

**Über die Untereinheiten-Stöchiometrie  
des zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals  
aus Sehstäbchen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Nicole Yvonne Ficek**

aus Wuppertal

Köln 2003

Berichterstatter: Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp

Prof. Dr. Reinhard Sterner

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2002

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Strukturelle Merkmale von Ionenkanälen .....	1
1.2	Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle) .....	3
1.3	Die physiologische Bedeutung von CNG-Kanälen .....	6
1.4	Die Stöchiometrie von CNG-Kanälen .....	7
1.5	Physiologische Bedeutung der Stöchiometrie des CNG-Kanals aus Sebstäbchen..	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	10
2.1	Material.....	10
2.2	Quantifizierung von Proteinen.....	11
2.2.1	Konzentrationsbestimmung mit Amido-Schwarz .....	11
2.2.2	Spektrophotometrische Rhodopsinbestimmung.....	12
2.3	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese.....	12
2.3.1	Zweidimensionale (2D) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	13
2.4	Verwendete Protein-Größenstandards .....	13
2.4.1	Herkömmliche Größenstandards.....	13
2.4.2	Das Myosindimer als zusätzlicher Größenstandard .....	14
2.5	Molekulargewichtsbestimmung vernetzter und unvernetzter CNG-Kanaluntereinheiten.....	14
2.6	Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit der Coomassie-Blaufärbung .....	15
2.7	Nachweis spezifischer Proteine .....	15
2.7.1	Transfer und Immobilisierung von Proteinen („Westernblot“)... ..	15
2.7.2	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen .....	15
2.7.3	Antikörper für den immunologischen Nachweis .....	17
2.7.4	Entfernen der Antikörpermarkierungen („Stripping“) .....	18
2.8	Präparation der Stäbchenaußensegmente (ROS) .....	18
2.9	Präparation der Zellmembranen aus den Stäbchenaußensegmenten (ROS) durch hypotonisches Waschen .....	19
2.10	Reinigung des nativen CNG-Kanals aus ROS-Membranen durch Calmodulin- (CaM-) Affinitätschromatographie .....	19
2.10.1	Solubilisierung von Membranproteinen.....	19

---

2.10.2	Reinigung des solubilisierten CNG-Kanals .....	20
2.11	Reagenzien für die kovalente Vernetzung .....	21
2.11.1	Thiol-spezifisches Vernetzungsreagenz (BMDB) .....	21
2.11.2	Amino-spezifisches Vernetzungsreagenz (BS <sup>3</sup> ).....	22
2.12	Thiol-spezifische Modifizierung von ROS-Membranen .....	23
2.13	Kovalente Vernetzung der Untereinheiten des CNG-Kanals („cross-linking“) ....	24
2.13.1	Kovalente Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen .....	24
2.13.1.1	Thiol-spezifische Vernetzung Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals mit BMDB .....	24
2.13.1.2	Amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals mit BS <sup>3</sup> .....	25
2.13.2	Kovalente Vernetzung des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals .....	25
2.13.2.1	Thiol-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals mit BMDB .....	25
2.13.2.2	Amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals mit BS <sup>3</sup> .....	26
2.14	Spaltung BMDB-vernetzter CNG-Kanaluntereinheiten .....	26
2.15	Anreicherung des vernetzten, membranständigen CNG-Kanals über Ionenaustausch-Chromatographie .....	27
2.15.1	Ionenaustausch-Chromatographie .....	27
2.15.2	Gelfiltration des Eluats I .....	28
2.15.3	Konzentrieren des Eluats II über Centricons.....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
3.1	Molekulargewichtsbestimmung.....	31
3.2	Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen.....	34
3.2.1	Kovalente Vernetzung über die Thiolgruppen von Cysteinen .....	35
3.2.1.1	Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen .....	36
3.2.1.2	Die NEM-Behandlung von ROS-Membranen ermöglicht eine thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten .....	39
3.2.1.3	Die Stöchiometrie des membranständigen CNG-Kanals .....	41
3.2.1.4	Spezifität der Antikörpermarkierungen .....	44

---

3.2.1.5	Werden die Ergebnisse durch die Entfernung gebundener Antikörper („Stripping“) verfälscht? .....	46
3.2.1.6	Wie spezifisch ist die thiol-spezifische Vernetzung mit BMDB? .....	48
3.2.2	Kovalente Vernetzung über die Aminogruppen von Lysin.....	50
3.2.2.1	Amino-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen .....	51
3.3	Vernetzung des CNG-Kanals mit anderen Proteinen in ROS-Membranen.....	53
3.3.1	Vernetzung mit dem Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -K <sup>+</sup> -Austauscher.....	53
3.3.2	Vernetzung mit Peripherin-2 .....	56
3.4	Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten des gereinigten Kanals .....	58
3.4.1	Reinigung des nativen CNG-Kanals aus Stäbchenaußensegmenten (ROS) durch CaM-Affinitätschromatographie .....	58
3.4.2	Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten des solubilisierten und gereinigten Kanals .....	59
3.4.3	Amino-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten des solubilisierten und gereinigten Kanals .....	61
3.5	Analyse der Spaltprodukte von thiol-spezifisch vernetzten CNG-Kanaluntereinheiten (zweidimensionale SDS-PAGE).....	63
3.6	Anreicherung des vernetzten Kanals .....	67
3.7	Zusammenfassung .....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>70</b>
4.1	Voraussetzungen für eine kovalente Vernetzung .....	70
4.2	Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen .....	72
4.3	Der native CNG-Kanal aus Sehstäbchen besteht aus drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit.....	75
4.4	Vergleich mit anderen Studien .....	79
4.5	Sind CNG-Kanäle asymmetrische Proteinkomplexe?.....	83
4.6	Ausblick.....	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMDB	1,4-bismaleidyl-2,3-dihydroxybutan
8-Br-cGMP	8-Bromo-3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat
BS <sup>3</sup>	Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
°C	Temperatur in Grad Celsius
CaM	Calmodulin
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1propansulfat
CNGA	A-Untereinheit eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
CNCB	B-Untereinheit eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
CNG-Kanal	zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal ( <i>cyclic nucleotide-gated-channel</i> )
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
DEAE	Diethylaminoethan
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
g	Gramm, bzw. Normal-Fallbeschleunigung (9,81 ms <sup>-2</sup> )
GABA	γ-Aminobuttersäure (oder γ-Aminobutyrat)
GARP	Glutaminsäure-reiches Protein ( <i>Glutamic Acid Rich Protein</i> )
GIRK	G-Protein gekoppelter einwärtsrektifizierender K <sup>+</sup> -Kanal ( <i>G-protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels</i> )
h	Stunde(n)
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'(2-Ethansulfonsäure)
HERG	ERG-Kanal aus Mensch ( <i>human eag-related gene</i> )

---

kDa	Kilo-Dalton, relative Molmasse in Tausend
K <sup>+</sup> -Kanal	Kalium-Kanal
K <sub>ir</sub> -Kanal	einwärtsrektifizierender K <sup>+</sup> -Kanal vom K <sub>ir</sub> -Typ
l	Liter
log	Logarithmus
m	Meter
M	Mol x L <sup>-1</sup>
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mol	Mol
NaIO <sub>4</sub>	Natriumperjodat
NEM	N-Ethylmaleimid
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Ammoniumhydrogencarbonat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD	Extinktion bei der im Index angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
p.A.	pro analysi
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenefluorid
RDS	Retinal Degeneration Slow Protein
R <sub>r</sub> -Wert	relative Beweglichkeit
ROS	Sehstäbchenaußensegment ( <i>Rod Outer Segments</i> )
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S1-S6	Transmembranale Segmente 1-6
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure ( <i>trichloroacetic acid</i> )
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propandiol

---

ü.N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
w/v	Gewichtsprozent ( <i>weigh per volume</i> )

Es wurden die üblichen Abkürzungen des „Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

Alanin	A
Argingin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glyzin	G
Histidin	H
Isoleuzin	I
Leuzin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V



# 1 Einleitung

Ionenkanäle kontrollieren den Fluss von Ionen über die Zellmembran. Sie sind integrale Membranproteine, die wassergefüllte Poren in der Zellmembran ausbilden und so den Ionen ermöglichen, die hydrophobe Lipidschicht zu überqueren. Der Ionenfluss ist von entscheidender Bedeutung für die Entstehung und Weiterleitung elektrischer Signale in sensorischen Zellen, Muskelzellen und Nervenzellen.

Ionenkanäle können anhand ihrer Ionenselektivität unterschieden werden. Es gibt Ionenkanäle, die für Kationen spezifisch sind und andere, die nur Anionen leiten. In der Familie der Kationenkanäle kommen neben den sehr selektiven  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen auch die sogenannten „nicht-selektiven“ Kationenkanäle vor, die zwischen verschiedenen Kationen nur schlecht unterscheiden können. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal von Ionenkanälen ist ihr Aktivierungsmechanismus. Spannungsabhängige Ionenkanäle reagieren auf Änderungen des Membranpotentials. Ligandengesteuerte Ionenkanäle werden hingegen durch die Bindung von Liganden direkt kontrolliert. Einige dieser Liganden binden extrazellulär (z.B. Neurotransmitter), andere binden intrazellulär (z.B. zyklische Nukleotide).

## 1.1 Strukturelle Merkmale von Ionenkanälen

Ionenkanäle sind komplexe Proteine, die meist durch Zusammenlagerung mehrerer Untereinheiten gebildet werden. Setzen sich Ionenkanäle aus identischen Untereinheiten zusammen, so bezeichnet man sie als „Homooligomere“. „Heterooligomere“ hingegen bestehen aus verschiedenen Untereinheiten.

### *Spannungsabhängige Ionenkanäle*

Spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle ( $\text{K}_v$ -Kanäle) bilden oligomere Komplexe, die sich aus vier Untereinheiten zusammensetzen (MacKinnon, 1991; Liman et al., 1992). Jede Untereinheit hat sechs transmembranale Segmente (S1-S6) und eine porenbildende Region zwischen S5 und S6. Zu dieser Gruppe gehören z.B. die  $\text{K}^+$ -Kanäle vom *Shaker*-Typ, der ERG-Kanal aus Mensch (HERG) und der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanal (Übersicht: Shieh et al., 2000). Einige dieser spannungsabhängigen  $\text{K}_v$ -Kanäle sind mit einer zusätzlichen zytoplasmatischen Untereinheit („auxiliary  $\beta$ -subunit“) assoziiert, die die funktionellen Eigenschaften des Kanals moduliert (Übersicht: Shie et al., 2000; Deutsch, 2002). Zusätzlich zu dieser großen Gruppe der spannungsabhängigen  $\text{K}_v$ -Kanäle gibt es eine entfernt verwandte Gruppe, die als

einwärtsrektifizierende  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ir}$ -Kanäle) bezeichnet werden. Sie bilden ebenfalls tetramere Komplexe (Yang et al., 1995), bei denen jede homologe Untereinheit jedoch nur zwei transmembranale Segmente (S1 und S2) sowie eine Porenregion zwischen den beiden Segmenten besitzt (Ho et al., 1993; Kubo et al., 1993a und 1993b). Im Falle des ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanals verbinden sich vier porenbildende Untereinheiten mit vier peripheren Untereinheiten (Sulfonylurearezeptoren), so dass sich eine oktamere Anordnung ergibt. (Clement et al., 1997; Inagaki et al., 1997; Shyng & Nichols, 1997). Eine weitere Gruppe einwärtsrektifizierender  $K^+$ -Kanäle besteht aus Untereinheiten, die vier transmembranale Segmente (S1-S4) und zwei Porenregionen zwischen den Segmenten S1 und S2 sowie S3 und S4 aufweisen (Lesage et al., 1996). Vermutlich lagern sich zwei solcher Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal zusammen.

Die Familienmitglieder der spannungsabhängigen  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle weisen im Vergleich zu den  $K_v$ -Kanälen keine echte tetramere Struktur auf. Sie besitzen jeweils eine große Untereinheit mit vier internen Sequenzwiederholungen („repeats“), die auch als homologe Domänen bezeichnet werden (Übersicht: Noda et al., 1986; Tanabe et al., 1987; Catterall, 1991; Stühmer, 1991). Jede dieser homologen Domänen besitzt die Strukturelemente der Untereinheit eines spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanals, d.h. jede Domäne verfügt über sechs transmembranale Segmente (S1-S6), eine porenähnliche Schleife zwischen den Segmenten S5 und S6 und einem Spannungsfühler-Motiv im Segment S4 (Catterall, 1988; Numa, 1989; Catterall, 2000).

### *Ligandengesteuerte Ionenkanäle*

Auch ligandengesteuerte Ionenkanäle weisen eine oligomere Struktur auf. Der nikotinsche Acetylcholinrezeptor ist z.B. ein Pentamer, der sich aus vier verschiedenen, aber genetisch verwandten Untereinheiten zusammensetzt (Cooper et al., 1991; Devillers-Thiéry et al., 1993). Die ligandengesteuerten  $\gamma$ -Aminobuttersäure- ( $GABA_A$ )- und Glyzin-Rezeptoren sind ebenfalls Pentamere, die sich jedoch aus drei bzw. zwei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen ( $GABA_A$ -Rezeptor: Tretter et al., 1997; Baumann et al., 2001; Glyzin-Rezeptor: Langosch et al., 1988; Griffon et al., 1999). Alle Untereinheiten dieser Rezeptoren weisen jeweils vier transmembranale Segmente auf. Die Porenregion wird wahrscheinlich von hydrophilen Resten eines dieser Transmembransegmente gebildet. Eine Ausnahme bei den ligandengesteuerten Ionenkanälen stellen die Glutamat-Rezeptoren dar. Sie teilen die tetramere Struktur der spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanäle (Rosenmund et al., 1998), wobei ihre Untereinheiten nur drei transmembranale Segmente besitzen.

## 1.2 Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (CNG-Kanäle)

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte (CNG-) Kanäle sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, da ihr Öffnungszustand direkt und kooperativ durch die Bindung der intrazellulären Botenstoffe cGMP bzw. cAMP reguliert wird (Zufall et al., 1994; Kaupp, 1995; Kaupp & Seifert, 2002). Aufgrund gemeinsamer Strukturmerkmale gehören sie aber zu derselben genetischen Superfamilie wie die spannungsabhängigen Ionenkanäle (Jan & Jan, 1990; Guy et al., 1991; Goulding et al., 1992; Bönigk et al., 1993).

CNG-Kanäle wurden erstmals in sensorischen Zellen von Wirbeltieren identifiziert (Sehstäbchen: Fesenko et al., 1985; Sehzapfen: Haynes & Yau, 1985; Riechzellen: Nakamura & Gold, 1987). Viele CNG-Kanäle sind molekularbiologisch und elektrophysiologisch charakterisiert worden (Übersicht: Eismann et al., 1993; Kaupp, 1995; Finn et al., 1996, Zagotta & Siegelbaum, 1996; Kaupp & Seifert, 2002). Sie werden der Gruppe der nicht-selektiven Kationenkanäle zugeordnet, da sie zwischen verschiedenen monovalenten Kationen nur schlecht unterscheiden können (Frings et al., 1992; Torre & Menini, 1994; Haynes, 1995a). Divalente Kationen können ebenfalls permeieren. Sie blockieren dabei einen Teil des Stroms, der von den monovalenten Kationen getragen wird (Übersicht: Yau & Baylor, 1989; Sesti et al., 1994; Frings et al., 1995; Haynes, 1995b; Seifert et al., 1999; Dzeja et al., 1999).

Durch biochemische und molekularbiologische Studien wurden zwei unterschiedliche Typen von Untereinheiten (Unterfamilien) nachgewiesen, die als CNGA- und CNGB-Untereinheiten bezeichnet werden (Bradley et al., 2001). Beim Menschen gibt es insgesamt sechs verschiedene Gene, die für CNG-Kanäle kodieren. Vier davon kodieren für A-Untereinheiten (A1-A4) und zwei für B-Untereinheiten (B1 und B3).

Der CNG-Kanal in Sehstäbchen wird von der CNGA1-Untereinheit (Cook et al., 1987; Kaupp et al., 1989) und der CNGB1a-Untereinheit (Chen et al., 1994; Körschen et al., 1995) gebildet. In Sehzapfen sind weitere A- und B-Untereinheiten gefunden worden. Diese werden als CNGA3 (Bönigk et al., 1993; Weyand et al., 1994) und CNGB3 (Gerstner et al., 2000) bezeichnet. Der CNG-Kanal in Riechzellen besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten, die als CNGA2 (Dhallan et al., 1990; Ludwig et al., 1990), CNGA4 (Bradley et al., 1994; Liman & Buck, 1994) und CNGB1b (Sautter et al., 1998; Bönigk et al., 1999) bezeichnet werden.

Die folgende Abbildung zeigt die transmembranale Topologie und die strukturellen Merkmale der Untereinheiten der CNG-Kanäle aus Sehstäbchen (Abb. 1).

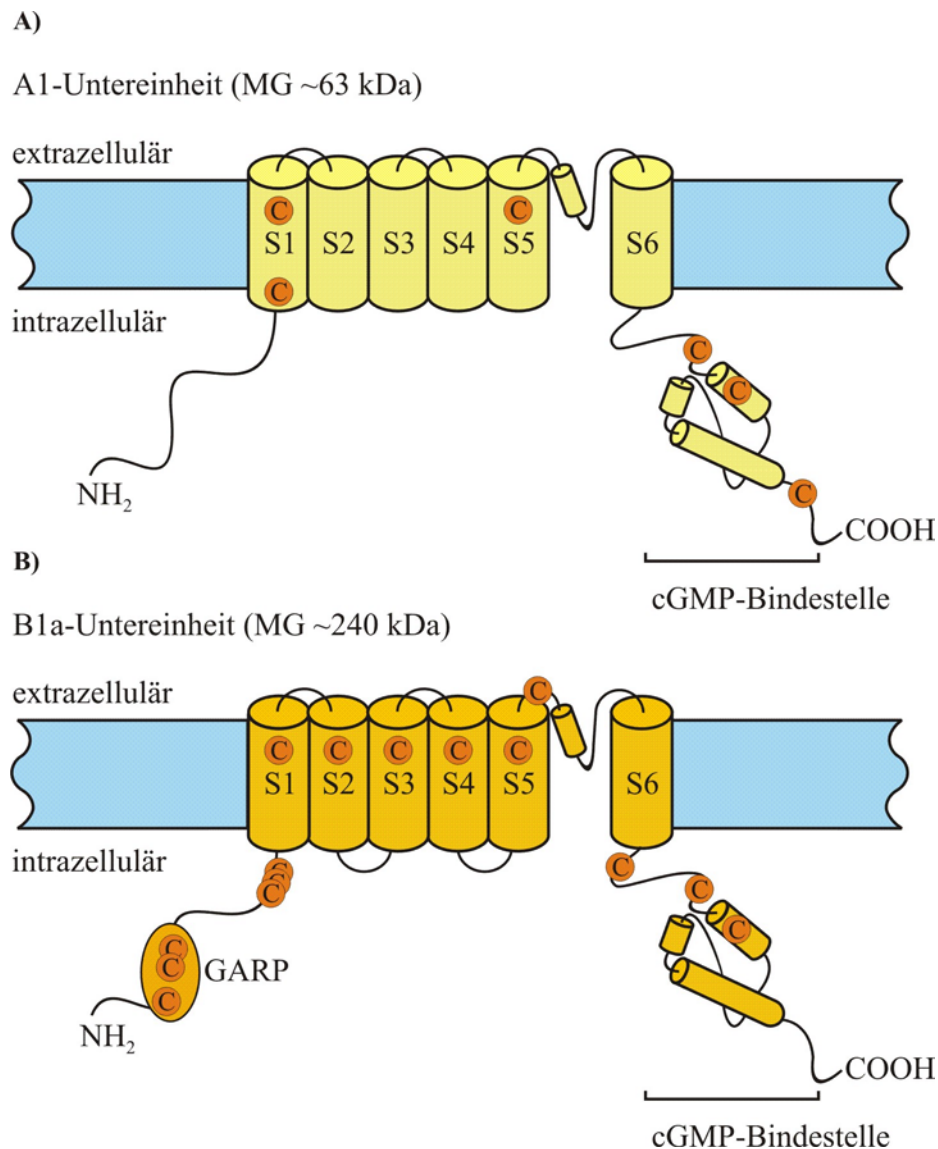


Abb. 1 **Modell der transmembranalen Topologie der A1-Untereinheit (A) und der B1a-Untereinheit (B) der CNG-Kanäle aus Sechstäbchen.** Die Beschreibung erfolgt im Text. Dargestellt sind die sechs transmembranalen Segmente S1-S6, die Porenregion zwischen S5 und S6 sowie die Bindestelle für zyklische Nukleotide. Die B1a-Untereinheit besitzt im N-terminalen Bereich einen Glutaminsäure-reichen Sequenzabschnitt (GARP). Das apparente Molekulargewicht ist 63 kDa für die A1-Untereinheit und 240 kDa für die B1a-Untereinheit. Die Primärsequenz der A1-Untereinheit weist 6, die der B1a-Untereinheit 15 Cysteine auf.

