAAACAATAT TTACAGCTAT ACAAGACATC
   CCTTTGCCCT TCTAACTGTT CCTGCTTAAC CTTTGTTATA AATGTCGATA TGTTCTGTAG

361 ACAAGAAATC GTGACATTGT GCCAGAGGAA ATAGTGGCCC TTATATTTGA AAAGATTGAT
   TCTTCTTTAG CTCTGTAAACA CGGTGTCCTT TATCACCGGG AATATAAACT TTTCTAACTA

421 GTTAACGGAG AGGGTGAAC TACACTGGAA GAGTTCATCG AAGGAGCTAA AGAACATCCC
   CAATTGCCTC TCCCACCTGA CTGTGACCTT CTCAAGTAGC TTCTCGATT TCTTGTAGGG

481 GAAATTATGG ATATGCTGAA GATATTGATG GACCTCACTC CAGTCCTATT AATAATTGTC
   CTTTAATACC TATACGACTT CTATAACTAC CTGGAGTGAG GTCAGGATAA TTATTAACAG

541 GAAGGGCGAC AGAAATAA
   CAACCCGCTG TCTTTATT

```

Abbildung A.1: mRNA-Sequenz von zGCAP4wt

```

1  ATGGGTAACA ACCATGCCAG TCTGGATGAC ATCCTCGCGG AGGACATGCA CCAGTGGTAT
   TACCCATTGA TGGTACGGTC AGACCTACTG TAGGAGCGCC TCCTGTACGT GGTCACCATA

61  AACAAATTCA TGAGAGAGTC TCCGTCAGGC CTCATCACTC TCTTTGAGCT CAAGTCTATT
   TTGTTTAAGT ACTCTCTCAG AGGCAGTCCG GAGTAGTGAG AGAAACTCGA GTTCAGATAA

121 CTGGGGCTGC AGGGAATGAA TGAGGACGCC AACAGTTACG TGGATCAGGT GTTCTGCACT
   GACCCCGACG TCCCTTACTT ACTCCTGCGG TTGTCAATGC ACCTAGTCCA CAAGACGTGA

181 TTCGACATGG ACAGGGATGG ATATATCGAC TTTGTGGAGT ACATCGCTGC TATTAGCTTA
   AAGCTGTACC TGTCCTTACC TATATAGCTG AAACACCTCA TGTAGCGACG ATAATCGAAT

241 ATGCTCAAGG GAGAAATCAA CCAGAAACTC AAGTGGTACT TCAAACTTTT TGACCAGGAT
   TACGAGTTCC CTCTTTAGTT GGTCTTTGAG TTCACCATGA AGTTTGAAAA ACTGGTCCTA

301 GGAAACGGGA AGATTGACAA GGACGAATTG GAAACAATAT TTACAGCTAT ACAAGACATC
   CCTTTGCCCT TCTAACTGTT CCTGCTTAAC CTTTGTTATA AATGTCGATA TGTTCTGTAG

361 ACAAGAAATC GTGACATTGT GCCAGAGGAA ATAGTGGCCC TTATATTTGA AAAGATTGAT
   TCTTCTTTAG CTCTGTAAACA CGGTGTCCTT TATCACCGGG AATATAAACT TTTCTAACTA

421 GTTAACGGAG AGGGTGAAC TACACTGGAA GAGTTCATCG AAGGAGCTAA AGAACATCCC
   CAATTGCCTC TCCCACCTGA CTGTGACCTT CTCAAGTAGC TTCTCGATT TCTTGTAGGG

481 GAAATTATGG ATATGCTGAA GATATTGATG GACCTCACTC CAGTCCTATT AATAATTGTC
   CTTTAATACC TATACGACTT CTATAACTAC CTGGAGTGAG GTCAGGATAA TTATTAACAG

541 GAAGGGCGAC AGAAATAA
   CAACCCGCTG TCTTTATT

```

Abbildung A.2: mRNA-Sequenz von zGCAP4A⁶S. In rot die eingefügte Substitutionsmutation.

A.3 Verwendete Vektoren

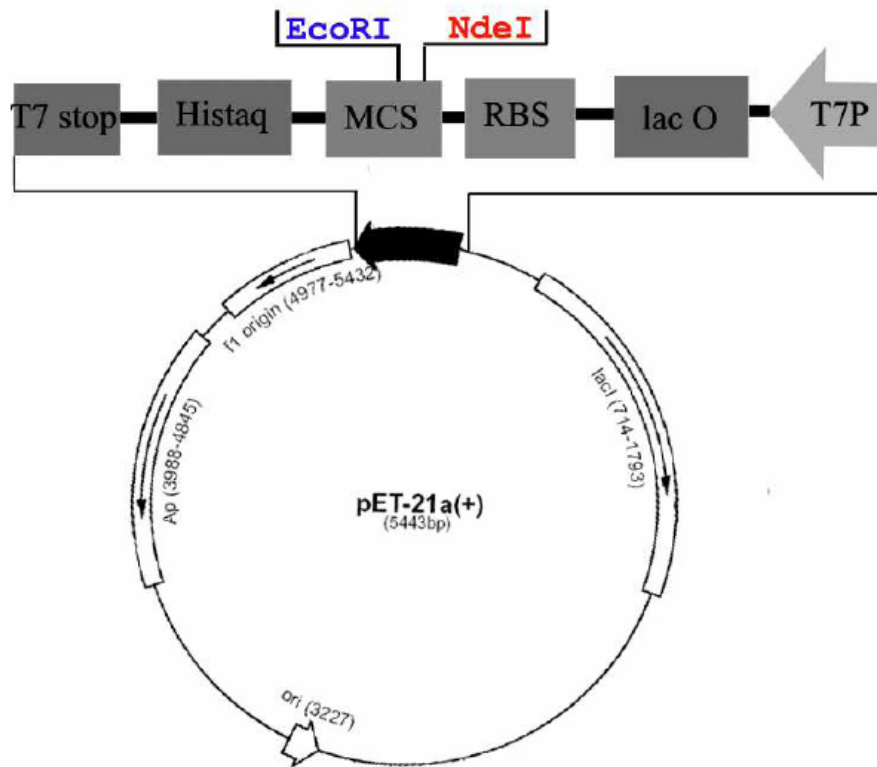


Abbildung A.3: Der pET21a(+)-Vektor für die heterologe Expression der verschiedenen GCAP-Varianten. Mit T7P = Promotor des Phagen T7, *lacO* 0 *lac*-Operon, RBS = Ribosomenbindungsstelle, MCS = Multiple Klonierungsstelle mit Rot: *NdeI*-Restriktionsstelle und Blau: *EcoRI*-Restriktionsstelle, Histaq = Sequenz für Histag und T7 stop = Stoppcodon des Phagen T7

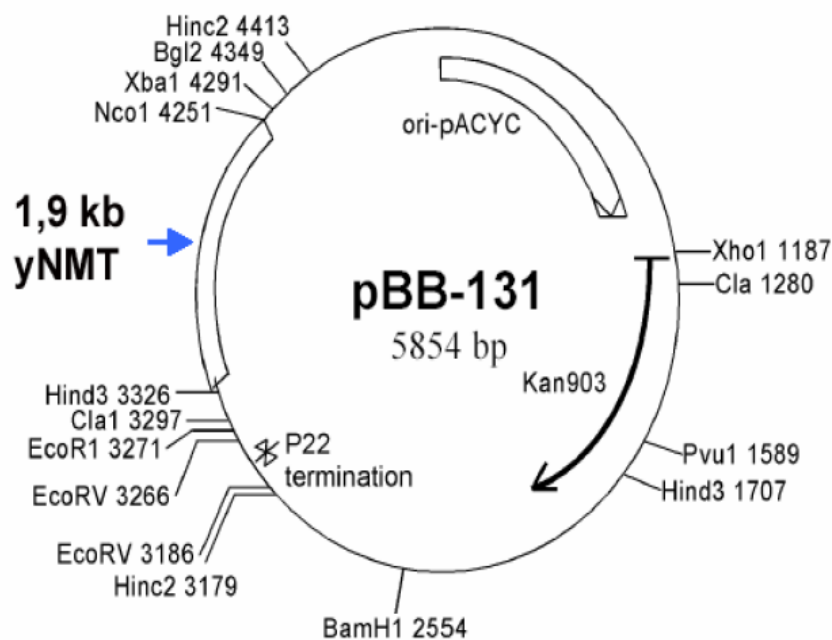


Abbildung A.4: Der pBB131-Vektor zur Koexpression der yNMT. Mit blauem Pfeil ist die Sequenz für die yNMT gekennzeichnet. Restriktionsstellen sind ebenfalls markiert.

A.4 SDS-PAGE

Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele sind Tabelle A.2 zu entnehmen.

Tabelle A.2: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE. Die Gele wurden mit den angegebenen Volumina der aufgeführten Substanzen erstellt. Angaben in μL .

Sammelgel	5 %		Trenngel	12 %	15 %
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	610		$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	1775	1475
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1000		1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1000	1000
Acrylamidfertiglösung (40%)	125		Acrylamidfertiglösung (40%)	1200	1500
10% APS (w/v)	1,2		10% APS (w/v)	2,5	2,5
TEMED	12		TEMED	21,5	21,5
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>1748,2</i>		<i>Gesamtvolumen</i>	<i>3999</i>	<i>3999</i>