Ebenso wie die spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle der *Shaker*-Familie weist die A1-Untereinheit des CNG-Kanals (Abb. 1 A) sechs transmembranale Segmente auf, die als S1 - S6 bezeichnet werden (Henn et al., 1995). Zwischen dem fünften und sechsten Segment befindet sich ein Bereich, der homolog zur Porenregion (Pore) spannungsabhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle ist (Guy et al., 1991; Goulding et al., 1992; Heginbotham et al., 1992; Bönigk et al., 1993). Dieser Bereich ist auch in CNG-Kanälen an der Ausbildung der Pore beteiligt (Goulding et al., 1993; Root & MacKinnon, 1993; Eismann et al., 1994; Rho & Park, 1998). Ebenso wie in K<sup>+</sup>-Kanälen werden

auch die Permeationseigenschaften der CNG-Kanäle durch verschiedene Aminosäuren in den Segmenten S5 und S6 beeinflusst (Seifert et al., 1999). Im transmembranalen Segment S4 befindet sich ein Sequenzmotiv, das dem Spannungsfühler-Motiv der spannungsabhängigen Ionenkanäle ähnelt. Die funktionelle Bedeutung dieses Motivs in CNG-Kanälen ist aber unklar, da diese nur schwach spannungsabhängig sind. N- und C-Terminus liegen intrazellulär (Cook et al., 1989; Molday et al., 1991). Im C-Terminus der Kanäle befindet sich die Bindestelle für zyklische Nukleotide. Sie hat große Sequenzähnlichkeiten mit den Bindestellen für zyklische Nukleotide in cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase (Takio et al., 1984; Weber et al., 1987 und 1989; Kaupp et al., 1989; Kumar & Weber, 1992) und zum „catabolite activator protein“ (CAP) aus *E.coli* (Weber & Steitz, 1987). Die Bindung der zyklischen Nukleotide induziert eine Konformationsänderung innerhalb der Bindestelle (Matulef et al., 1999), die vermutlich auch auf andere Proteinbereiche übertragen wird und zum Öffnen der Kanäle führt (Goulding et al., 1994; Gordon & Zagotta, 1995a; Liu & Siegelbaum, 2000). Der genaue Mechanismus der Aktivierung ist jedoch unklar (Brown et al., 1998; Zheng & Zagotta, 2000). Wahrscheinlich spielt dabei der Bereich zwischen dem sechsten transmembranalen Segment und der cGMP-Bindestelle, die sogenannte „C-Linker-Region“, eine wichtige Rolle (Zong et al., 1998; Paoletti et al., 1999; Johnson & Zagotta, 2001).

Die B1a-Untereinheit des CNG-Kanals aus Sehstäbchen (Abb. 1 **B**) besitzt die gleiche transmembranale Topologie wie die A1-Untereinheit und verfügt ebenfalls über eine Bindestelle für zyklische Nukleotide sowie über eine porenbildende Region. Im Gegensatz zur A1-Untereinheit hat sie jedoch in ihrem N-terminalen Bereich einen Sequenzabschnitt (GARP-Teil), der im Wesentlichen mit einem löslichen Glutaminsäure-reichen Protein (GARP) aus der Rindernetzhaut identisch ist (Sugimoto et al., 1991; Colville & Molday, 1996; Grunwald et al., 1998). Die Funktion des GARP-Teils in der B1a-Untereinheit ist bislang unklar.

Bestimmt man das apparente Molekulargewicht (MG) der A1-Untereinheit im SDS-Polyacrylamidgel, so ergibt sich ein Wert von ca. 63 kDa (Cook et al., 1987; Kaupp et al., 1989). Dieser Wert liegt nahe bei dem von der Aminosäuresequenz errechneten Wert von 79 kDa, der durch eine post-translationale Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren 1 bis 92 auf einen Wert von ca. 63 kDa reduziert wird und damit der prozessierten A1-Untereinheit entspricht (Molday et al., 1991). Bei der B1a-Untereinheit ist das anders. Im Gel läuft diese Untereinheit bei ca. 240 kDa, während man aus der Aminosäuresequenz nur 155 kDa erwarten würde. Für diese Diskrepanz ist im Wesentlichen der GARP-Teil der B1a-Untereinheit verantwortlich. Die große Anzahl an Glutaminsäure- und Prolinresten führt zu einer hohen negativen Nettoladung

der B1a-Untereinheit. Somit wird eine geringere Menge des Detergenz SDS gebunden und die elektrophoretische Mobilität der B1a-Untereinheit im SDS-Polyacrylamidgel verringert sich (Chen et al., 1994; Körschen et al., 1995).

### **1.3 Die physiologische Bedeutung von CNG-Kanälen**

CNG-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Signalverarbeitung in den Sehzapfen und Sehzellen (Photorezeptoren) der Wirbeltierretina. Die Kanäle befinden sich in der Plasmamembran der Photorezeptoren und sind an der Umwandlung von Lichtreizen in elektrische Signale, der sogenannten Phototransduktion, beteiligt (Übersicht: Stryer, 1991; Yau, 1994; Müller & Kaupp, 1998). Während Sehzellen das Sehen bei schwachem Licht und Dunkelheit ermöglichen, werden Sehzapfen bei Tageslicht und für das Farbsehen benötigt. Neben ihrer Funktion in Photorezeptoren sind CNG-Kanäle auch an der Signalverarbeitung in olfaktorischen Neuronen des Riechepithels (Riechzellen) und an der Signalverarbeitung in Spermien beteiligt (Übersicht: Zufall et al., 1994; Schild & Restrepo, 1998; Weyand, 1996).

Die molekularen Vorgänge bei der Signaltransduktion sind sehr komplex. In den Sehzellen führt beispielsweise eine licht-induzierte Enzymkaskade zu einer Verringerung der cGMP-Konzentration im Außensegment der Zelle, woraufhin die CNG-Kanäle schließen. Dies resultiert in einem verminderten Einstrom von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und führt somit zu einer Hyperpolarisation des Sehzellenaußensegments, die passiv über das Innensegment zum synaptischen Endfuß weitergeleitet wird. Als Folge wird dort die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat vermindert und so die Aktivität nachgeschalteter Neuronen verändert. Die Erholungsphase nach der Belichtung und die Adaptation der Phototransduktionskaskade an unterschiedliche Lichtintensitäten sind ebenfalls komplexe Vorgänge (Übersicht: Kaupp & Koch, 1992; Palczewski & Saari, 1997; Müller & Kaupp, 1998; Burns & Baylor, 2001). Dabei wirken die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteine GCAP („guanylyl-cyclase-activating-protein“), Recoverin und Calmodulin als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren. Sie steuern über ihre Zielproteine die cGMP-Syntheserate, die Dauer der Lichtantwort und die Ligandenempfindlichkeit der CNG-Kanäle.

## 1.4 Die Stöchiometrie von CNG-Kanälen

Obwohl schon lange bekannt ist, dass CNG-Kanäle heterooligomere Komplexe sind, ist die Zusammensetzung der Untereinheiten und ihre Anordnung in nativen CNG-Kanälen bislang noch nicht aufgeklärt worden.

Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Untereinheiten-Stöchiometrie (im weiteren Verlauf der Arbeit nur mit „Stöchiometrie“ bezeichnet) von Proteinen aufzuklären. So kann beispielsweise die Röntgenstrukturanalyse oder auch die hochauflösende Elektronenmikroskopie mit anschließender Bildanalyse Hinweise auf die Untereinheitenzusammensetzung liefern. Die Stöchiometrie von Ionenkanälen kann man auch mit elektrophysiologischen Methoden untersuchen. Dazu werden häufig Ionenkanaluntereinheiten mit bestimmten - bzw. ohne Mutationen im heterologen Expressionssystem koexprimiert. Die funktionellen Eigenschaften der Ionenkanäle liefern Rückschlüsse auf die Untereinheitenzusammensetzung. Mit Hilfe dieser Methode konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die  $K_v$ -Kanäle vom *Shaker*-Typ tetramere Komplexe bilden (MacKinnon, 1991).

Die Stöchiometrie der CNG-Kanäle aus den Sebstäbchenaußensegmenten wurde bisher nur mit elektrophysiologischen Methoden an heterolog exprimierten Kanälen untersucht. Dazu wurden zunächst Konstrukte hergestellt, bei dem eine A- und eine B-Untereinheit auf ein und derselben Polypeptidkette lagen und durch einen Aminosäurelinker miteinander verbunden waren. Diese Tandemkonstrukte wurden in *Xenopus* Oocyten exprimiert und untersucht. Anhand verschiedener elektrophysiologischer Parameter sollte auf die Anordnung der Untereinheiten im CNG-Kanal geschlossen werden. Mehrere solcher Studien wurden durchgeführt, jedoch leider mit kontroversen Ergebnissen. Während Shammat & Gordon (1999) für die tetramere Struktur des CNG-Kanals aus Sebstäbchen eine benachbarte Anordnung der Untereinheiten (AABB) postulieren, fanden He et al. (2000) eine diagonale Anordnung der Untereinheiten (ABAB). Eine AAAB- bzw. BBBA-Anordnung der Untereinheiten kann mit der experimentellen Vorgehensweise in diesen beiden Studien allerdings nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

Eine weitere Methode, die Stöchiometrie von Ionenkanälen zu untersuchen, stellt die sogenannte „kovalente Vernetzung“ dar. Diese biochemische Methode hat den Vorteil, dass man als Ausgangsmaterial das native Protein verwenden kann. Bei der kovalenten Vernetzung werden reaktive Aminosäuren, die sich in enger Nachbarschaft befinden, über bifunktionelle Reagenzien miteinander vernetzt. Befinden sich diese beiden Aminosäuren auf verschiedenen Untereinheiten, so werden diese Untereinheiten kovalent miteinander verbunden. Auf diese

Weise können einige oder alle Untereinheiten eines Proteinkomplexes miteinander vernetzt werden. Mit Hilfe spezifischer Antikörper kann man dann die Zusammensetzung der Vernetzungsprodukte und ihr apparentes Molekulargewicht untersuchen. Durch kovalente Vernetzung von Untereinheiten konnte bereits die tetramere Stöchiometrie des spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanals vom *Shaker*-Typ (Schulteis et al., 1996) untermauert sowie die zweier einwärtsrektifizierender  $K^+$ -Kanäle (Corey et al., 1998; Raab-Graham & Vandenberg, 1998) und die des Glyzin-Rezeptors (Langosch et al., 1988) erfolgreich aufgeklärt werden. Darüber hinaus wurde die kovalente Vernetzung mit bifunktionellen Reagenzien auch in einer Vernetzungsstudie von Schwarzer et al. (2000) angewendet, in der die Vernetzung des CNG-Kanals mit einem weiteren Membranprotein, dem  $Na^+/Ca^{2+}$ - $K^+$ -Austauscher untersucht wurde.

Prinzipiell gibt es für die Zusammensetzung der Untereinheiten im CNG-Kanal aus Sehstäbchen, die im weiteren Verlauf der Arbeit als „A-Untereinheit“ und „B-Untereinheit“ bezeichnet werden, drei verschiedene Möglichkeiten (s. Abb. 2): 1) Drei A-Untereinheiten und eine B-Untereinheit (3A-1B) (Modell I); 2) Zwei A- und zwei B-Untereinheiten (2A-2B) (Modell II); 3) Eine A-Untereinheit und drei B-Untereinheiten (1A-3B) (nicht gezeigt). Die zuletzt genannte Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, da ein Dimer von zwei A-Untereinheiten in den Vernetzungsstudien von Vetter (1993) und Schwarzer et al. (2000) nachgewiesen wurde. In Abbildung 2 sind die beiden verbleibenden Stöchiometrie-Modelle gegenübergestellt, wobei Modell II nur die diagonale Anordnung gleicher Untereinheiten zeigt. Die benachbarte Anordnung gleicher Untereinheiten, die auch möglich wäre, ist in der Abbildung nicht gezeigt.



Abb. 2 **Stöchiometrie-Modelle I und II.** Die Untereinheitenzusammensetzung für Modell I lautet 3A-1B (links) und für Modell II 2A-2B (rechts).



## 1.5 Physiologische Bedeutung der Stöchiometrie des CNG-Kanals aus Sehstäbchen

Der CNG-Kanal aus Sehstäbchen ist ein Heterooligomer, der sich aus A- und B-Untereinheiten zusammensetzt. Während die A-Untereinheiten im heterologen Expressionssystem alleine funktionelle Kanäle bilden können (Kaupp et al., 1989), sind die B-Untereinheiten dazu nicht in der Lage (Chen et al., 1993; Körschen et al., 1995). Wird die B-Untereinheit aber mit der A-Untereinheit koexprimiert, so ändern sich die funktionellen Eigenschaften der Kanäle (Chen et al. 1993 und 1994; Körschen et al. 1995). Sie entsprechen dann weitgehend den Eigenschaften, die man auch von den nativen Kanälen kennt. So wird z.B. der native Sehstäbchenkanal durch l-cis-Diltiazem blockiert und durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM moduliert. Diese Eigenschaften sind auch zu beobachten, wenn man A- und B-Untereinheiten koexprimiert, nicht aber bei Expression von A-Homooligomeren. Die Heterooligomere haben zudem eine veränderte relative Permeabilität für divalente Kationen (Hackos & Korenbrot, 1999) sowie das für den nativen Sehstäbchenkanal typische „rapid flickery gating“ (Zimmerman & Baylor, 1986; Torre et al., 1992). Außerdem wird bei Koexpression der Untereinheiten die natürliche Sensitivität des Sehstäbchenkanals gegenüber dem zyklischen Nukleotid cAMP wiederhergestellt (Pagès et al., 2000).

Die Tatsache, dass sowohl A- als auch B-Untereinheiten den funktionellen CNG-Kanal in Sehstäbchen bilden, wird auch durch verschiedene Krankheitsbilder deutlich. Als Beispiel sei hier die Krankheit „Retinitis Pigmentosa“ genannt, die eine degenerative Veränderung der Netzhaut auslöst zur vollständigen Erblindung führt. Trudeau & Zagotta (2002) zeigten, dass eine Mutation in der Primärsequenz der A-Untereinheit, bei der unmittelbar hinter der Bindestelle für zyklische Nukleotide ein Stopkodon eingeführt wurde, der größte Teil des C-Terminus nicht exprimiert wurde. Bei Koexpression der mutierten A- und der intakten B-Untereinheit in *Xenopus* Oocyten wurden keine Kanäle an der Zelloberfläche beobachtet. Dies konnte auf eine fehlende Wechselwirkung zwischen den beiden Untereinheiten zurückgeführt werden, die eine Zusammenlagerung der Untereinheiten zu einem heterooligomeren Kanal und damit auch den Transport zur Zelloberfläche verhindert.

Da jede Untereinheit nachweislich einen wichtig Beitrag für die Funktion des CNG-Kanals in Sehstäbchen leistet, besteht ein großes Interesse, die Untereinheitenzusammensetzung dieses Kanals zu erforschen. Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Stöchiometrie des nativen CNG-Kanals aus den Stäbchenaußensegmenten von Rindernetzhäuten aufzuklären.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Pierce (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Es wurden die Proteaseinhibitoren E-64 und Aprotinin von Serva (Heidelberg) sowie Leupeptin von Sigma (Deisenhofen) verwendet. Das Modifizierungsreagenz N-Ethylmaleimid (NEM) wurde von Sigma (Deisenhofen) geliefert. Die Vernetzungsreagenzien 1,4-Bismaleimidyl-2,3-dihydroxybutan (BMDB) und Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) wurden von der Firma Pierce (Rockford, USA) bezogen. Für den Transfer von Proteinen infolge der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden PVDF-Membranen (Immobilon P) der Firma Millipore (Eschborn) verwendet. Sekundäre Antikörper und Reagenzien für den immunologischen Nachweis wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Für den Chemilumineszenz-Nachweis wurde der „ECL Westernblot Detection Kit“ und die ECL Hyperfilme ebenfalls von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet.

Proteaseinhibitoren wurden dem Lysepuffer bei der Präparation der Zellmembranen aus Stäbchenaußensegmenten (2.9) sowie den Pufferlösungen bei der thiol-spezifischen Modifizierung (2.12) und kovalenten Vernetzung (2.13.1.1; 2.13.1.2) in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt (Tab. 1):

Tab. 1 **Auflistung der verwendeten Proteaseinhibitoren.** Konzentration der Stocklösungen und eingesetzte Endkonzentration der Proteaseinhibitoren.

Proteaseinhibitor	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
E-64	5 mg/ml	2,15 µg/ml
Aprotinin	5 mg/ml	5 µg/ml
Leupeptin	4 mg/ml	5 µg/ml

## 2.2 Quantifizierung von Proteinen

### 2.2.1 Konzentrationsbestimmung mit Amido-Schwarz

Die Proteinkonzentration von Proteinlösungen, die Detergenzien oder Lipide enthielten, wurde mit der Amido-Schwarz-Methode bestimmt (Kaplan & Pedersen, 1985). Dabei wurde der Amido-Schwarz Farbstoff 10 B von Merck (Darmstadt) verwendet. Als Proteinstandard wurde BSA eingesetzt (Sigma, Deisenhofen). Die Proben und die Standards (1 - 15 µg Protein) wurden in einem Endvolumen von 200 µl mit A. bidest aufgenommen und nacheinander mit folgenden Lösungen versetzt:

Lösung 1: 20 µl 10 % SDS

Lösung 2: 30 µl 1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 % SDS

Lösung 3: 60 µl 104 % TCA (TCA-Fällung)

Die Fällung mit TCA wurde 5 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurde ein Membranfilter (Porendurchmesser: 45 µm; Millipore, Eschborn) mit 3 ml 6 %iger TCA-Lösung auf einer Vakuumfilteranlage (Millipore, Eschborn) gewaschen. Nachdem die Proben punktuell auf den Filter aufgetragen worden waren, wurde der Membranfilter nochmals mit 3 ml 6 %iger TCA-Lösung gewaschen. Anschließend wurde er 10 min mit Amido-Schwarz-Färbelösung gefärbt. Danach wurde der Filter kurz mit A. bidest gespült und 3 x 1 min in Entfärbelösung gelegt bis der Hintergrund auf dem Filter wieder weiß war. Aus dem getrockneten Filter wurden die gefärbten Filterbereiche (Protein) ausgeschnitten und 20 min unter Schütteln bei Raumtemperatur in je 1 ml Lösungsmittel inkubiert. Das gefärbte Lösungsmittel wurde in Plastikküvetten überführt und die Absorption bei  $\lambda = 630$  nm gegen eine Nullprobe gemessen.

#### Färbelösung:

0,5 % Amido-Schwarz 10 B

45 % Methanol

10 % Essigsäure      50 µM EDTA

#### Entfärbelösung:

90 % Methanol

2 % Essigsäure

#### Lösungsmittel:

50 % Ethanol

25 mM NaOH

#### BSA-Stocklösung:

400 µg Rinderserum-Albumin (BSA)/ml in A. bidest

### 2.2.2 Spektrophotometrische Rhodopsinbestimmung

Die Rhodopsinkonzentration der präparierten Stäbchenaußensegmente (Rod Outer Segments, ROS) (2.8) wurde spektrophotometrisch ermittelt. Dabei wurde die Absorptionsdifferenz zwischen unbelichteten und belichteten solubilisierten ROS berechnet.

In einer Dreifachbestimmung wurden je 50 µl Proteinsuspension in 950 µl 2 % (w/v) Emulphogen BC in A. bidest gelöst und die Absorption bei  $\lambda = 500$  nm gemessen. Daraufhin wurde die Probe 10 min mit Gelblicht (Lampe: Schott KL 150; Filter: Orange OG 570) bestrahlt (Bleichen des Rhodopsins) und erneut die Absorption bei  $\lambda = 500$  nm gemessen. Die Rhodopsinkonzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{mg Rhodopsin / ml} = (\text{OD}^{500}_{\text{unbelichtet}} - \text{OD}^{500}_{\text{belichtet}}) \cdot f$$

Der Faktor f ergibt sich aus dem Volumenverhältnis von Probe zu Emulphogenlösung.

## 2.3 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in Modifikation nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde in einer Minigel-Twin-Kammer (Biometra; Gelmaße: 0,1 x 8 x 10 cm) durchgeführt. Es wurden 3,5-7,5 %ige Trenngele und 3 %ige Sammelgele verwendet. Damit sich der Gradient während des Gießvorgangs gleichmäßig setzen konnte, wurden der Lösung für das 7,5 %ige Trenngel 15 % (w/v) Sucrose beigemischt.

Für den Gellauf wurden die Proben mit 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 15-20 mA/Gel ca. 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden im Anschluss an die SDS-PAGE entweder mit Coomassie Blau (2.6) gefärbt oder auf PVDF-Membranen (2.7.1) transferiert.

#### 3 x SDS-Probenpuffer:

4,8 % SDS

150 mM Tris-HCl, pH 7,5

37,5 % Glycerin

3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

0,001 % Bromphenolblau

#### SDS-Laufpuffer:

25 mM Tris

0,1 % SDS

192 mM Glyzin

### 2.3.1 Zweidimensionale (2D) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Vernetzungsprodukte, die im Polyacrylamidgel wieder gespalten worden waren (2.14), wurden auf 1,5 mm starken 3,5 -7,5 %igen Trenngelen in der zweiten Dimension einer SDS-PAGE analysiert. Dazu wurde die Gelspur mit den gespaltenen Vernetzungsprodukten horizontal auf das 3 %ige Sammelgel eines neuen Polyacrylamidgels gelegt. Neben der Gelspur wurde ein Abstandhalter eingeschoben, der die Probentasche für einen Marker ausbildete. Gelspur und Abstandhalter wurden dann mit flüssiger 1 %iger (w/v) Agarose in Elektrodenlaufpuffer fixiert. Die gespaltenen Vernetzungsprodukte wurden bei 25 mA/Gel ca. 90 min elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membranen (2.7.1) transferiert.

## 2.4 Verwendete Protein-Größenstandards

### 2.4.1 Herkömmliche Größenstandards

Um das apparente Molekulargewicht von Proteinen, die in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, zu bestimmen, dienten die Proteine des „High Molecular Weight Calibration Kit“ (HMW-Größenstandard) von Pharmacia als Größenstandards.

Als optische Hilfe zum Ausschneiden einer Gelspur für die 2D SDS-PAGE wurde außerdem der „Pre-Stained Protein Standard“ „SeeBlue Plus2“ von Invitrogen (Leek, Niederlande) verwendet.

Tab. 2 **Protein-Größenstandards für die SDS-PAGE.** Molekulargewicht der Markerproteine des HMW- und Pre-Stained-Größenstandards.

HMW-Größenstandard		PRE-STAINED Größenstandard	
MG (kDa)	Protein	MG (kDa)	Protein
212	Myosin	212	Myosin
170	$\alpha_2$ -Makroglobulin	148	Phosphorylase B
116	$\beta$ -Galaktosidase	98	BSA
76	Transferrin	64	Alkohol-Dehydrogenase
53	Glutamat-Dehydrogenase	50	Glutamat-Dehydrogenase
-	-	36	Carboanhydrase
-	-	22	Myoglobin Rot
-	-	16	Lysozym
-	-	6	Aprotinin
-	-	4	Insulin, B Kette

MG: Molekulargewicht

## 2.4.2 Das Myosindimer als zusätzlicher Größenstandard

Zur Bestimmung apparenter Molekulargewichte, die größer als 212 kDa waren, habe ich natives Myosin aus dem Kaninchenmuskel (Sigma) in Anlehnung an die Vorschrift von Hu et al. (1989) vernetzt. Das Myosin wurde mit dem thiol-spezifischen Vernetzungsreagenz Paraphenylenbismaleimid (p-PDM) bei einer Konzentration von 0,85 mg/ml in EDTA-Na-Hepes (pH 7,4) vernetzt. Aliquots wurden nach 1, 5, 15, 30 und 45 min entnommen und die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ M DTT gestoppt. Nach Zugabe des SDS-Probenpuffers wurden die Proben in einem 3,5-7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.3).

## 2.5 Molekulargewichtsbestimmung vernetzter und unvernetzter CNG-Kanaluntereinheiten

Für die Molekulargewichtsbestimmung vernetzter und unvernetzter CNG-Kanaluntereinheiten wurden die immunologisch nachgewiesenen Proteinbanden verwendet (2.7.2).

Bei dem immunologischen Nachweis von immobilisierten Proteinen wurden die Blotstreifen mit den Markerproteinen nach dem Westernblot abgeschnitten und mit Amido-Schwarz gefärbt. Als Markerproteine dienten der HMW-Größenstandard (2.4.1) und das Myosindimer (2.4.2). Anhand dieser gefärbten Markerstreifen konnten die Laufstrecken ( $l$ ) der Markerproteinbanden sowie die Gesamtlaufstrecke ( $l_0$ ) des Trenngels bestimmt werden. Daraus wurde die relative Beweglichkeit ( $R_f$ ) jeder Markerproteinbande berechnet. Der  $R_f$ -Wert errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$R_f = \frac{l}{l_0} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Trägt man nun den Logarithmus des Molekulargewichts der Markerproteine gegen ihre nach Gleichung 1 errechneten  $R_f$ -Werte auf, so entsteht eine Kalibrierkurve. Die Geradengleichung der linearen Regression lautet:

$$y = m \cdot R_{f(\text{Protein})} + b$$

$m$  = Steigung

$b$  = y-Achsenabschnitt

$R_{f(\text{Protein})}$  =  $R_f$ -Wert der unbekanntenen Proteinbande

Aus den abgelesenen Laufstrecken der unbekanntenen Proteinbanden konnten die  $R_f$ -Werte berechnet und über die Geradengleichung das Molekulargewicht ermittelt werden.

## 2.6 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit der Coomassie-Blaufärbung

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden in Anlehnung an Meyer und Lamberts (1965) gefärbt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R 250 von Serva (Heidelberg) verwendet. Die Gele wurden für 30 min in Färbelösung gelegt. Anschließend wurden sie bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärbelösung gelegt und auf „Whatman“-Papier im Geltdrockner getrocknet.

### Färbelösung:

0,2 % SERVA Blue R-250

30 % Ethanol (vergällt)

10 % Essigsäure

### Entfärbelösung:

30 % Ethanol (vergällt)

10 % Essigsäure

## 2.7 Nachweis spezifischer Proteine

### 2.7.1 Transfer und Immobilisierung von Proteinen („Westernblot“)

Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (2.3) und in Anlehnung an Towbin et al. (1979) auf PVDF-Membranen (Immobilon P; Millipore, Eschborn) transferiert. Der Transfer („Westernblot“) wurde in einem Milliblot-Graphit Elektroblot-System (Millipore, Eschborn) im Halbtrockenverfahren nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transferzeit betrug 45 min bei 2-5 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche.

### 2.7.2 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Die Blotstreifen mit den Proteinstandards wurden nach dem Westernblot abgeschnitten und mit Amido-Schwarz gefärbt. Auf der verbleibenden Blot-Membran wurden die immobilisierten Proteine in drei Schritten nachgewiesen. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindestellen mit einer Blockierlösung abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit einem primären Antikörper (1. Antikörper) inkubiert. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex wurde dann mit einem sekundären Antikörper (2. Antikörper), an den das Enzym Meerrettich-

Peroxidase (HRP) gekoppelt war, nachgewiesen. Die Inkubationsschritte erfolgten entweder 30 - 60 min bei RT oder über Nacht bei 4°C. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran gewaschen (je 3 x 10 min). Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter Schütteln. Die spezifischen Antigen- 1. Antikörper- 2. Antikörper-Komplexe wurden mit dem „ECL Westernblot Detection Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben sichtbar gemacht. Die Zusammensetzung der Inkubations- und Waschlösungen sowie der Ablauf der Arbeitsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 3 **Vorgehensweise bei der Antikörpermarkierung eines Westernblots.** Reihenfolge, Dauer und Inkubationstemperatur der Inkubations- und Waschschrte.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit (-temperatur)	Inkubationslösung
Blockierungsreaktion	30 min (RT) oder ü.N. (4°C)	Blockierlösung <sup>(1)</sup>
1. Antikörperinkubation	60 min (RT) oder ü.N. (4°C)	1. Antikörper-Inkubationslg. <sup>(2)</sup>
Waschen	3 x 10 min (RT)	Waschlösung I <sup>(3)</sup>
2. Antikörperinkubation	30 min (RT) oder ü.N. (4°C)	2. Antikörper-Inkubationslg. <sup>(4)</sup>
Waschen	3 x 10 min (RT)	Waschlösung I <sup>(3)</sup>
Waschen	45 min	Waschlösung II <sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup> PBS + 0,05 % Magermilchpulver

<sup>(2)</sup> 1. Antikörper in PBST + 0,01 % NaN<sub>3</sub>

<sup>(3)</sup> PBST

<sup>(4)</sup> 2. Antikörper in PBST

<sup>(5)</sup> PBS

PBS:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBST:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,05 % Tween-20



### 2.7.3 Antikörper für den immunologischen Nachweis

In Tabelle 4 sind die primären Antikörper zusammengefasst, die in den Experimenten für den immunologischen Nachweis der CNG-Kanaluntereinheiten, des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - $\text{K}^+$ -Austauschers und des Peripherin-2 eingesetzt wurden. Die Antikörper FPcK #39 und FPcK #21 wurden von Dr. D. Weitz, der Antikörper FPcK #52 von Dr. H.G. Körschen (beide Institut für Biologische Informationsverarbeitung I, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt. Die monoklonalen Antikörper UED 7D3 und PMe 2D9 wurden von Dr. E. Kremmer (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München) bzw. Dr. R.S. Molday (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver) zur Verfügung gestellt.

Abbildung 3 stellt die Lage der Bindeepitope für die in der Arbeit verwendeten primären A- und B- Antikörper schematisch dar. Die A-Untereinheit wurde mit den Antikörpern FPcK #39 und UED 7D3 nachgewiesen. Der Antikörper FPcK #39 erkennt eine Sequenz in der cGMP-Bindestelle, der Antikörper UED 7D3 eine Sequenz, die C-terminal der cGMP-Bindestelle liegt. Die B-Untereinheit wurde mit den Antikörpern FPcK #52 und FPcK #21 nachgewiesen. Der Antikörper FPcK #52 erkennt eine Sequenz innerhalb des GARP-Teils der B-Untereinheit. Der Antikörper FPcK #21 erkennt eine N-terminale Sequenz der B-Untereinheit, die vor dem GARP-Teil liegt.

Tab. 4 **Auflistung der für den immunologischen Nachweis verwendeten primären Antikörper.** Zielproteine/Bindeepitope, Art der Antikörper und eingesetzte Verdünnung.

Antikörper	Zielprotein/Bindeepitop	Art des Antikörpers	Verdünnung
FPcK #39	CNG-Kanal A-Untereinheit/ cGMP-Bindestelle	polyklonal	1:500
FPcK #21	CNG-Kanal B-Untereinheit/ N-Terminus vor dem GARP	polyklonal	1:500
mRDS	Peripherin-2/RDS	polyklonal	1:1500
FPcK #52	CNG-Kanal B-Untereinheit/ GARP-Teil	polyklonal	1:1500
UED 7D3	CNG-Kanal A-Untereinheit/ C-Terminus	monoklonal	1:2
PMe 2D9	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - $\text{K}^+$ -Austauscher/ extrazelluläre Domäne	monoklonal	1:20

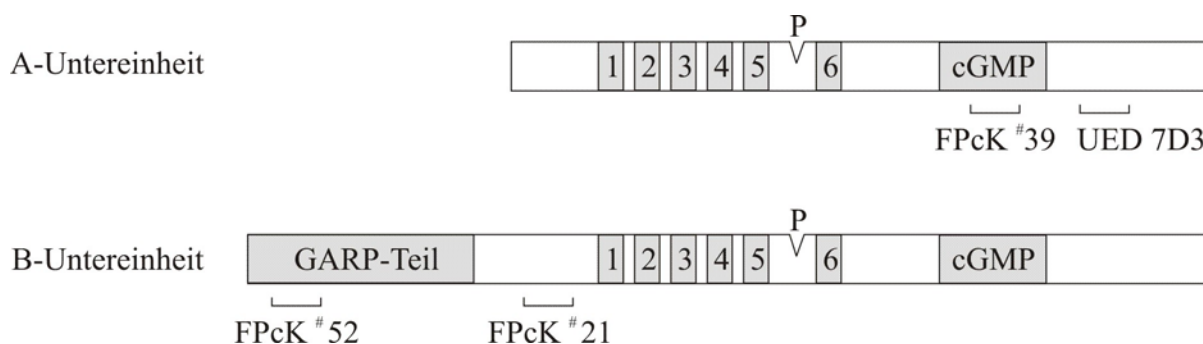


Abb. 3 **Bindepitope der A- und B-Antikörper.** Schematisch dargestellt sind die A- und B-Untereinheiten des CNG-Kanals aus dem Sehhäutchen und die Lage ihrer Bindepitope, die von den verwendeten A- und B-Antikörpern erkannt werden. Lage der Bindepitope für die A-Antikörper (oben): FPcK #39: in der cGMP-Bindestelle, UED 7D3: Sequenz C-terminal von der cGMP-Bindestelle. Lage der Bindepitope für die B-Antikörper (unten): FPcK #52: Sequenz im GARP-Teil der B-Untereinheit, FPcK #21: N-terminale Sequenz ohne GARP-Teil.

## 2.7.4 Entfernen der Antikörpermarkierungen („Stripping“)

Primäre und sekundäre Antikörper ließen sich durch Reduktion ihrer Disulfidbrücken mit  $\beta$ -Mercaptoethanol vollständig von der Blot-Membran entfernen, so dass dieselbe Blot-Membran nacheinander mit unterschiedlichen Antikörpern markiert werden konnte.

Für diesen Vorgang wurde die Blot-Membran 45 min bei 65°C in 20 ml Stripping Puffer in einem Wasserbad leicht geschüttelt. Um das  $\beta$ -Mercaptoethanol anschließend vollständig zu entfernen, wurde die Membran mehrfach mit PBS abgespült und zweimal 15 min mit PBS gewaschen.

### Stripping Puffer:

62 mM Tris-HCl, pH 6,8

2 % (w/v) SDS

2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

## 2.8 Präparation der Stäbchenaußensegmente (ROS)

Rinderaugen wurden vom Schlachthof Düsseldorf bezogen und lichtgeschützt transportiert. Die Präparation der Netzhäute sowie die nachfolgenden Experimente (2.9; 2.12; 2.13.1.1; 2.13.1.2) wurden bei schwachem Rotlicht durchgeführt, um ein Bleichen des Rhodopsins zu vermeiden.

Die Stäbchenaußensegmente (Rod Outer Segments, ROS) wurden aus den Rindernetzhäuten in Anlehnung an die Vorschrift von Schnetkamp und Daemen (1982) präpariert. Die Rhodopsinkonzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (2.2.2). Aliquots zu 5 bzw.

10 mg/ml Rhodopsin wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in 10 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 1 mM DTT und 0,1 mM PMSF aufbewahrt.

## **2.9 Präparation der Zellmembranen aus den Stäbchenaußensegmenten (ROS) durch hypotonisches Waschen**

Um lösliche Proteine und Zellmembranen der Stäbchenaußensegmente (ROS) voneinander zu trennen, wurden die Außensegmente durch hypotonisches Waschen mit Lysepuffer aufgeschlossen. Hierfür wurden präparierte ROS bei einer Konzentration von 0,25 - 0,5 mg Rhodopsin/ml in einem Volumen von 20 ml Lysepuffer in Anwesenheit von 2 mM DTT resuspendiert. Anschließend wurden die ROS-Membranen (im Folgenden als „Membranen“ bezeichnet) in einem TI 70-Rotor bei 100.000xg und  $4^{\circ}\text{C}$  25 Minuten pelletiert. Der Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die ROS-Membranen dienten als Ausgangsmaterial für die kovalente Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen (2.13.1; 2.13.1.2) und des gereinigten CNG-Kanals (2.13.2; 2.13.2.2).

Sollten die Membranen für diese Experimente nach dem hypotonischen Waschen mit thiol-spezifischen Reagenzien modifiziert oder vernetzt werden, so wurden die letzten beiden Waschschrte in Abwesenheit von DTT durchgeführt.

### Lysepuffer:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4

1 mM EDTA

2 mM DTT

Proteaseinhibitoren: E-64,

Aprotinin, Leupeptin

### DTT-Stocklösung:

0,1 - 1 M DTT in A. bidest

## **2.10 Reinigung des nativen CNG-Kanals aus ROS-Membranen durch Calmodulin- (CaM-) Affinitätschromatographie**

### **2.10.1 Solubilisierung von Membranproteinen**

Um Membranproteine über eine Chromatographie reinigen zu können, müssen sie zunächst mit Hilfe von Detergenzien aus der Membran herausgelöst (solubilisiert) werden. Für die Solubilisierung des CNG-Kanals eignet sich das Detergenz Chaps.

Die Pellets von 4 ml hypotonisch gewaschenen ROS-Membranen (40 mg Rhodopsin) wurden in einem Endvolumen von 20 ml Solubilisierungspuffer I aufgenommen und die Membranproteine durch Zugabe von 10 ml Solubilisierungspuffer II 30 min auf Eis unter leichtem Schütteln aus der Membran herausgelöst. Nicht solubiliertes Material wurde bei 100.000xg abzentrifugiert (TI 70-Rotor; 25 min; 4°C). Der solubilierte CNG-Kanal befand sich nun im Überstand.

Solubilisierungspuffer I:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4  
200 mM NaCl  
2 mM DTT  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
25 % Glycerin

Solubilisierungspuffer II:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4  
200 mM NaCl  
2 mM DTT  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
54 mM Chaps  
25 % Glycerin  
0,6 µg Asolektin

## 2.10.2 Reinigung des solubilierten CNG-Kanals

Der CNG-Kanal aus ROS-Membranen wurde in Anlehnung an Hsu und Molday (1993) durch CaM-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung wurde bei 4 °C durchgeführt. Eine C 10/10-Säule von Pharmacia wurde 3 cm hoch mit Säulenmaterial (CaM-Sepharose, Sigma) gefüllt. Vor der Reinigung wurde das Säulenmaterial mit ca. 15 ml Laufpuffer äquilibriert. Die solubilierten Membranproteine wurden dann mit einer Flussrate von 0,4 ml/min über die Säule gegeben. Der native CNG-Kanal wurde mit Elutionspuffer (enthält EDTA anstelle von Kalzium) in Anwesenheit von 15 mM Chaps eluiert. Das Eluat wurde schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Laufpuffer:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4  
150 mM NaCl  
1 mM DTT  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 mM Chaps  
25 % Glycerin  
1,3 µg/ml Asolektin

Elutionspuffer:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4  
150 mM NaCl  
0,25 mM EDTA  
15 mM Chaps  
25 % Glycerin  
1,3 µg/ml Asolektin

## 2.11 Reagenzien für die kovalente Vernetzung

Für die kovalente Vernetzung der Untereinheiten des CNG-Kanals habe ich in meinen Experimenten zwei unterschiedliche homobifunktionelle Vernetzungsreagenzien („cross-linker“) verwendet. Homobifunktionelle Vernetzungsreagenzien bestehen aus zwei identischen reaktiven Gruppen, die über einen Abstandsarm („spacer arm“) miteinander verknüpft sind. In Abhängigkeit von den vorhandenen reaktiven Gruppen können Vernetzungsreagenzien mit Thiol-, Amino-, Carbonyl- oder Carboxylgruppen reagieren. Die Länge der Abstandsarme variiert.