Hinsichtlich des Molekulargewichtes der GCAPs konnten die SDS-Gele ausgewertet werden, indem zunächst die relativen Mobilitäten, also die R_f -Werte, der Proteine des Größenstandards des gleichen Gels bestimmt wurden:

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke der Proteine}}{\text{Laufstrecke des Farbmarkers}} \quad (2)$$

Trägt man die logarithmierten Molekulargewichte der Proteine des Größenstandards gegen deren R_f -Werte auf, erhält man eine Kalibriergerade, anhand derer man das apparente Molekulargewicht der GCAPs über deren R_f -Wert bestimmen kann.

Auf dem SDS-Gel zur Analyse der elektrophoretischen Mobilität (\rightarrow Abbildung 3.7) konnten damit die in Tabelle A.3 aufgeführten Werte festgestellt werden.

Aus Tabelle A.3 wurde Abbildung A.5 erstellt.

Tabelle A.3: Aus dem SDS-Gel zur elektrophoretischen Mobilität (→ Abbildung 3.7) bestimmte R_f -Werte der Größenstandardproteine. Neben der Angabe in kDa ist das Molekulargewicht MW auch logarithmiert angegeben.

MW (kDa)	logMW	R_f
250	2,40	0,06
150	2,18	0,10
100	2,00	0,16
75	1,88	0,22
50	1,70	0,32
37	1,57	0,43
25	1,40	0,60
20	1,30	0,76

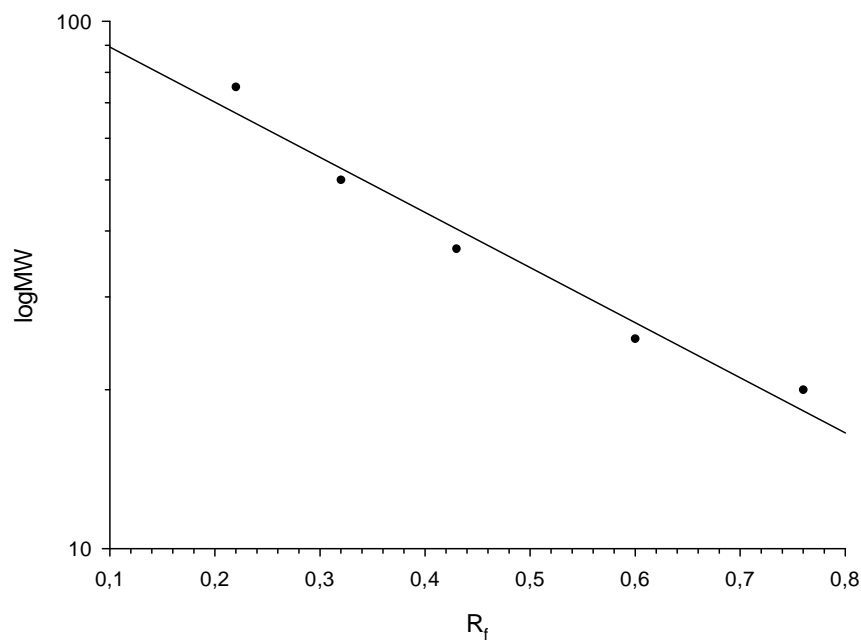


Abbildung A.5: SDS-PAGE-Kalibriergerade. Aufgetragen ist der Logarithmus der Molekulargewichte MW der Größenstandardproteine aus Tabelle A.3 gegen deren R_f -Wert (MW = 200, 150 und 100 wurden nicht berücksichtigt). Eingezeichnet ist eine Regressionsgerade.

A.5 Auswertung der analytischen SEC