### 2.11.1 Thiol-spezifisches Vernetzungsreagenz (BMDB)

Die thiol- (SH-) spezifische Vernetzung über Cysteine erfolgte mit dem homobifunktionellen Reagenz 1,4-bismaleidyl-2,3-dihydroxybutan (BMDB). Das Reagenz gehört aufgrund seiner reaktiven Gruppen zu den Maleimiden. Es ist wasserunlöslich und unter milden Bedingungen oxidativ mit Natriumperjodat spaltbar. Die beiden folgenden Abbildungen stellen die chemische Formel des BMDB einschließlich der Spaltstelle sowie das Reaktionsschema der Maleimide (nukleophile Addition) dar.

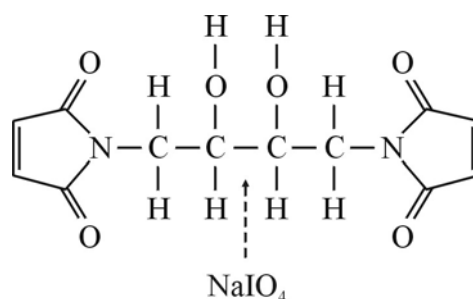


Abb. 4 **1,4-bismaleidyl-2,3-dihydroxybutan (BMDB; Molekulargewicht: 280,24 g/mol; Abstandsarmlänge: 1,02 nm).** BMDB wurde für die thiol-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen und des solubilisierten CNG-Kanals eingesetzt.

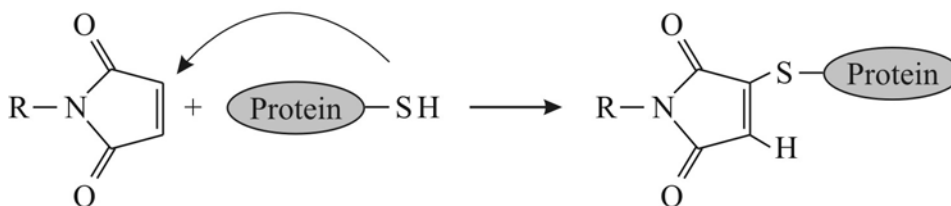


Abb. 5 **Reaktionsschema der Maleimide.** Bei der nukleophilen Addition greift die Thiolgruppe der Aminosäure Cystein nukleophil an der Ringstruktur des Maleimids an. Reagieren beide reaktiven Gruppen des BMDB mit den Thiolgruppen zweier Cysteine, so werden die Cysteine kovalent über den Abstandsarm miteinander vernetzt. Es entsteht ein stabiler Thioether, der nur oxidativ, z.B. mit Natriumperjodat, spaltbar ist.

### 2.11.2 Amino-spezifisches Vernetzungsreagenz (BS<sup>3</sup>)

Für die amino- (NH<sub>2</sub>-) spezifische Vernetzung wurde das homobifunktionelle Reagenz Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) eingesetzt. Bei diesem Reagenz stellen zwei N-Hydroxysuccinimid- (NHS-) ester die reaktiven Gruppen dar. Durch die Einführung der Sulfatgruppen (Sulfo-NHS-ester) wird das Molekül wasserlöslich. BS<sup>3</sup> ist selektiv für primäre Aminogruppen, die an der ε-Position der Lysine zu finden sind. In den folgenden Abbildungen sind die chemische Formel des BS<sup>3</sup> und das Reaktionsschema der NHS-ester (nukleophile Substitution) gezeigt.

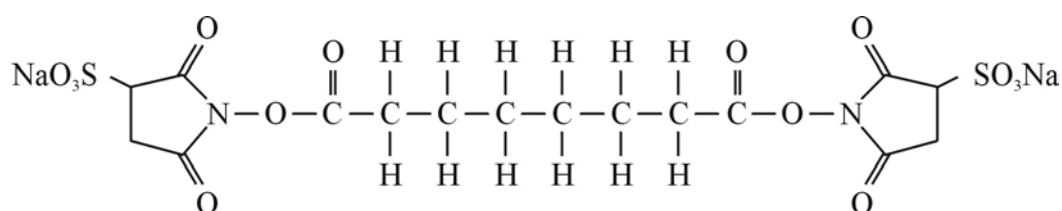


Abb. 6 **Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>; Molekulargewicht: 572,43 g/mol; Abstandslänge: 1,14 nm).** BS<sup>3</sup> wurde amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen und des solubilisierten CNG-Kanals eingesetzt.

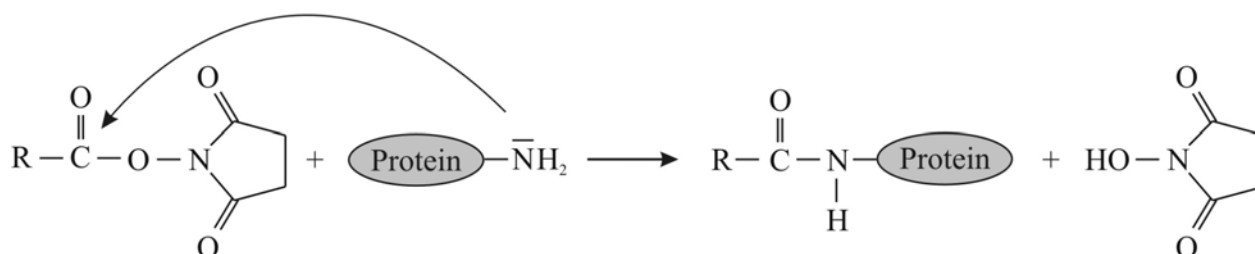


Abb. 7 **Reaktionsschema der NHS-Ester.** Bei der nukleophilen Substitution greift die Aminogruppe am Carbonylkohlenstoffatom nukleophil an. Reagieren beide reaktiven Gruppen des BS<sup>3</sup> mit den Aminogruppen zweier Lysine, so werden die Lysine kovalent über den Abstandarm miteinander vernetzt. Eine nachfolgende Spaltung des Vernetzungsproduktes ist nicht möglich. Die Reaktion resultiert in der Freisetzung eines N-Hydroxysuccinimids.

## 2.12 Thiol-spezifische Modifizierung von ROS-Membranen

Vor der kovalenten Vernetzung der Untereinheiten des CNG-Kanals in den ROS-Membranen (2.13.1.1) wurden die Membranen zunächst mit dem wasserunlöslichen, thiol-spezifischen Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) behandelt. NEM gehört aufgrund der chemischen Struktur seiner reaktiven Gruppe zu den Maleimiden. Durch die Reaktion mit NEM werden alle zugänglichen Thiolgruppen des CNG-Kanals und die anderer vorhandener Membranproteine (z.B. Rhodopsin,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - $\text{K}^+$ -Austauscher) irreversibel alkyliert. Für die kovalente Vernetzung über thiol-spezifische Reagenzien stehen diese Gruppen dann nicht mehr zur Verfügung.

Hypotonisch gewaschene Membranen wurden bei einer Rhodopsinkonzentration von 1 mg/ml mit 2 mM NEM in EDTA-Na-Hepes (pH 7,4) 15 min bei Raumtemperatur behandelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM DTT beendet. Überschüssiges DTT wurde durch mehrfaches Waschen mit isotonischem Puffer (EDTA-Na-Hepes, pH 7,4) entfernt. Hierfür wurden die Membranen wiederum bei einer Konzentration von 0,25 - 0,5 mg Rhodopsin/ml in 20 ml EDTA-Na-Hepes (pH 7,4) resuspendiert. Anschließend wurden die Membranen abzentrifugiert (TI 70-Rotor; 100.000xg; 25 min; 4°C). Der Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.

EDTA-Na-Hepes, pH 7,4:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4

100 mM NaCl

1 mM EDTA

Proteaseinhibitoren: E-64,

Aprotinin, Leupeptin

NEM-Stocklösung:

1 M NEM in DMSO

DTT-Stocklösung:

0,1 - 1 M DTT in A. bidest

Modifizierungsreagenz:

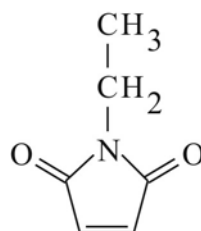


Abb. 8 **N-Ethylmaleimid (NEM; Molekulargewicht: 125,1 g/mol).** NEM wurde zur Absättigung aller zugänglichen Thiolgruppen des CNG-Kanals und die anderer vorhandener Membranproteine in einer Endkonzentration von 2 mM eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 15 min mit 5 mM DTT gestoppt. Der Reaktionsmechanismus der Maleimide wird unter 2.11.1 gezeigt.

## **2.13 Kovalente Vernetzung der Untereinheiten des CNG-Kanals („cross-linking“)**

Es wurden zwei experimentelle Ansätze durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden die Untereinheiten des CNG-Kanals miteinander vernetzt, solange sich der Kanal noch in der ROS-Membran befand (2.13.1.1; 2.13.1.2). Diese Experimente wurden bei schwachem Rotlicht durchgeführt, wobei die Proben während der Inkubation zusätzlich in Dunkelgefäßen aufbewahrt wurden. In einem zweiten Ansatz wurde der CNG-Kanal zunächst aus den solubilisierten Membranproteinen gereinigt und dann erst wurden die Untereinheiten miteinander vernetzt. Die Reinigung des CNG-Kanals und die anschließende kovalente Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten Kanals wurden von Dr. D. Weitz (Institut für Biologische Informationsverarbeitung I, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt.

Bei allen Experimenten wurden die NEM-, BMDB- und BS<sup>3</sup>-Stocklösungen jeweils unmittelbar vor ihrem Gebrauch angesetzt. Nach der Vernetzungsreaktion wurden die Proben auf 3,5-7,5 %igen Gradientengelen (2.3) aufgetrennt, die Proteine auf PVDF-Membranen transferiert (2.7.1) und die CNG-Kanaluntereinheiten immunologisch durch Antikörpermarkierung nachgewiesen (2.7.2).

### **2.13.1 Kovalente Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen**

#### **2.13.1.1 Thiol-spezifische Vernetzung Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals mit BMDB**

Hypotonisch gewaschene ROS wurden mit NEM behandelt und nach dem isotonischen Waschen abzentrifugiert. Die pelletierten Membranen wurden bei einer Konzentration von 0,2 mg Rhodopsin/ml in EDTA-Na-Hepes (pH 7,4) aufgenommen. Daraufhin wurde der CNG-Kanal durch Zugabe von 50 µM 8-Br-cGMP aktiviert. Diese Aktivierung induziert eine Konformationsänderung des Kanals, die wahrscheinlich zu einer erhöhten Zugänglichkeit von mindestens zwei Cysteinen führt. Die thiol-spezifische Vernetzung der Kanaluntereinheiten wurde durch Zugabe von 50 µM BMDB gestartet. Die Vernetzungsreaktion wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1, 3, 5, 7 und 20 h) durch Zugabe von 500 µM DTT gestoppt. Anschließend wurden die Membranen abzentrifugiert (TI 70-Rotor; 100.000xg; 25 min; 4°C) und in dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen.



Dieser Versuch wurde außerdem bei den pH-Werten 6,5 sowie 8,5 durchgeführt, indem der pH-Wert des Vernetzungspuffers (EDTA-Na-Hepes) dementsprechend eingestellt wurde. Alle anderen Schritte waren mit den oben aufgeführten identisch.

BMDB-Stocklösung:

10 mM BMDB in DMSO

NEM-Stocklösung:

0,1 - 1 M NEM in DMSO

### **2.13.1.2 Amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals mit BS<sup>3</sup>**

Die amino-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in der ROS-Membran erfolgte ohne vorhergehende NEM-Behandlung und 8-Br-cGMP-Aktivierung. Hypotonisch gewaschene Membranen wurden bei einer Konzentration von 0,2 mg Rhodopsin/ml in EDTA-Na-Hepes (pH 7,4) aufgenommen. Die Vernetzung wurde durch Zugabe von 0,5 mM BS<sup>3</sup> gestartet. Die Vernetzungsreaktion wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1, 2, 5, 10 und 30 min gestoppt) durch Zugabe von 1 M Tris gestoppt. Anschließend wurden die Membranen abzentrifugiert (TI 70-Rotor; 100.000xg; 25 min; 4°C) und in dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen.

BS<sup>3</sup>-Stocklösung:

50 mM BS<sup>3</sup> in A. bidest

### **2.13.2 Kovalente Vernetzung des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals**

#### **2.13.2.1 Thiol-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals mit BMDB**

Die Membranproteine von hypotonisch gewaschenen ROS-Membranen wurden solubilisiert (2.10.1) und der native CNG-Kanal über Calmodulin-Sepharose gereinigt (2.10.2). Die CNG-Kanaluntereinheiten wurden bei einer Konzentration von 0,3 µg Kanalprotein/ml in Elutionspuffer durch Zugabe von 5 µM BMDB in Anwesenheit von 200 µM 8-Br-cGMP vernetzt. Die Vernetzungsreaktion wurde zu unterschiedlichen Zeiten (10, 20, 30 und 60 min) gestoppt, indem die Probe mit dem doppelten Volumen dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt wurde.

BMDB-Stocklösung:

10 mM BMDB in DMSO

**2.13.2.2 Amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals mit BS<sup>3</sup>**

Die Membranproteine von hypotonisch gewaschenen ROS-Membranen wurden solubilisiert (2.10.1) und der native CNG-Kanal über Calmodulin-Sepharose gereinigt (2.10.2). Die CNG-Kanaluntereinheiten wurden bei einer Konzentration von 0,3 µg Kanalprotein/ml in Elutionspuffer durch Zugabe von 0,5 mM BS<sup>3</sup> vernetzt. Die amino-spezifische Vernetzung wurde ohne vorhergehende Aktivierung des Kanals mit 8-Br-cGMP durchgeführt. Die Vernetzungsreaktion wurde zu unterschiedlichen Zeiten (1, 2, 5, 10 und 30 min) gestoppt, indem die Probe mit dem doppelten Volumen dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt wurde.

BS<sup>3</sup>-Stocklösung:

50 mM BS<sup>3</sup> in A. bidest

**2.14 Spaltung BMDB-vernetzter CNG-Kanaluntereinheiten**

Hypotonisch gewaschene ROS wurden mit NEM behandelt (2.12) und nach dem isotonischen Waschen abzentrifugiert. Die Kanaluntereinheiten des membranständigen CNG-Kanals wurden in Anwesenheit von 8-Br-cGMP thiol-spezifisch mit BMDB vernetzt (2.13.1) und in einem 3,5-7,5 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Daraufhin wurde die Gelspur ausgeschnitten und 8 x 15 min in Waschpuffer geschüttelt. Um das BMDB zu spalten, wurde die Gelspur dann 30 min mit 30 mM NaIO<sub>4</sub> in Waschpuffer I (pH 7,5) inkubiert. Durch die NaIO<sub>4</sub>-Behandlung entstehen reaktive Aldehyde, die inaktiviert werden müssen, um unerwünschte Reaktionen zu verhindern. Deshalb wurde die Gelspur 15 min in Waschpuffer II gewaschen. Abschließend wurde sie 30 min in dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer geschüttelt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Gelspur, die nun die Spaltprodukte enthielt, wurde horizontal auf ein 3,5-7,5 %iges Polyacrylamidgel gelegt, die Spaltprodukte in der zweidimensionalen SDS-PAGE (2.3.1) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert (2.7.1).

Waschpuffer I:

20 mM Triethanolamin-HCl, pH 7,5

0,1 % SDS

Waschpuffer II:300 mM NH<sub>2</sub>OH · HCl-NaOH, pH 7,5

0,1 % SDS

Oxidative Spaltung:30 mM NaIO<sub>4</sub> in Waschpuffer I

## 2.15 Anreicherung des vernetzten, membranständigen CNG-Kanals über Ionenaustausch-Chromatographie

ROS-Membranen wurden zunächst mit NEM behandelt (2.12). In Anwesenheit von 8-Br-cGMP wurden dann die CNG-Kanaluntereinheiten thiol-spezifisch mit 50 μM BMDB vernetzt (2.13.1.1). Nach 5 h wurde die Vernetzungsreaktion mit 500 μM DTT beendet. Die Membranen wurden abzentrifugiert (TI 70-Rotor; 100.000xg; 25 min; 4°C) und das vernetzte CNG-Kanalprotein, wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben, solubilisiert.

### 2.15.1 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Anreicherung des vernetzten CNG-Kanals erfolgte über eine Anionenaustausch-Chromatographie bei 4°C. Dazu wurde eine C 10/10-Säule von Pharmacia 3 cm hoch mit Säulenmaterial (DEAE-Zellulose, Merck) gefüllt. Vor der Chromatographie wurde das Säulenmaterial mit ca. 15 ml Laufpuffer äquilibriert. Die solubilisierten Membranproteine wurden dann mit einer Flussrate von 0,4 ml/min über die Säule gegeben. Anschließend wurde der vernetzte CNG-Kanal mit Elutionspuffer (enthielt Hochsalz) in Anwesenheit von 20 mM Chaps eluiert. Das hier gewonnene Eluat wird als Eluat I bezeichnet.

Solubilisierungspuffer I + II:

s. 2.10.1

Laufpuffer:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4

150 mM NaCl

1 mM DTT

10 mM CaCl<sub>2</sub>

20 mM Chaps

Proteaseinhibitoren:

E-64 und Leupeptin

Elutionspuffer:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4

750 mM NaCl

1 mM DTT

10 mM CaCl<sub>2</sub>

20 mM Chaps

Proteaseinhibitoren:

E-64 und Leupeptin

## 2.15.2 Gelfiltration des Eluats I

Um das vernetzte, über Ionenaustausch-Chromatographie angereicherte, CNG-Kanalprotein konzentrieren zu können, musste die Proteinlösung zunächst entsalzt und umgepuffert werden. Hierfür wurde eine PD-10 Säule mit Sephadex G-25 M als Säulenmaterial (Pharmacia) verwendet. Säulen diesen Typs eluieren Proteine der Größe 1000-5000 Dalton und trennen Moleküle, die kleiner als 1000 Dalton sind, im Ausschlussvolumen ab. So konnte die Salzkonzentration von 750 mM auf 100 mM und die Chapskonzentration von 20 mM auf 10 mM reduziert werden.

Für diesen Vorgang wurde die Säule zunächst mit 25 ml Laufpuffer äquilibriert. Daraufhin wurden 2,5 ml des Eluats I über die Säule gegeben. Anschließend wurden 3,5 ml Laufpuffer über die Säule gegeben und das Eluat der Molekularsiebchromatographie (Eluat II) gesammelt. Das Volumen des Eluats II lag bei ca. 3,5 ml.

### EDTA-Na-Hepes, pH 7,4 + 10 mM Chaps:

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4

100 mM NaCl

1 mM EDTA

10 mM Chaps

## 2.15.3 Konzentrieren des Eluats II über Centricons

Da das nach der Gelfiltration gewonnene Eluat II nicht ausreichend Kanalprotein für die folgende Analyse enthält (2.14), war es notwendig, das Probenmaterial zu konzentrieren.

Es wurden Centricons vom Typ YM-30 (Millipore) verwendet, bei denen Proteine  $\geq 30$  kDa auf der Centricon-Membran zurückgehalten werden. Nachdem die Membran mit 2 ml A. bidest gespült worden war, wurde das Eluat II in 1 ml Schritten auf die Membran gegeben. Zwischen den Auftragungsschritten wurden die Centricons jeweils in einem 12141-Rotor 30-60 min bei 5000xg und 4°C (Sigma 2K15 Tischzentrifuge) zentrifugiert. Dann wurde die Membran mit 2 ml 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  gewaschen. Um die Proteine von der Centricon-Membran zu lösen, wurden 30 - 50  $\mu\text{l}$  dreifach konzentrierten SDS-Probenpuffers auf die Membran gegeben und die Centricons 30 min bei RT geschüttelt. Die Proteine wurden dann 2 min bei 1000xg und 4°C abzentrifugiert.

### 3 Ergebnisse

Der CNG-Kanal aus Sehstäbchen ist aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Untereinheitenzusammensetzung (Stöchiometrie) des nativen CNG-Kanals aus den Sehstäbchenaußensegmenten von Rindernetzhäuten aufzuklären. Dazu wurden die CNG-Kanaluntereinheiten mit Hilfe von Vernetzungsreagenzien spezifisch über Aminosäurereste kovalent miteinander verknüpft. Da die Aminosäurereste nur miteinander vernetzt werden können, sofern sie sich auch in räumlicher Nähe befinden, ist diese Methode besonders geeignet, Wechselwirkungen zwischen möglichen Interaktionspartnern aufzuklären. Es sollten zwei zur Diskussion stehende Stöchiometrie-Modelle untersucht werden (Abb. 9). Modell I postuliert für den nativen CNG-Kanal eine Zusammensetzung von drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit (3A-1B), wohingegen Modell II eine Zusammensetzung von jeweils zwei A- und zwei B-Untereinheiten (2A-2B) annimmt. Ausgehend von den beiden Modellen waren für jede postulierte Stöchiometrie unterschiedliche Vernetzungsprodukte zu erwarten, die ebenfalls in der folgenden Abbildung aufgeführt sind.

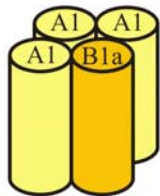
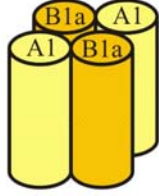
Modell I				Modell II			
							
A-Antikörper	kDa	B-Antikörper	kDa	A-Antikörper	kDa	B-Antikörper	kDa
3A-1B	429	3A-1B	429	2A-2B	606	2A-2B	606
2A-1B	366	2A-1B	366	1A-2B	543	1A-2B	543
1A-1B	303	1A-1B	303	2A-1B	366	2B	480
3A	189	1B	240	1A-1B	303	2A-1B	366
2A	126			2A	126	1A-1B	303
1A	63			1A	63	1B	240

Abb. 9 **Vorhergesagte Vernetzungsprodukte der Stöchiometrie-Modelle I und II.** Vernetzungsprodukte, die für eine 3A-1B-Stöchiometrie (links) und für eine 2A-2B-Stöchiometrie (rechts) des nativen CNG-Kanals vorhergesagt werden. Einige Vernetzungsprodukte sind für beide Modelle gültig (2A-1B, 1A-1B und 2A), einige sind jedoch nur für eines der beiden Modelle gültig (Modell I: 3A-1B und 3A; Modell II: 2A-2B, 1A-2B und 2B).

Die Entscheidung für eines der beiden Stöchiometrie-Modelle aufgrund von Vernetzungsexperimenten beruht auf vier wesentlichen Kriterien, die im Folgenden aufgeführt werden und anhand derer die Vernetzungsexperimente bewertet werden sollten.

#### 1) Die Anzahl der Vernetzungsprodukte

Im Falle von Modell I sollten von dem A-Antikörper sechs verschiedene, von dem B-Antikörper vier verschiedene Proteinbanden markiert werden. Wäre Modell II richtig, sollten mit dem A-Antikörper sechs, mit dem B-Antikörper aber auch sechs Banden sichtbar werden. Auch die Gesamtzahl der Proteinbanden, die man finden würde, unterscheidet sich in den beiden Modellen. Von Modell I werden insgesamt sieben, von Modell II acht unterschiedliche Proteinbanden vorhergesagt. Für den Fall, dass die elektrophoretische Mobilität der Vernetzungsprodukte anders ist als erwartet, wäre allein durch die Anzahl der markierten Proteinbanden eine Entscheidung zugunsten des einen oder anderen Modells nicht möglich.

#### 2) Das apparente Molekulargewicht der höchsten Bande (Endprodukt)

Sollte die elektrophoretische Mobilität der Vernetzungsprodukte etwa so sein, wie man es aus der Summe der Einzelkomponenten erwartet, so würde das Endprodukt im Falle von Modell I bei 429 kDa, im Falle von Modell II jedoch bei 606 kDa im SDS-Polyacrylamidgel laufen.

#### 3) Die Differenz zwischen den Molekulargewichten verschiedener Vernetzungsprodukte

Jede Untereinheit, die durch Vernetzung in einem Proteinkomplex eingebunden wird, erhöht dessen MG in charakteristischer Weise. Im Gel sollte jede A-Untereinheit 63 kDa, jede B-Untereinheit 240 kDa zum apparenten MG des Kanalkomplexes beitragen. Bildet man die Differenz zwischen den apparenten MG zweier Proteinbanden, kann man daher Rückschlüsse auf den Unterschied der Untereinheitenzusammensetzung der beiden Vernetzungsprodukte erhalten. Im Falle von Modell I wären die drei höchsten Banden, die vom A-Antikörper erkannt werden, um jeweils 63 kDa voneinander entfernt. Bei Modell II wären dies bei der A-Antikörpermarkierung jedoch 63 kDa und 177 kDa (s. Abb. 9).

#### 4) Die Zusammensetzung der Vernetzungsprodukte (nur A-, nur B-, oder A/B)

Bestimmte Vernetzungsprodukte sind aufgrund ihres MG nicht unbedingt eindeutig in ihrer Zusammensetzung zu identifizieren. So könnte beispielsweise eine Proteinbande zwischen 400 kDa und 500 kDa entweder Modell I (3A-1B; 429 kDa) oder Modell II (2B; 480 kDa) zugeordnet werden. Jedoch sollte ein 3A-1B-Komplex sowohl vom A- als auch vom B-Antikörper erkannt werden, während eine 2B-Bande nur vom B-Antikörper markiert werden sollte. Mit dieser Analyse kann man insbesondere all jene Vernetzungsprodukte identifizieren, die sehr spezifisch für das eine oder das andere Modell sind: Alle Proteinbanden, die drei A-

Untereinheiten enthalten, können nur dann gefunden werden, wenn Modell I stimmen würde. Das wären Banden bei 189 kDa (3A) und 429 kDa (3A-1B). Hingegen würde man Proteinbanden, die zwei B-Untereinheiten enthalten, nur dann beobachten, wenn Modell II richtig wäre. Dies wären Banden bei 480 kDa (2B), 545 kDa (1A-2B) und 606 kDa (2A-2B).

Im Übrigen setzt eine solche Analyse keineswegs voraus, dass der Kanal aus vier Untereinheiten besteht. Es wäre durchaus denkbar, dass der native CNG-Kanal aus Sechstäbchen trotz aller bisheriger Evidenz ein Pentamer ist. Somit wären beide vorgelegten Modelle falsch. Jedoch würde auch die Zusammensetzung eines pentameren Kanals mit dieser Methode geklärt werden können.

### 3.1 Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung vernetzter und unvernetzter CNG-Kanaluntereinheiten war neben des immunologischen Nachweisverfahrens durch Antikörpermarkierungen (2.7.2) Hauptbestandteil der Untersuchungen zur Stöchiometrie des CNG-Kanals.

Für die Molekulargewichtsbestimmung von Proteinbanden unbekannter Größe stehen kommerzielle Protein-Größenstandards zur Verfügung. Der in dieser Arbeit verwendete „High Molecular Weight“ Größenstandard von Pharmacia enthält Markerproteine, die den Bereich von 53 kDa (Glutamat-Dehydrogenase) bis 212 kDa (Myosinmonomer) abdecken. Wie aus den beiden Modellen zur Stöchiometrie des CNG-Kanals hervorgeht (Abb. 9), werden in den Experimenten jedoch auch Vernetzungsprodukte mit einem apparenten MG von ca. 300 bis 600 kDa erwartet. Um auch in diesem Molekulargewichtsbereich die Größe der Proteinbanden zuverlässig bestimmen zu können, war ein zusätzlicher Größenstandard erforderlich. Aus diesem Grunde habe ich Myosin aus dem Kaninchenmuskel in Anlehnung an die Vorschrift von Hu et al. (1989) vernetzt. Hierbei wurden die schweren Ketten des Myosins (je 212 kDa) über ihre Thiolgruppen (SH-Gruppen) kovalent miteinander verknüpft (2.4.2). Zusätzlich zu den zwei schweren Ketten besteht das Myosin noch aus vier leichten Ketten (15 - 30 kDa). Diese sind an der Oligomerisierung des Moleküls jedoch nicht beteiligt.

Die Entstehung der oligomeren Vernetzungsprodukte des Myosins ist in Abbildung 10 A gezeigt. Dargestellt ist ein Coomassie-blau gefärbtes Polyacrylamidgel mit dem HMW-Größenstandard (Spuren a und h), sowie dem Myosin vor Zugabe des chemischen Vernetzers (Spur b) und den Vernetzungsprodukten des Myosins (Spuren c - g). Die Vernetzungsreaktion

wurde zu unterschiedlichen Zeiten gestoppt, um den Verlauf der Reaktion zu dokumentieren und um Zwischenprodukte beobachten zu können. Während die Monomerbande des Myosins bei einem apparenten MG von 212 kDa mit fortschreitender Vernetzungszeit verschwindet, nimmt die Stärke der Dimerbande bei einem apparenten MG von 424 kDa besonders in den ersten 15 min der Reaktion zu. Das Trimer des Myosins ist bei einem apparenten MG von 636 kDa in den Spuren e bis g zu beobachten.

Die Doppelbande des Myosindimers in Spur c entsteht möglicherweise dadurch, dass bei einem Teil der Dimermoleküle eine zusätzliche Verknüpfung innerhalb einer schweren Kette (intramolekular) oder einer zusätzlichen Verknüpfung zwischen den beiden schweren Ketten (intermolekular) auftritt. Dies könnte eine Konformationsänderung des Moleküls verursachen und zu veränderten Laufeigenschaften im Polyacrylamidgel führen. Die Entstehung von Doppelbanden ist bei Vernetzungsexperimenten nicht selten und wird auch von Raab-Graham und Vandenberg (1998) berichtet. Die schwache Bande bei 424 kDa in Spur b (vor Zugabe des Vernetzers) ist auf eine selbständige Zusammenlagerung der Polypeptide im Myosinmolekül zurückzuführen (Ikebe et al., 2001). Da auch dies eine Doppelbande ist, könnte die Ursache für die unterschiedlichen Dimermoleküle jedoch auch eine unvollständige Denaturierung eines Teils der Dimermoleküle oder ein proteolytischer Abbau sein.

Die gefärbten Banden am oberen Rand des Trenngels sind nicht eindeutig zu identifizieren. Es könnte sich hierbei um das Tetramer des Myosins handeln, welches jedoch aufgrund seines hohen Molekulargewichts nicht weit genug in das Trenngel hineinwandern konnte.

Obwohl die Myosinoligomere sehr groß sind, lassen sie sich noch gut auf PVDF-Membranen übertragen. Abbildung 10 **B** zeigt die Amido-Schwarz gefärbten Markerproteine des HMW-Größenstandards (Spur a) sowie eine Vernetzungsprobe des Myosins aus einem weiteren Ansatz (Spur b). Die Banden des Myosindimers und -trimers sind deutlich bei 424 kDa bzw. 636 kDa zu erkennen. Auf der linken Seite der beiden Abbildungen ist das apparente Molekulargewicht (MG) der HMW-Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.



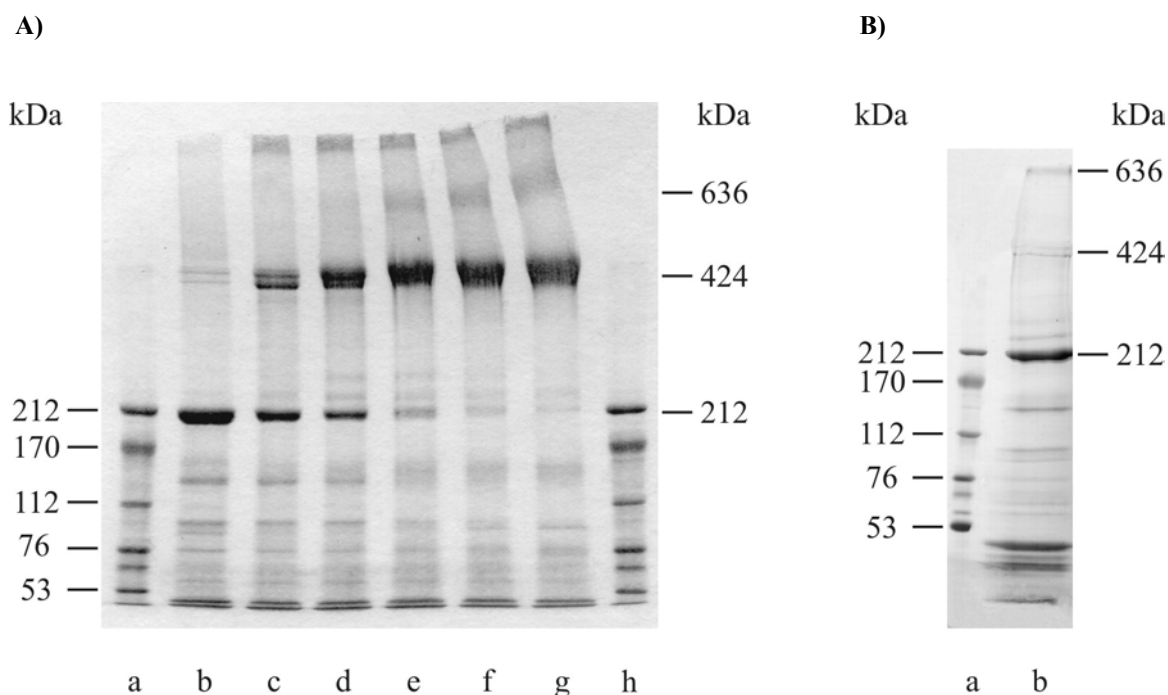


Abb. 10 **Kovalente Vernetzung des nativen Myosins aus dem Kaninchenmuskel.** Myosin wurde bei einer Konzentration von 0,85 mg/ml in EDTA-Na-Hepes (pH 7,4) mit dem thiol-spezifischen Vernetzungsreagenz p-PDM vernetzt. Es wurden 7,5  $\mu$ g des vernetzten Proteins je Spur in einem SDS-Polyacrylamidgradientengel (3,5-7,5 %) elektrophoretisch aufgetrennt. **A)** Coomassie-Blaufärbung des Polyacrylamidgels. Es sind Aliquots der Vernetzungsreaktion zum Zeitpunkt 0 (Spur b), 1 min (Spur c), 5 min (Spur d), 15 min (Spur e), 30 min (Spur f) und 45 min (Spur g). Die Spuren a und h enthalten den HMW-Größenstandard. **B)** Amido-Schwarzfärbung der Markerstreifen eines Westernblots. Spur a: HMW-Größenstandard; Spur b: Vernetztes Myosin. Auf der linken Seite der Abbildungen ist jeweils das apparente MG der HMW-Markerproteine, auf der rechten Seite das der gefärbten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Das Myosindimer wurde als zusätzlicher Größenmarker herangezogen, um das apparente Molekulargewicht der Proteinbanden in meinen Vernetzungsexperimenten zu berechnen. Das Trimer wurde dabei nicht berücksichtigt, da der Abschnitt des geringprozentigen Bereiches des Trenngels öfters gemeinsam mit dem Sammelgel abgetrennt wurde und somit die Bande des Trimers auf dem Westernblot nicht mehr detektiert werden konnte.

Die graphische Auftragung des Logarithmus' des apparenten Molekulargewichts der Markerproteine gegen ihre relative Beweglichkeit ( $R_f$ -Wert) im SDS-Polyacrylamidgel zeigt einen linearen Zusammenhang (Abb. 11). Für meine Experimente bedeutete dies, dass ich das apparente Molekulargewicht eines Vernetzungsprodukts mit hoher Genauigkeit aus der Kalibrierkurve, die durch das Myosindimer auch den hohen Molekulargewichtsbereich umfasste, bestimmen konnte.

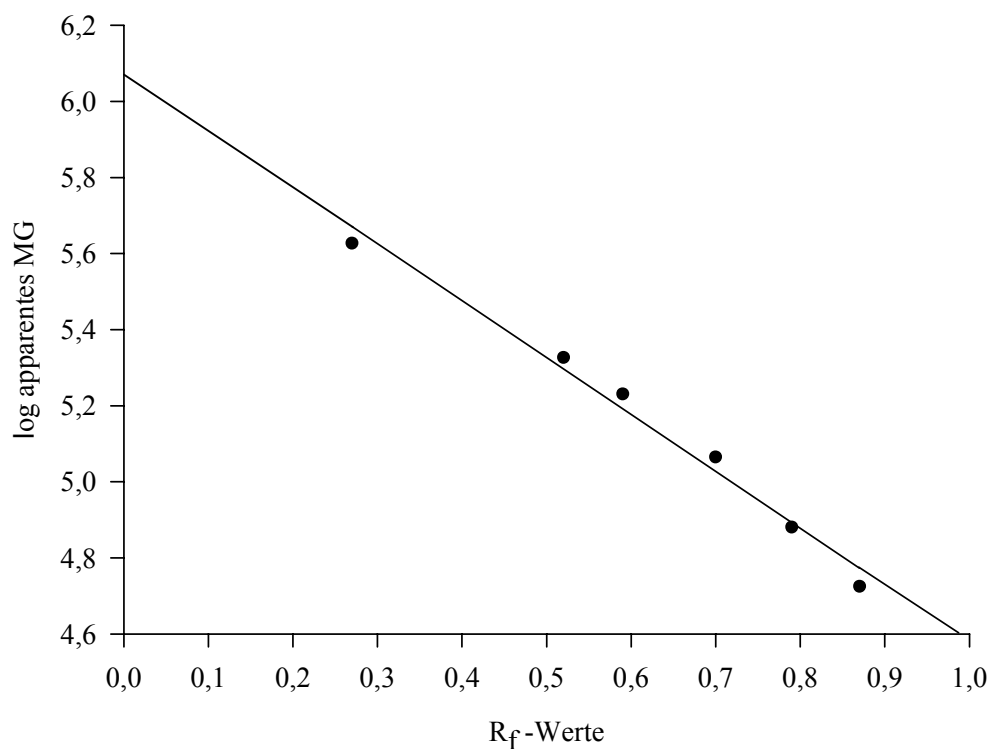


Abb. 11 **Kalibrierkurve für die Markerproteine im SDS-Polyacrylamidgel.** Auftragung des Logarithmus des apparenten Molekulargewichts der HMW-Markerproteine und des Myosindimers gegen die relative Beweglichkeit der Proteine im 3,5-7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgradientengel.

### 3.2 Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen

Die vernetzten und unernetzten CNG-Kanaluntereinheiten wurden immunologisch durch Antikörpermarkierungen nachgewiesen. Während die Molekulargewichtsbestimmung das apparente MG der Proteinbanden sowie die Distanz zwischen den einzelnen Proteinbanden lieferte, konnten mit dem immunologischen Nachweisverfahren darüber hinaus Aussagen über die Anzahl der Vernetzungsprodukte sowie über ihre Zusammensetzung getroffen werden. Jeder Westernblot wurde mit einem Antikörper gegen die A-Untereinheit, und nach vollständiger Entfernung dieses Antikörpers, mit einem Antikörper gegen die B-Untereinheit bzw. umgekehrt markiert. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden diese Antikörper als „A-Antikörper“ bzw. „B-Antikörper“ bezeichnet.