Zur Berechnung der apparenten Molekulargewichte wurden Kalibriergeraden (unter calciumfreien und calciumhaltigen Bedingungen) verwendet, die mir freundlicherweise von Frau Petra Behnen zur Verfügung gestellt wurden. Dabei mussten zunächst die Elutionsvolumina der Proteine des Größenstandards mithilfe der Flussrate aus den Elutionszeiten bestimmt werden. Dann wurden mithilfe dieser Volumina die K_{av} -Werte nach folgender Formel bestimmt:

$$K_{av} = \frac{V_x - V_0}{V_t - V_0} \quad (3)$$

mit V_x = Elutionsvolumen des untersuchten Proteins in mL, V_0 = Elutionsvolumen des Blue-Dextrans in mL und V_t = Elutionsvolumen des Guanosins in mL

Trägt man die logarithmierten Molekulargewichte der Proteine des Größenstandards gegen deren K_{av} -Werte auf, erhält man Kalibriergeraden, anhand derer man das apparente Molekulargewicht der zGCAP4-Maxima aus den Chromatogrammen über deren K_{av} -Wert bestimmen kann.

Mit *calciumfreiem SEC-Puffer (2 mM EGTA)* wurden die in Tabelle A.4 aufgeführten Werte für die Proteine des Größenstandards gemessen.

Tabelle A.4: Gemessene und daraus errechnete Elutionswerte einer SEC (HPLC) der Größenstandardproteine unter EGTA-Bedingungen. Aus der Elutionszeit t wurde das Elutionsvolumen V mittels der Flussrate (0,35 mL/min) und daraus nach Gleichung (3) unter A.5 der K_{av} -Wert berechnet. Daneben ist auch das Molekulargewicht MW in kDa und logarithmiert angegeben.

Molekül	MW (kDa)	logMW	t	V	K_{av}
Blue-Dextran	2000	3,30	6,683	2,34	V_0
Guanosin	-		14,000	4,9	V_t
Aldolase	158	2,20	7,617	2,67	0,13
BSA	66	1,82	7,800	2,73	0,15
Ovalbumin	43	1,63	8,233	2,88	0,21
Carboanhydrase	30	1,48	9,050	3,17	0,32
Chymotrypsin	25	1,40	10,150	3,55	0,47
Ribonuclease A	13,7	1,14	10,267	3,59	0,49