### 3.2.1 Kovalente Vernetzung über die Thiolgruppen von Cysteinen

In der Primärsequenz einer Polypeptidkette sind Cysteine in vergleichsweise geringer Anzahl gegenüber anderen Aminosäuren vorhanden. So verfügt die A-Untereinheit des CNG-Kanals nur über 6 (Abb. 1), die B-Untereinheit nur über nur 15 Cysteine (Abb. 1). Obwohl in sehr geringer Anzahl vorhanden, übernehmen Cysteine in einigen Fällen eine außerordentlich wichtige Funktion innerhalb eines Proteins, indem sie über ihre Thiolgruppen Disulfidbrücken ausbilden und somit maßgeblich an der Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur des Proteins beteiligt sind. Disulfidbrücken können sich innerhalb einer Polypeptidkette (intramolekulare Verknüpfung) oder zwischen zwei Polypeptidketten (intermolekulare Verknüpfung) ausbilden. Eine wichtige Voraussetzung für die natürliche Ausbildung von Disulfidbrücken ist die räumliche Nähe zweier Cysteine. In den Vernetzungsexperimenten macht man sich die Fähigkeit der Thiolgruppen, mit anderen Thiolgruppen Disulfidbrücken auszubilden, zunutze. Dazu werden zunächst die schon bestehenden Disulfidbrücken reduziert und das Protein dann mit dem Vernetzungsreagenz inkubiert. Es bilden sich neue Disulfidbrücken zwischen Cysteinen des Proteins und dem Vernetzungsreagenz. Da es sich bei Vernetzungsreagenzien um bifunktionelle Reagenzien handelt, sie also über zwei reaktive Gruppen verfügen, können sie verschiedene Proteine, aber auch verschiedene Untereinheiten in einem Protein über ihre Kontaktregionen miteinander vernetzen. Die räumliche Nähe, in der sich die beiden Cysteine befinden müssen, wird durch den Abstandsarm des Vernetzungsreagenzes bestimmt. Neben der räumlichen Nähe ist eine weitere, sehr wichtige Voraussetzung für die kovalente Vernetzung, dass die reaktive Thiolgruppe des Cysteins auch für das Vernetzungsreagenz zugänglich ist und keine sterische Hinderung dieser Gruppe vorliegt.

Es ist bekannt, dass CNG-Kanäle nicht nur durch ihre physiologischen Liganden cGMP bzw. cAMP, sondern auch durch sogenannte cGMP- bzw. cAMP-Analoga, wie z.B. 8-Br-cGMP aktiviert werden (Kaupp et al., 1998). 8-Br-cGMP wird im Gegensatz zu cGMP nur in sehr geringer Rate durch die Phosphodiesterase hydrolysiert, so dass der Kanal über einen langen Zeitraum im aktivierten Zustand gehalten werden kann. Die Bindung des Liganden induziert eine Konformationsänderung innerhalb der Bindestelle (Matulef et al., 1999), die vermutlich auf andere Proteinbereiche übertragen wird (Paoletti et al., 1999; Johnson & Zagotta, 2001) und zum Öffnen der Kanäle führt (Liu & Siegelbaum, 2000; Flynn et al., 2001). Durch die Bindung des Liganden werden scheinbar auch Cysteine zugänglicher gemacht. So wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass insbesondere das Cystein 481 unmittelbar vor der Nukleotidbindestelle

(s. Abb. 1) nur nach Bindung des Liganden modifiziert werden konnte (Serre et al., 1995; Gordon et al., 1997; Brown et al., 1998; Zheng & Zagotta, 2000; Rosenbaum & Gordon, 2002). Das haben sich auch Schwarzer et al. (2000) bei der thiol-spezifischen Vernetzung von CNG-Kanal und  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - $\text{K}^+$ -Austauscher, einem weiteren Membranprotein in ROS, zunutze gemacht. Dieses Vernetzungsprodukt war nämlich nur nachweisbar, sofern die Reaktion in Anwesenheit von 8-Br-cGMP durchgeführt wurde. Es ist somit anzunehmen, dass die Anwesenheit von 8-Br-cGMP die Entstehung von Vernetzungsprodukten, an denen der CNG-Kanal beteiligt ist, begünstigt.

### **3.2.1.1 Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen**

Im ersten Experiment sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit von 8-Br-cGMP auch die kovalente Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals begünstigt. Dazu wurden ROS-Membranen zweimal in Anwesenheit und zweimal in Abwesenheit von Dithiothreitol (DTT) gewaschen. DTT ist ein mildes Antioxidans, das vorhandene Disulfidbrücken möglichst vollständig reduzieren soll, bevor die Thiolgruppen dann über das Vernetzungsreagenz miteinander verknüpft werden können. Die Vernetzung wurde in Abwesenheit von 8-Br-cGMP (A und B, Spuren a - c) und in Anwesenheit von 8-Br-cGMP (A und B, Spuren d - f) mit BMDB durchgeführt. Die Vernetzungszeit betrug 3 h und 7 h. Abbildung 12 zeigt die Westernblot-Analyse mit den polyklonalen Antikörpern <sup>#39</sup> gegen die A-Untereinheit und <sup>#21</sup> gegen die B-Untereinheit. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente Molekulargewicht (MG) der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.

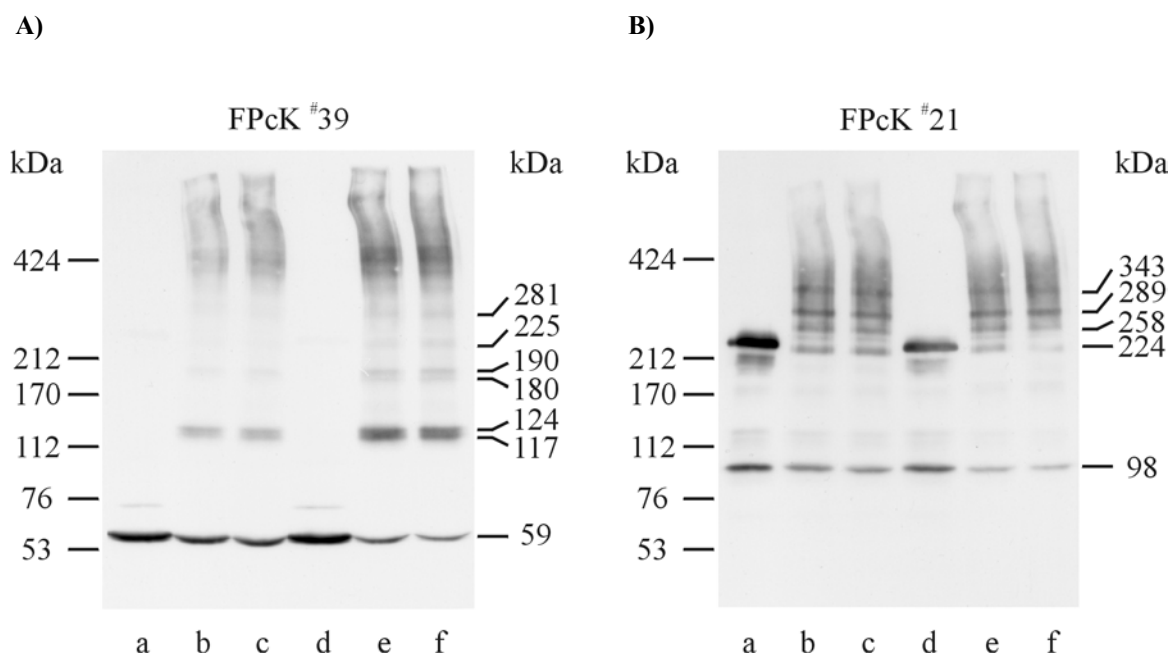


Abb. 12 **Westernblot-Analyse der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen.** ROS-Membranen wurden mehrfach hypotonisch gewaschen und die Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals in Abwesenheit (Spuren a - c) und in Anwesenheit von 50  $\mu$ M 8-Br-cGMP (Spuren d - f) mit 50  $\mu$ M BMDB vernetzt. Als Kontrolle wurden hypotonisch gewaschene Membranen aufgetragen (Spuren a und d). Folgende Aliquots der Vernetzungsreaktion wurden aufgetragen: 3 h (Spuren b und e) und 7 h (Spuren c und f). Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (75  $\mu$ g Rhodopsin je Spur). Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (**A**) und gegen die B-Untereinheit (**B**) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite der Westernblots ist jeweils das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Der A-Antikörper (**A**) markierte eine Bande bei 59 kDa (Spuren a - f). Bei dieser Bande handelt es sich um das A-Monomer, das ein apparentes MG von ca. 63 kDa besitzt (Cook et al., 1987; Kaupp et al., 1989). Weiterhin markierte der A-Antikörper Vernetzungsbanden bei 117 kDa bzw. 124 kDa (Spuren b, c, e, f) und 180 kDa bzw. 190 kDa (Spuren e und f). Diese Banden entsprechen sehr wahrscheinlich dem 2A- und 3A-Vernetzungsprodukt („A-Dimer“ und „A-Trimer“), die nach unserer Modellvorstellung bei ca. 126 kDa und 189 kDa liegen sollten. Dass diese Banden als Doppelbanden auftreten, ist möglicherweise auf zusätzliche intramolekulare Verknüpfungen zurückzuführen (vgl. Abb. 10). Weiterhin markierte der A-Antikörper Banden bei 225 kDa und 281 kDa (Spuren e und f). Diese Banden konnten nicht genau identifiziert werden. Da das apparente MG dieser Banden rechnerisch kein Vielfaches von 63 kDa (A-Untereinheit) darstellt, ist es unwahrscheinlich, dass diese Banden mehr als drei A-Untereinheiten enthalten. Möglicherweise sind diese Banden durch die Vernetzung mit einem

anderen Protein entstanden. Im höhermolekularen Bereich wurden von dem A-Antikörper keine spezifischen Vernetzungsprodukte mehr, sondern lediglich ein diffuser „Schmier“ erkannt.

Die Anwesenheit von 8-Br-cGMP führt zu einer effizienteren Entstehung der 2A- und 3A-Vernetzungsprodukte bei ca. 120 kDa und ca. 185 kDa (A, Spuren e und f), was auf eine begünstigte Entstehung dieser Vernetzungsprodukte hindeutet.

Der B-Antikörper (**B**) markierte eine Bande bei einem apparenten MG von 224 kDa (B, Spuren a - f). Bei dieser Bande handelt es sich um das B-Monomer. Weiterhin markierte der B-Antikörper eine Bande bei 98 kDa. Diese Proteinbande wurde bereits von Körschen et al. (1995) beobachtet. Es handelt sich dabei um ein Abbauprodukt oder aber um eine Spleißvariante der B-Untereinheit. Die Intensität, mit der diese Bande hier auftritt, täuscht. Mit Absicht wurde dieser Westernblot sehr lange exponiert, um möglichst alle Proteinbanden, die im Laufe der Reaktion entstehen oder verschwinden, sichtbar zu machen. Wurde der Westernblot nur kurz exponiert, d.h. nur so lange, bis das B-Monomer sichtbar wurde, so war zu erkennen, dass die 98 kDa-Bande im Vergleich zur vollständigen B-Untereinheit nur in verschwindend geringer Menge vorhanden ist. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Vernetzung der Kanaluntereinheiten nicht durch die Anwesenheit des Abbauprodukts bzw. Spleißvariante gestört wird. Nach Zugabe des Vernetzungsreagenzes nimmt die Intensität der B-Monomerbande ab und es treten Vernetzungsprodukte im höhermolekularen Bereich auf. Der B-Antikörper markierte dort auch im Wesentlichen nur einen diffusen „Schmier“, in dem sich aber drei schwache Banden bei 343 kDa, 289 kDa und 258 kDa (Spuren b, c, e, f) identifizieren ließen. Da diese Banden jedoch nicht gleichzeitig auch vom A-Antikörper erkannt wurden (vgl. Abb. 12 A), handelt es sich hierbei nicht um Vernetzungsprodukte zwischen den beiden Kanaluntereinheiten. Möglicherweise sind diese Banden durch die Vernetzung mit anderen, räumlich eng benachbarten Proteinen entstanden.

Ein Einfluss von 8-Br-cGMP auf die Vernetzungsreaktion von Proteinkomplexen, die von dem B-Antikörper markiert wurden, ist nicht zu erkennen.

In diesem Experiment waren Vernetzungsprodukte der A-Untereinheit nachweisbar. Da sich das A-Monomer zum A-Dimer und A-Trimer vernetzen ließ, deutet dies darauf hin, dass der CNG-Kanal über drei A-Untereinheiten verfügt. Die Westernblot-Analyse zeigt jedoch keine klare Vernetzungsbande, die von beiden Antikörpern detektiert wurde. Der höhermolekulare Bereich von 300 bis 600 kDa, in dem die Vernetzungsprodukte zwischen den beiden Untereinheiten den Stöchiometrie-Modellen zufolge zu erwarten sind (vgl. Abb. 9), wurde von beiden Antikörpern lediglich als diffuser „Schmier“ erkannt. Dies ist wahrscheinlich auf die Entstehung von vielen

verschiedenen Vernetzungsprodukten zwischen den A- bzw. der B-Untereinheiten mit anderen räumlich eng benachbarten Proteinen zurückzuführen.

### **3.2.1.2 Die NEM-Behandlung von ROS-Membranen ermöglicht eine thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten**

Wahrscheinlich entstehen bei der thiol-spezifischen Verbrückung der Untereinheiten des CNG-Kanals in ROS-Membranen viele Vernetzungsprodukte zwischen den Kanaluntereinheiten und anderen Membranproteinen. Um diese Interaktionen zu vermeiden, sollten alle zugänglichen Thiolgruppen dieser möglichen Interaktionspartner irreversibel blockiert werden. Dazu wurden hypotonisch gewaschene Membranen mit dem Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) behandelt (2.12). Bei dieser Modifizierungsreaktion werden die Thiolgruppen alkyliert und stehen somit für die nachfolgende Vernetzungsreaktion nicht mehr zur Verfügung. Inwiefern die Modifizierung mit NEM auch die vernetzbaren Thiolgruppen des CNG-Kanals betraf und ob sich NEM-Behandlung der Membranen auf die Entstehung der Vernetzungsprodukte auswirkte, sollte im folgenden Experiment untersucht werden.

Vor der thiol-spezifischen Vernetzungsreaktion ist es notwendig, das NEM vollständig zu entfernen. Dazu wurden die Membranen mehrfach isotonisch gewaschen. Die Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals mit BMDB erfolgte anschließend in Abwesenheit und in Anwesenheit von 8-Br-cGMP. Die Inkubationszeit betrug 1 h. Abbildung 13 zeigt die Westernblot-Analyse mit dem A-Antikörper (A) und dem B-Antikörper (B). Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente Molekulargewicht (MG) der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.

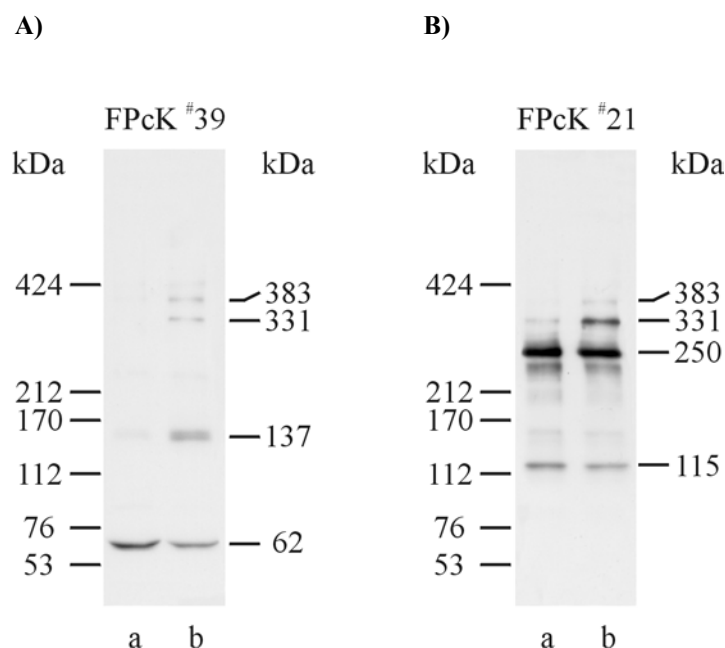


Abb. 13 **Westernblot-Analyse der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-behandelten ROS-Membranen.** ROS-Membranen wurden mit NEM behandelt und die Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals in Abwesenheit (A und B, Spur a) und in Anwesenheit von 50  $\mu$ M 8-Br-cGMP (A und B, Spur b) mit 50  $\mu$ M BMDB vernetzt. Die Vernetzungsdauer betrug in beiden Ansätzen 1 h. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (75  $\mu$ g Rhodopsin je Spur). Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (A) und gegen die B-Untereinheit (B) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite der Westernblots ist jeweils das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Wurden die Untereinheiten des CNG-Kanals in NEM-behandelten Membranen in Abwesenheit von 8-Br-cGMP mit BMDB vernetzt, so wurde bei der Markierung gegen die A-Untereinheit eine Bande bei 62 kDa erkannt (A, Spur a). Sie entspricht dem A-Monomer. Weiterhin ist in dieser Spur sehr schwach eine Bande bei 137 kDa zu erkennen. Bei dieser Bande könnte es sich um das A-Dimer handeln. Die Markierung mit dem Antikörper gegen die B-Untereinheit zeigt das B-Monomer bei 250 kDa und eine weitere Bande sehr schwacher Intensität bei 331 kDa (B, Spur a). Die Bande bei 115 kDa stellt wieder das Abbauprodukt oder die Spleißvariante der B-Untereinheit dar (B, Spur a). Da sie für die Verknüpfung der Kanaluntereinheiten nicht von Bedeutung war, wird sie im weiteren Verlauf der Arbeit bei der Beschreibung der Proteinbanden vernachlässigt.

Wurde die Vernetzung hingegen in Anwesenheit von 8-Br-cGMP durchgeführt, so wurden von dem A-Antikörper zusätzlich zu dem A-Monomer (62 kDa) Vernetzungsbanden bei 137 kDa, 331 kDa und 383 kDa erkannt (A, Spur b). Der B-Antikörper erkannte unter diesen Versuchsbedingungen zusätzlich zum B-Monomer (250 kDa) Vernetzungsbanden ebenfalls bei 331 kDa und 383 kDa (B, Spur b). Da die Banden bei 331 kDa und 383 kDa von beiden



Antikörpern spezifisch erkannt wurden, handelt es sich hierbei offensichtlich um Vernetzungsprodukte zwischen den beiden Kanaluntereinheiten. Wahrscheinlich ist es ein Vernetzungsprodukt zwischen einer A- und einer B-Untereinheit (331 kDa) sowie um ein Vernetzungsprodukt zwischen zwei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit (383 kDa).

Vergleicht man die Ergebnisse der Vernetzungsreaktionen mit und ohne Vorhandlung der Membranen durch NEM, werden deutliche Unterschiede im Bandenmuster augenfällig. Bei der Vernetzung nach NEM-Behandlung der Membranen (s. Abb. 12) treten im höhermolekularen Bereich von 300 kDa bis 600 kDa trennscharfe Vernetzungsbanden der beiden Kanaluntereinheiten anstelle des diffusen „Schmiers“ auf. Dies deutet darauf hin, dass durch die NEM-Modifizierung Interaktionen der Kanaluntereinheiten mit anderen Membranproteinen weitgehend verhindert werden. Darüber hinaus zeigt sich unter diesen Versuchsbedingungen ein deutlicher Einfluss von 8-Br-cGMP auf die Vernetzungsreaktion. Im Gegensatz zur Vernetzung ohne Anwesenheit des Liganden (s. Abb. 13), entstanden nun sowohl zusätzliche als auch stärkere Vernetzungsbanden. Die Konformationsänderung infolge der Bindung von 8-Br-cGMP an den Kanal führt vermutlich zu einer erhöhten Zugänglichkeit von Cysteinen und begünstigt so die Entstehung spezifischer Vernetzungsprodukte zwischen den beiden Kanaluntereinheiten. Die Vernetzungsprodukte können deshalb in Anwesenheit von 8-Br-cGMP effektiver und schneller entstehen.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass durch die NEM-Modifizierung der Membranen und Anwesenheit von 8-Br-cGMP während der kovalenten Vernetzung mit BMDB auch im höhermolekularen Bereich spezifische Vernetzungsprodukte entstehen können. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen die thiol-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals immer mit NEM-modifizierten Membranen und in Anwesenheit von 8-Br-cGMP durchgeführt.

### **3.2.1.3 Die Stöchiometrie des membranständigen CNG-Kanals**

Nachdem die Versuchsbedingungen für die kovalente Vernetzung mit BMDB optimiert worden waren, sollte überprüft werden, ob, und wenn ja wie, sich das Bandenmuster in Abhängigkeit von der Vernetzungsdauer ändert. Ziel war eine möglichst vollständige Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten innerhalb des Proteinkomplexes bis hin zum Endprodukt. Das Experiment wurde mit NEM-behandelten Membranen durchgeführt. Nach Zugabe von 8-Br-cGMP wurde

die Vernetzung mit BMDB gestartet. Dabei wurde die Inkubationsdauer von einer Stunde auf drei, fünf, sieben und zwanzig Stunden erhöht. Die folgende Abbildung (Abb. 14) zeigt die Westernblot-Analyse des Experiments. In der Abbildung wird das apparente MG der Proteinbanden, die von den Antikörpern erkannt wurden, mit dem MG der Vernetzungsprodukte, die in den Stöchiometrie-Modellen vorhergesagt werden, verglichen. Um die Abbildung übersichtlich zu gestalten, habe ich verschiedene Farben für die Beschriftung gewählt: Schwarz kennzeichnet die von den Antikörpern markierten Proteinbanden, Grün bzw. Rot sind die Vernetzungsprodukte, die spezifisch nur in Modell I oder aber in Modell II vorkommen sollten. Grau sind die Vernetzungsprodukte, die von beiden Modellen vorhergesagt werden.

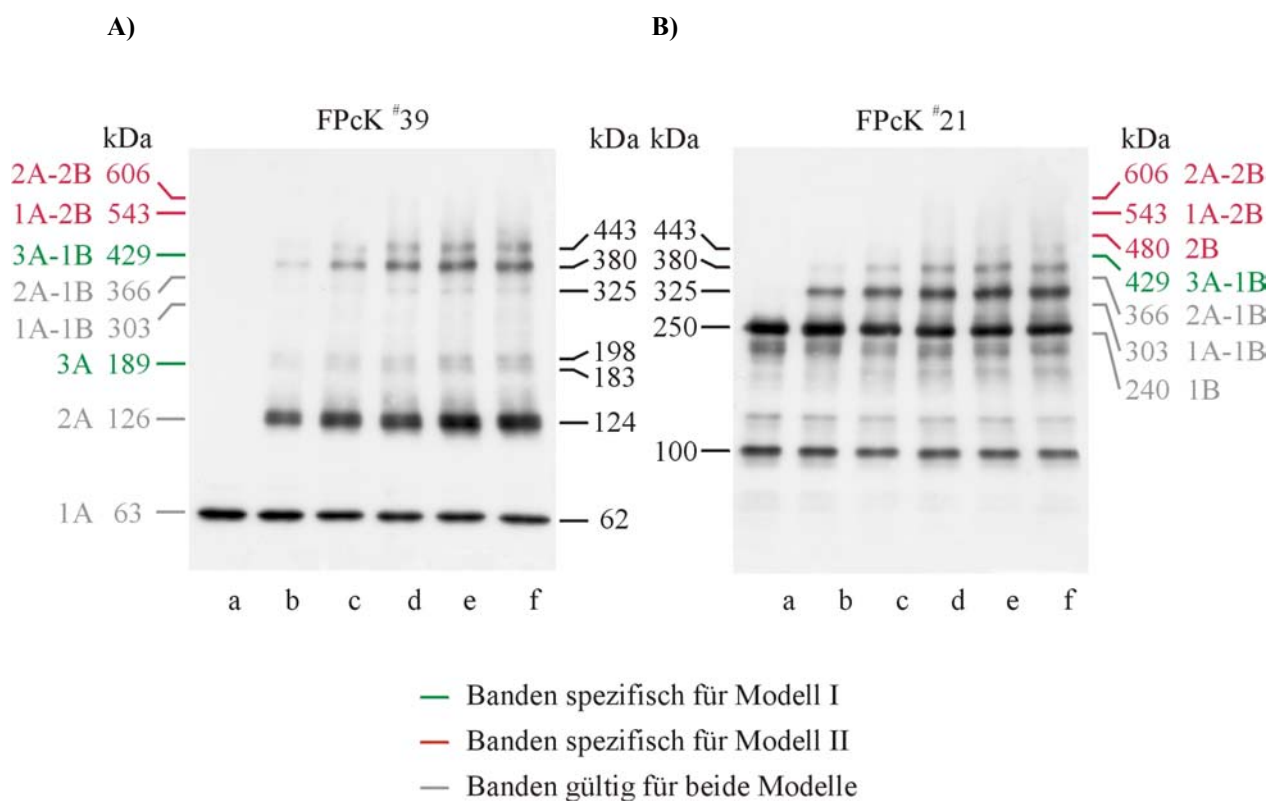


Abb. 14 **Westernblot-Analyse der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen: Stöchiometrie des membranständigen CNG-Kanals.** ROS-Membranen wurden mit NEM behandelt und die Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals in Anwesenheit von 50  $\mu$ M 8-Br-cGMP mit 50  $\mu$ M BMDB vernetzt. Als Kontrolle wurden NEM-behandelte Membranen aufgetragen (Spur a). Folgende Aliquots der Vernetzungsreaktion wurden aufgetragen: 1 h (Spur b), 3 h (Spur c), 5 h (Spur d), 7 h (Spur e) und 20 h (Spur f). Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (50  $\mu$ g Rhodopsin je Spur). Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (**A**) und gegen die B-Untereinheit (**B**) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Schwarz kennzeichnet die von den Antikörpern markierten Proteinbanden, Grün bzw. Rot sind die Vernetzungsprodukte, die spezifisch in Modell I oder in Modell II vorkommen sollten. Grau sind die Vernetzungsprodukte, die von beiden Modellen vorhergesagt werden. Für alle Proteinbanden ist das apparente MG in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Abbildung 14 zeigt ein und denselben Westernblot, der nacheinander gegen die A- und die B-Untereinheit (A und B) markiert wurde. In Spur a sind unvernetzte Proteine aufgetragen. Der A-Antikörper (A) erkannte hier nur die Monomerbande bei 62 kDa (Spur a). Die Spuren b bis f zeigen zahlreiche Vernetzungsprodukte, die mit fortschreitender Inkubationsdauer entstehen. Die Intensität der Bande bei 62 kDa nimmt mit fortschreitender Inkubationsdauer ab. Schon nach einstündiger Vernetzungsdauer lassen sich Vernetzungsprodukte bei 124 kDa, 183 kDa und 198 kDa deutlich nachweisen (Spur b). Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das Verknüpfungsprodukt von zwei A-Untereinheiten (124 kDa) bzw. von drei A-Untereinheiten (183 kDa bzw. 198 kDa). Die Doppelbande des A-Trimers könnte auf eine intramolekulare Verknüpfung zurückzuführen sein (vgl. Abb. 10). Zusätzlich treten Banden bei 325 kDa, 380 kDa und 443 kDa auf (Spuren c - f).

Der B-Antikörper (B) erkannte bei den unvernetzten Membranproteinen (Spur a) das B-Monomer bei 240 kDa, das Abbauprodukt bzw. Spleißprodukt der B-Untereinheit bei 100 kDa, sowie eine Reihe unspezifischer Banden bei ca. 130 kDa, ca. 180 kDa und ca. 200 kDa, die für die Vernetzung jedoch keine Rolle spielen und deswegen vernachlässigt werden. Schon nach einstündiger Inkubation mit dem Vernetzungsreagenz lassen sich Proteinbanden bei 325 kDa und 380 kDa markieren (Spur b), deren Intensität mit steigender Inkubationsdauer zunimmt (Spuren c - f). Nach dreistündiger Inkubationsdauer tritt zusätzlich eine schwache Bande bei 443 kDa auf (Spur c), die spätestens nach sieben Stunden eindeutig zu identifizieren ist (Spur e).

Vergleicht man das apparente MG der Vernetzungsbanden auf dem Westernblot mit dem von den Modellen vorhergesagten MG der Vernetzungsprodukte (vgl. Abb. 9), so zeigt sich aus folgenden Gründen eine deutliche Bestätigung für Modell I, welches drei A-Untereinheiten und eine B-Untereinheit für die Stöchiometrie des Kanals postuliert (3A-1B):

#### *1) Die Anzahl der Vernetzungsprodukte*

Der A-Antikörper erkannte sechs auswertbare Proteinbanden, der B-Antikörper vier. Dies entspricht den Vernetzungsprodukten, die von Modell I (3A-1B) vorhergesagt werden. Würde Modell II (2A-2B) stimmen, so hätte der B-Antikörper sechs Banden markieren müssen. Die Gesamtzahl der Proteinbanden, die in dem Experiment gefunden wurde, beläuft sich auf sieben. Auch dies entspricht der von Modell I vorhergesagten Gesamtzahl der Banden, da Modell II eine Gesamtzahl von acht unterschiedlichen Banden voraussagt.

### 2) Das apparente Molekulargewicht der höchsten Bande (Endprodukt)

Das Endprodukt der Vernetzung wurde bei 443 kDa beobachtet und liegt somit nahe bei dem von Modell I (3A-1B) vorhergesagten Wert von 429 kDa. Dies zeigt auch, dass die elektrophoretische Mobilität der Vernetzungsprodukte der Summe der Einzelkomponenten entspricht. Eine Bande bei 606 kDa, die nach Modell II (2A-2B) das Endprodukt repräsentieren würde sowie eine weitere vorhergesagte Bande bei 543 kDa (1A-2B), trat nicht auf.

### 3) Die Differenz zwischen den Molekulargewichten verschiedener Vernetzungsprodukte

Die drei höchsten Banden, die vom A-Antikörper markiert wurden, weisen eine Differenz von 63 kDa und 55 kDa auf. Dies entspricht jeweils einer zusätzlichen A-Untereinheit, wie es auch von Modell I vorhergesagt wird. Nach Modell II hätte hier eine Differenz von 63 kDa und 177 kDa auftreten sollen.

### 4) Die Zusammensetzung der Vernetzungsprodukte (nur A-, nur B-, oder A/B)

Das Bandenmuster enthält Proteinbanden, die nur vom A-Antikörper erkannt wurden und somit Vernetzungsprodukte mit drei A-Untereinheiten darstellen (3A: 198 kDa bzw. 183 kDa; 3A-1B: 443 kDa). Diese Banden werden nur von Modell I vorhergesagt. Eine Bande bei 480 kDa, die nach Modell II nur der B-Antikörper hätte erkennen sollen und somit ein B-Dimer darstellen würde, trat bei der Vernetzung nicht auf. Somit wird deutlich, dass auch Vernetzungsbanden, die möglicherweise anhand des apparenten MG nicht eindeutig zu identifizieren gewesen wären, durch die Bestimmung ihrer Zusammensetzung eindeutig einem Modell - in diesem Fall Modell I - zugeordnet werden konnten.

#### **3.2.1.4 Spezifität der Antikörpermarkierungen**

Bei der Anwendung des immunologischen Nachweisverfahrens besteht die Gefahr, dass Antikörper durch Kreuzreaktionen Proteinbanden markieren, die mit der eigentlichen Reaktion nichts zu tun haben und somit falsch interpretiert würden (Bjerrum et al., 1988). Darüber hinaus können gerade bei Vernetzungsexperimenten zusätzlich Probleme der „Epitop-Maskierung“ auftreten (Luzio & Jackson, 1988), d.h. dass eine Bindestelle (Epitop) nach der Vernetzungsreaktion nicht mehr für den Antikörper zugänglich ist. Um dies auszuschließen, wurde ein Experiment durchgeführt, in dem die CNG-Kanaluntereinheiten, wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben, mit BMDB vernetzt wurden. Für den immunologischen Nachweis wurden diesmal jedoch Antikörper eingesetzt, die andere Epitope der A- und B-Untereinheiten erkennen als die bisher eingesetzten. Die A-Untereinheit des CNG-Kanals wurde mit dem monoklonalen Antikörper UED 7D3 nachgewiesen. Im Gegensatz zu dem Antikörper FPcK #39, der die cGMP-

Bindestelle erkennt, ist der Antikörper UED 7D3 gegen eine Sequenz gerichtet, die C-terminal von der cGMP-Bindestelle liegt. Der Nachweis der B-Untereinheit erfolgte mit dem Antikörper FPcK #52. Dieser Antikörper erkennt eine Sequenz innerhalb des GARP-Teils der B-Untereinheit. Im Gegensatz dazu erkennt der in allen anderen Experimenten verwendete Antikörper FPcK #21 einen N-terminalen Bereich der B-Untereinheit vor Beginn des GARP-Teils. Das Ergebnis der Westernblot-Analyse mit diesen Antikörpern ist in Abbildung 15 (A und B) gezeigt. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben. In dem Experiment wurden Proteinbanden mit ähnlichem apparentem MG wie bei dem vorherigen Experiment (s. 3.2.1.3) markiert.

Die Banden mit dem höchsten apparenten MG bei 417 kDa, 363 kDa und 308 kDa wurden sowohl vom A- als auch vom B-Antikörper erkannt (A und B, Spur f). Dies bestätigt, dass diese drei Vernetzungsbanden beide Untereinheiten enthalten. Weiterhin erkannte der A-Antikörper Banden bei 208 kDa, 124 kDa (Spuren b - f) sowie bei 62 kDa (Spuren a - f) und der B-Antikörper eine Bande bei 241 kDa (Spuren a - f). Auffallend ist, dass der Antikörper #52 im Gegensatz zum Antikörper #21 keine weitere Bande bei ca. 110 kDa detektiert. Diese Bande wird somit nur von einem Antikörper erkannt, der gegen den GARP-Teil der B-Untereinheit gerichtet ist. Die Tatsache, dass der Antikörper #52 alle relevanten Vernetzungsprodukte erkennt, nicht aber die Bande bei ca. 100 kDa, macht deutlich, dass das Spleiß- bzw. Abbauprodukt bei ca. 100 kDa keinen Einfluss auf die Entstehung der Vernetzungsprodukte zwischen den A-Untereinheiten und der B-Untereinheit hat.

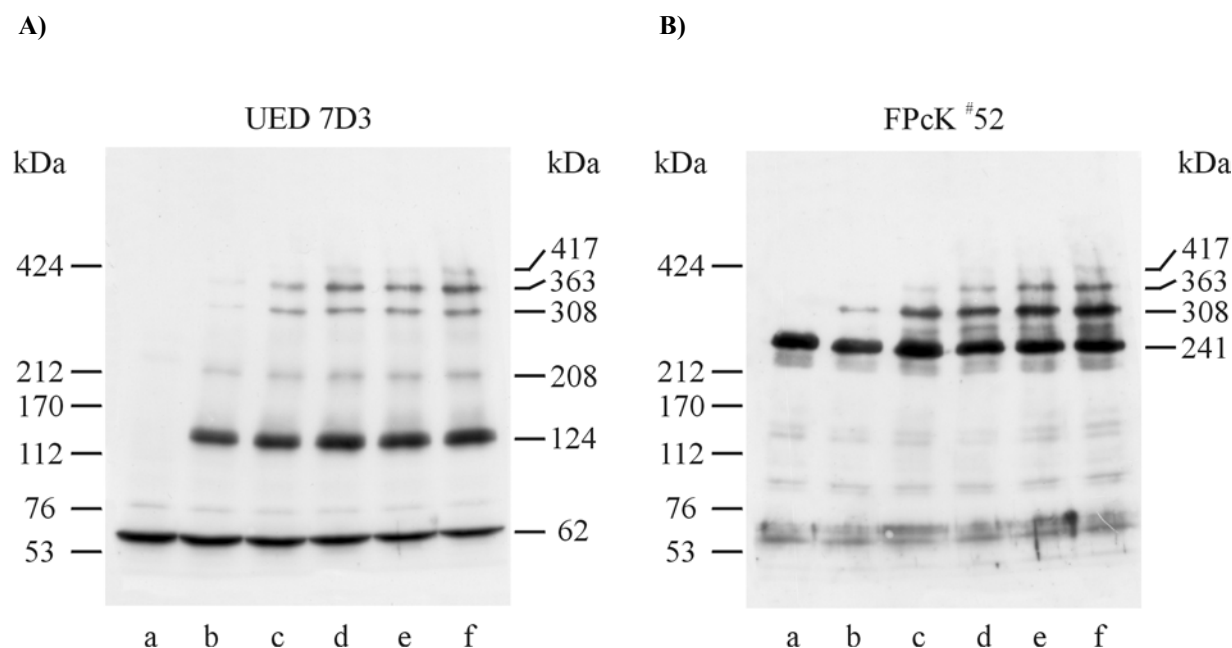


Abb. 15 **Westernblot-Analyse der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen: Spezifität der Antikörpermarkierungen.** ROS-Membranen wurden mit NEM behandelt und die CNG-Kanaluntereinheiten in Anwesenheit von 50  $\mu$ M 8-Br-cGMP mit 50  $\mu$ M BMDB vernetzt. Als Kontrolle wurden NEM-behandelte Membranen aufgetragen (Spur a). Folgende Aliquots der Vernetzungsreaktion wurden aufgetragen: 1 h (Spur b), 3 h (Spur c), 5 h (Spur d), 7 h (Spur e) und 20 h (Spur f). Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (75  $\mu$ g Rhodopsin je Spur). Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (A) und gegen die B-Untereinheit (B) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite der Westernblots ist jeweils das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Antikörper mit unterschiedlichen Bindestellen erkennen die gleichen Vernetzungsprodukte zwischen den beiden Kanaluntereinheiten. Dies zeigt, dass die Markierung spezifisch ist und man eine Kreuzreaktion der Antikörper weitgehend ausschließen kann. Außerdem gibt es keinen Hinweis darauf, dass einzelne Proteinbanden aufgrund einer „Epitop-Maskierung“ nicht erkannt wurden. Auch dieses Experiment unterstützt die von Modell I vorgeschlagene Stöchiometrie für den CNG-Kanal (3A-1B).

### 3.2.1.5 Werden die Ergebnisse durch die Entfernung gebundener Antikörper („Stripping“) verfälscht?

Ein weiterer methodischer Aspekt der hier untersuchten Vernetzungsreaktion ist die aufeinander folgende Antikörpermarkierung ein und desselben Westernblots (Geysen, 1988). Ich wollte überprüfen, ob gebundene Antikörper nach einer Markierung vollständig durch das sogenannte „Stripping“ (2.7.4) von der Blot-Membran entfernt werden konnten. Denn nur so konnte gewährleistet werden, dass die Markierung mit dem B-Antikörper keine Signale lieferte, die

eigentlich auf die vorhergehende Markierung mit dem A-Antikörper zurückzuführen waren bzw. umgekehrt. Eine Unterscheidung solcher „Falsch-Signale“ ist schwierig. Dieser Aspekt war für meine Experimente besonders wichtig, da in dieser Arbeit durch Antikörpermarkierungen gegen beide Kanaluntereinheiten die Zusammensetzung der jeweiligen Vernetzungsbande aufgeklärt werden sollte. Falsche Signale hätten zu irrtümlichen Schlussfolgerungen der stöchiometrischen Zusammensetzung des CNG-Kanals geführt.