Aus Tabelle A.4 wurde Abbildung A.6 erstellt.

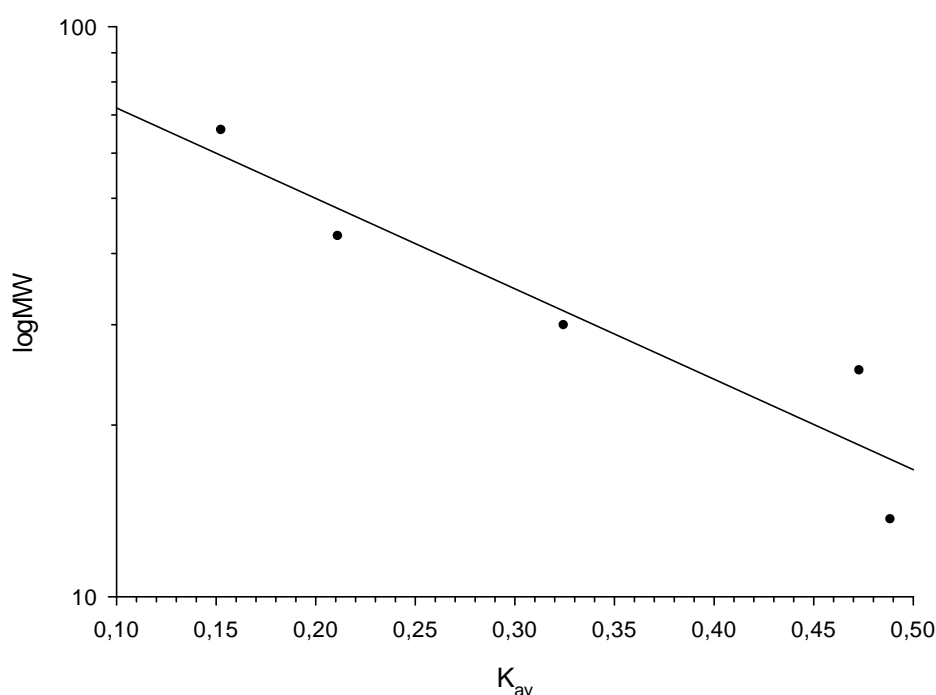


Abbildung A.6: SEC-Kalibriergerade unter calciumfreien Bedingungen (2 mM EGTA). Aufgetragen ist der Logarithmus der Molekulargewichte MW der Größenstandardproteine aus Tabelle A.4 gegen deren K_{av} -Wert (Aldolase wurde nicht berücksichtigt). Eingezeichnet ist eine Regressionsgerade.

Mit *calciumhaltigen SEC-Puffer* (2 mM CaCl_2) wurden die in Tabelle A.5 aufgeführten Werte für die Proteine des Größenstandards gemessen.

Tabelle A.5: Gemessene und daraus errechnete Elutionswerte einer SEC (HPLC) der Größenstandardproteine unter CaCl_2 -Bedingungen. Aus der Elutionszeit t wurde das Elutionsvolumen V mittels der Flussrate (0,35 mL/min) und daraus nach Gleichung (3) unter A.5 der K_{av} -Wert berechnet. Daneben ist auch das Molekulargewicht MW in kDa und logarithmiert angegeben.

Molekül	MW (kDa)	logMW	t	V	K_{av}
Blue-Dextran	2000	3,30	6,700	2,35	V_0
Guanosin	-		14,333	5,02	V_t
Aldolase	158	2,20	-	-	-
BSA	66	1,82	7,883	2,76	0,15
Ovalbumin	43	1,63	8,333	2,92	0,21
Carboanhydrase	30	1,48	9,283	3,25	0,34
Chymotrypsin	25	1,40	10,367	3,63	0,48
Ribonuclease A	13,7	1,14	10,350	3,62	0,48

Aus Tabelle A.5 wurde Abbildung A.7 erstellt.

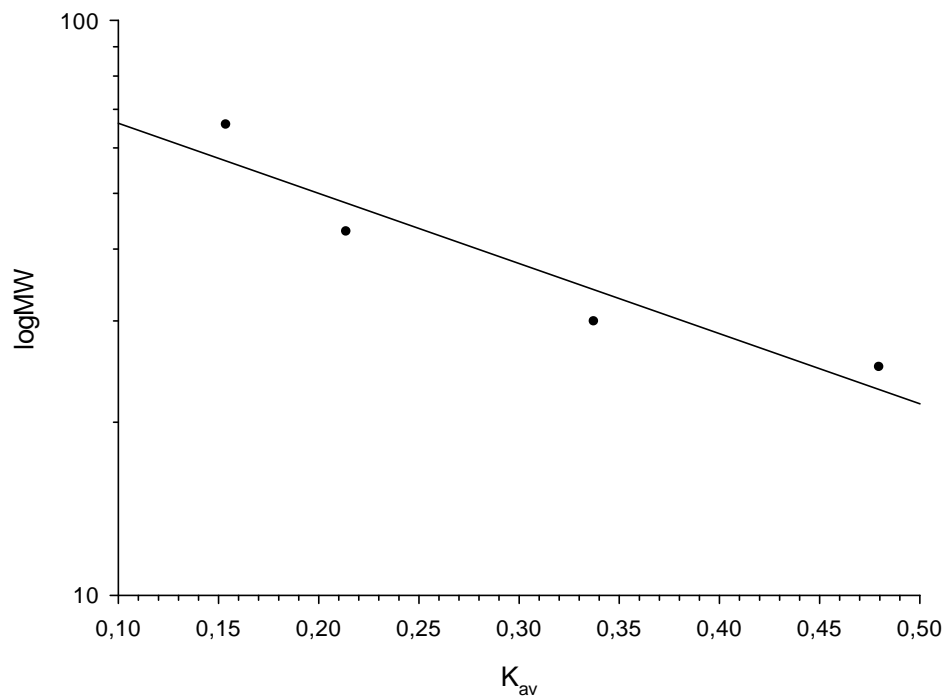


Abbildung A.7: SEC-Kalibriergerade unter calciumhaltigen Bedingungen (2 mM CaCl₂). Aufgetragen ist der Logarithmus der Molekulargewichte MW der Größenstandardproteine aus Tabelle A.5 gegen deren K_{av}-Wert (Aldolase und Ribonuclease A wurden nicht berücksichtigt). Eingezeichnet ist eine Regressionsgerade.