Für dieses Experiment wurden unvernetzte und BMDB-vernetzte CNG-Kanaluntereinheiten aus dem Experiment in Abbildung 15, Spuren a (0 min) und f (20 h Vernetzungszeit) erneut in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden vier Spuren des Polyacrylamidgels folgendermaßen belegt: Spur a: Kontrolle; Spur b: Vernetzungsprobe; Spur c: dieselbe Kontrolle wie in Spur a; Spur d: dieselbe Vernetzungsprobe wie in Spur b. Der Westernblot wurde zwischen den Spuren b und c getrennt. Die Spuren a und b wurden mit dem A-Antikörper markiert, die Spuren c und d (mit den identischen Proben) wurden mit dem B-Antikörper markiert. Abbildung 16 zeigt die entsprechende Westernblot-Analyse. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben. Auch diese Ergebnisse sind ähnlich wie die aus den Abschnitten 3.2.1.3 und 3.2.1.4.

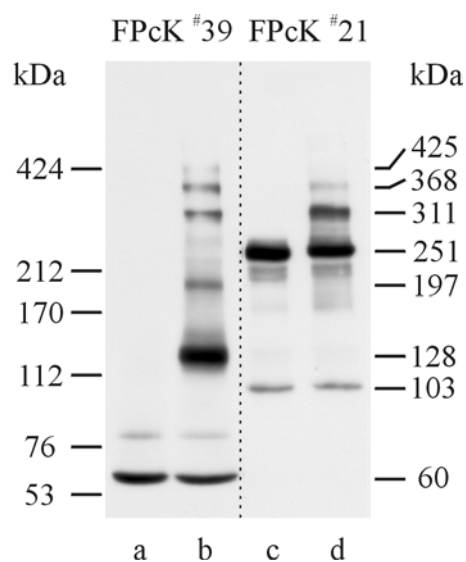


Abb. 16 **Westernblot-Analyse der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen ohne Entfernung der gebundenen Antikörper.** Es wurden die Proben aus Abbildung 15, Spuren a (0 min) und f (20 h Vernetzungszeit) erneut in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Spur a: Kontrolle; Spur b: Vernetzungsprobe; Spur c: dieselbe Kontrolle wie in Spur a; Spur d: dieselbe Vernetzungsprobe wie in Spur b. Der Westernblot wurde zwischen den Spuren b und c getrennt. Die Spuren a und b wurden mit dem A-Antikörper markiert, die Spuren c und d (mit den identischen Proben) wurden mit dem B-Antikörper markiert. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (75 µg Rhodopsin je Spur). Auf der linken Seite des Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Der A-Antikörper markierte Banden bei 425 kDa, 368 kDa, 311 kDa, 197 kDa, 128 kDa (Spur b) und 60 kDa (Spuren a und b). Der B-Antikörper markierte Banden bei 368 kDa, 311 kDa (Spur d) sowie bei 251 kDa (Spuren c und d). Die Vernetzungsbande bei 425 kDa wurde von dem B-Antikörper nur mit äußerst geringer Intensität erkannt da der Antikörper infolge vieler Markierungen sehr schwach geworden war.

Da auch dieser Westernblot die gleichen Vernetzungsprodukte zeigt, die auch in den anderen Experimenten nachgewiesen wurden, sind auch die anderen Markierungen mit dem B-Antikörper bzw. A-Antikörper echt und nicht durch vorhergehende Markierungen mit dem A-Antikörper bzw. B-Antikörper kontaminiert.

### **3.2.1.6 Wie spezifisch ist die thiol-spezifische Vernetzung mit BMDB?**

Obwohl BMDB aufgrund seiner reaktiven Gruppen spezifisch mit Thiolgruppen von Cysteinen reagiert, wird angenommen, dass der pH-Wert, bei dem die Inkubation durchgeführt wird, die Spezifität dieser Reaktion (s. Abb. 5) beeinflussen kann. Nach Hersteller- und Literaturangaben (Wong, 1993) weist die Reaktion mit den Thiolgruppen der Cysteine ihre höchste Spezifität in einem pH-Bereich von 6,5-7,5 auf. Oberhalb dieses pH-Bereiches soll sich die Reaktionsrate mit primären Aminogruppen von Lysinen signifikant erhöhen.

Im Hinblick auf die Affinitätschromatographie (3.4.1), bei der der CNG-Kanal bei einem pH-Wert von 7,4 von der Säule eluiert und die Vernetzung anschließend ebenfalls bei diesem pH-Wert durchgeführt werden sollte, wurde dieser pH-Wert auch für die Vernetzungsexperimente mit dem membranständigen CNG-Kanal zugrunde gelegt. Ein Pufferwechsel nach der Reinigung sollte wegen des zu hohen Proteinverlustes vermieden werden. Da sich der pH-Wert von 7,4 im oberen Grenzbereich des pH-Bereiches befindet, in dem die Reaktion mit Cysteinen spezifisch ist, war die Durchführung von Kontrollexperimenten erforderlich.

Um den eventuellen Einfluss des pH-Wertes auf die thiol-spezifische Vernetzung zu überprüfen, habe ich zwei Versuche durchgeführt. Hierfür wurde das in Abschnitt 3.2.1.3 beschriebene Experiment wiederholt, der pH-Wert des Vernetzungspuffers (EDTA-Na-Hepes) jedoch auf die Werte pH 8,5 (Abb. 17, A und B) bzw. 6,5 (Abb. 17, C und D) eingestellt. Die Westernblot-Analysen der Versuche sind in der nächsten Abbildung gezeigt. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben. In beiden Experimenten traten Banden mit ähnlichem apparenten MG wie bei der thiol-spezifischen Vernetzung bei pH 7,4 auf (vgl. Abb. 14).



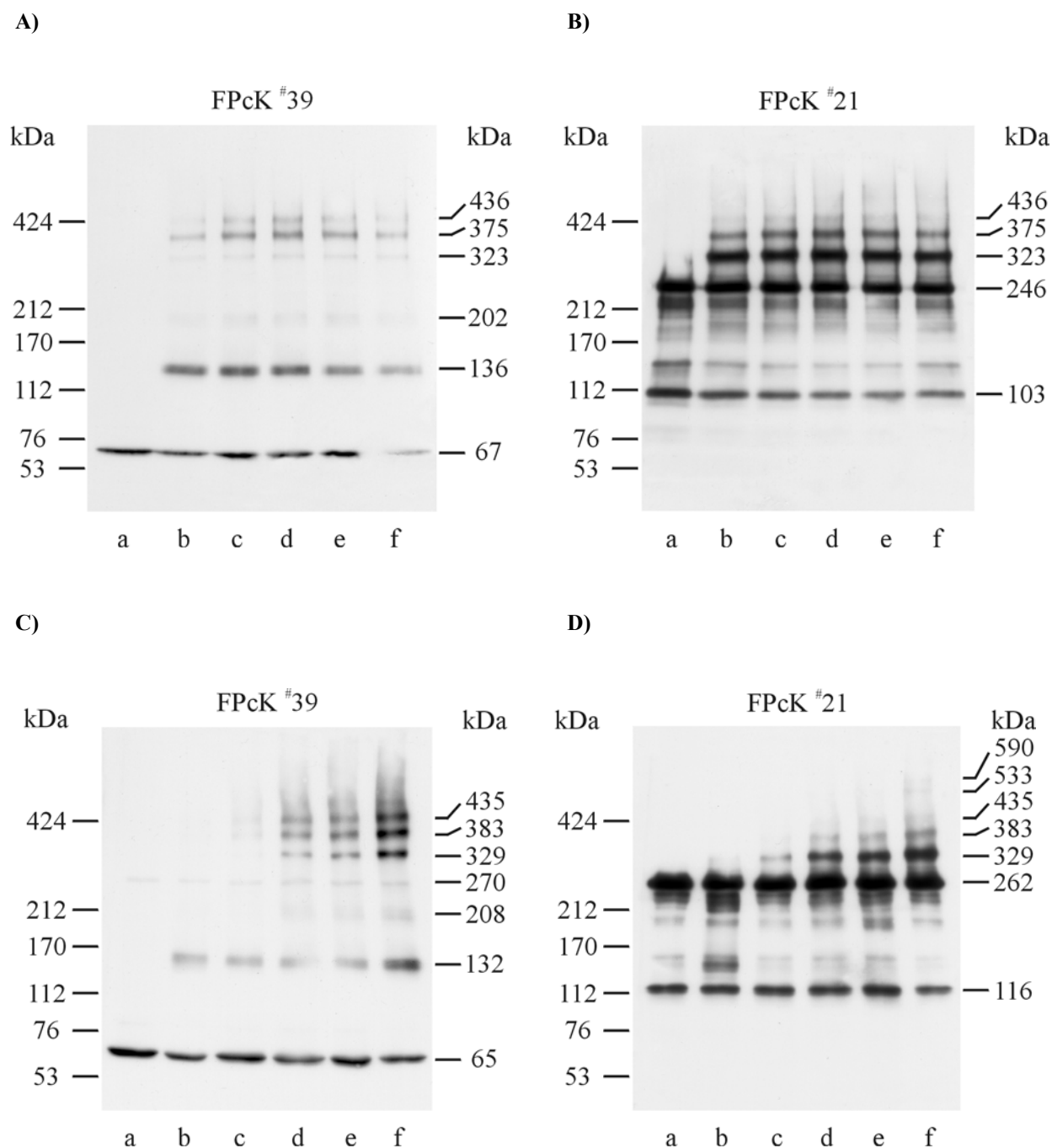


Abb. 17 **Westernblot-Analyse der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen bei den pH-Werten 8,5 (A und B) und 6,5 (C und D).** ROS-Membranen wurden mit NEM behandelt und die CNG-Kanaluntereinheiten in Anwesenheit von 50  $\mu$ M 8-Br-cGMP mit 50  $\mu$ M BMDB vernetzt. Als Kontrolle wurden NEM-behandelte Membranen aufgetragen (Spur a). Folgende Aliquots der Vernetzungsreaktion wurden aufgetragen: 1 h (Spur b), 3 h (Spur c), 5 h (Spur d), 7 h (Spur e) und 20 h (Spur f). Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5%igen Gradientengel (75  $\mu$ g Rhodopsin je Spur). Die Westernblots beider Experimente wurden nacheinander gegen die A-Untereinheit (A bzw. C) und gegen die B-Untereinheit (B bzw. D) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite der Westernblots ist jeweils das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Die Vernetzung bei einem pH-Wert von 8,5 (**A** und **B**) führte zu Vernetzungsprodukten bei 436 kDa, 375 kDa und 323 kDa. Diese Banden wurden sowohl vom A- als auch vom B-Antikörper erkannt und traten bereits nach 1 h Inkubationszeit auf (A und B, Spuren b-f). Darüber hinaus wurden Banden bei 202 kDa, 136 kDa und 67 kDa (A, Spuren a - f) sowie 246 kDa (B, Spuren a - f) markiert.

Die Vernetzung bei einem pH-Wert von 6,5 (**C** und **D**) führte zu Vernetzungsprodukten bei 435 kDa, 383 kDa und 329 kDa. Diese Banden wurden ebenfalls sowohl vom A- als auch vom B-Antikörper erkannt, traten jedoch zeitverzögert nach 5 h Inkubationsdauer auf (C und D, Spuren d-f). Zusätzlich wurden Banden bei 208 kDa, 132 kDa und 65 kDa (C, Spuren a-f) sowie 262 kDa (D, Spuren a-f) markiert. Darüber hinaus detektierte der A-Antikörper eine Bande bei 270 kDa (C, Spuren a-f). Dieses Signal ist jedoch bereits in der Kontrollspur (C, Spur a) vorhanden und ist somit nicht auf die Vernetzung zurückzuführen. Weiterhin detektierte der B-Antikörper zwei Banden schwacher Intensität bei 590 kDa und 533 kDa (D, Spur f). Da diese beiden Banden jedoch nicht auch gleichzeitig von dem A-Antikörper erkannt wurden, handelt es sich hierbei nicht um Vernetzungsbanden zwischen den A- und B-Untereinheiten des CNG-Kanals.

Dieses Experiment zeigt, dass die Vernetzungsprodukte der CNG-Kanaluntereinheiten, die bei einem pH-Wert von 7,4 mit BMDB entstanden sind (Abb. 14) mit den bei anderen pH-Werten entstandenen Vernetzungsprodukten übereinstimmen. Die Tatsache, dass die gleichen Proteinbanden sowohl bei einem pH-Wert von 8,5 als auch bei einem pH-Wert von 6,5 auftraten, zeigt, dass BMDB in dem überprüften pH-Bereich von 6,5 bis 8,5 spezifisch mit Thiolgruppen reagiert. Man kann somit davon ausgehen, dass die Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten mit BMDB hauptsächlich über Cysteine und nicht über Lysine stattfindet. Demzufolge kann ausgeschlossen werden, dass zusätzliche Vernetzungsbanden durch die Verknüpfung von Lysinen entstanden sind. Gleichzeitig unterstützen beide Experimente die von Modell I postulierte Stöchiometrie für den CNG-Kanal (3A-1B), da das apparente MG der detektierten Vernetzungsprodukte mit dem der vorhergesagten Vernetzungsprodukte sehr gut übereinstimmt.

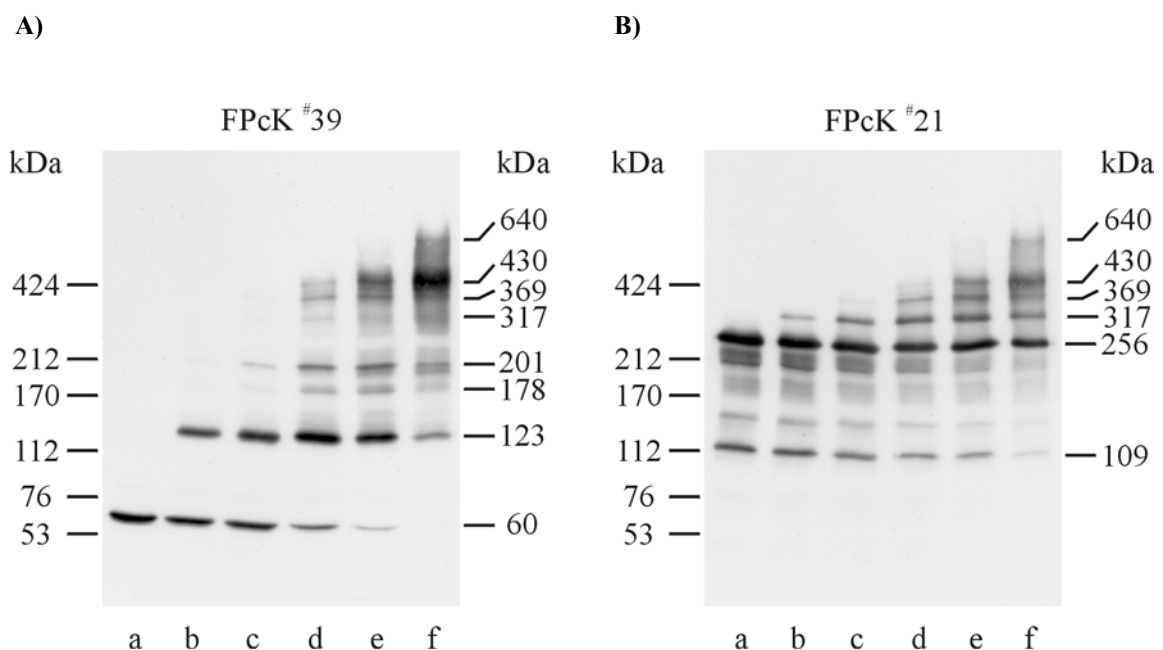
### **3.2.2 Kovalente Vernetzung über die Aminogruppen von Lysinen**

In den bisher beschriebenen Experimenten fand die kovalente Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals über die Thiolgruppen der Cysteine statt. Eine weitere Möglichkeit der kovalenten Vernetzung ist der Einsatz von amino-spezifischen Reagenzien.

Hierbei werden die Amino- ( $\text{NH}_2$ -) Gruppen von primären Amininen, wie sie an der  $\epsilon$ -Position der Lysine zu finden sind, miteinander verknüpft. Da Lysine in der Primärsequenz der Polypeptidketten in wesentlich höherer Anzahl vorkommen als Cysteine, gibt es auch entsprechend mehr Vernetzungsmöglichkeiten. Jedoch ist auch hierbei zu berücksichtigen, dass sich die Aminogruppen nur miteinander vernetzen lassen, sofern sich die Lysine in räumlicher Nähe befinden. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, welche Proteinbanden auch mit einem amino-spezifischen Vernetzungsreagenz entstehen.

### 3.2.2.1 Amino-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen

Die amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals über Lysine wurde mit dem Reagenz  $\text{BS}^3$  durchgeführt. Die Vernetzungsdauer betrug 1, 2, 5, 10 und 30 min. Für dieses Experiment wurden Membranen eingesetzt, die viermal in Anwesenheit von DTT hypotonisch gewaschen worden waren. Die Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals wurden ohne Anwesenheit von 8-Br-cGMP mit  $\text{BS}^3$  vernetzt. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Westernblot-Analyse. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben. Auch diese Ergebnisse sind ähnlich wie die in den Experimenten der thiol-spezifischen Vernetzung (3.2.1.3; 3.2.1.4; 3.2.1.5; 3.2.1.6).



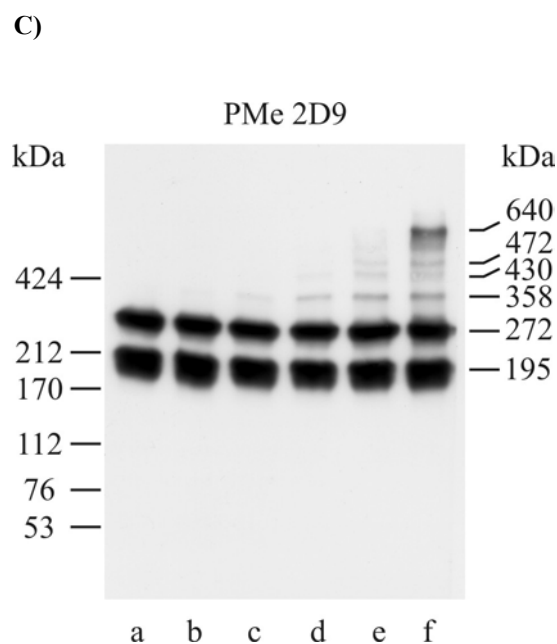


Abb. 18 **Westernblot-Analyse der amino-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen.** Die Kanaluntereinheiten des membranständigen CNG-Kanals wurden mit 0,5 mM BS<sup>3</sup> vernetzt. Als Kontrolle wurden NEM-unbehandelte Membranen aufgetragen (Spur a). Folgende Aliquots der Vernetzungsreaktion wurden aufgetragen: 1 min (Spur b), 2 min (Spur c), 5 min (Spur d), 10 min (Spur e) und 30 min (Spur f). Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (35 µg Rhodopsin je Spur). Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (**A**), gegen die B-Untereinheit (**B**) und gegen den Austauscher (**C**) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite des Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Sowohl der A-Antikörper (**A**) als auch der B-Antikörper (**B**) erkannten Vernetzungsprodukte bei 430 kDa, 369 kDa und 317 kDa (A und B, Spuren d-f). Darüber hinaus erkannte der A-Antikörper Banden bei 201 kDa bzw. 178 kDa, 123 kDa und 60 kDa (A, Spuren a-f) und der B-Antikörper eine Bande bei 256 kDa. (B, Spuren a-f). Die von dem A-Antikörper markierten Banden bei 201 kDa bzw. 178 kDa könnten aufgrund rechnerischer Bestimmung des Molekulargewichts beide das A-Trimer repräsentieren. Möglicherweise wurde aber das A-Dimer teilweise mit einem anderen Protein verknüpft, so dass ein zusätzliches Vernetzungsprodukt entstand. Da die höhermolekularen Proteinbanden bei 430 kDa, 369 kDa und 317 kDa jedoch unverändert waren, war die Vernetzung der beiden Kanaluntereinheiten nicht beeinflusst worden. Demzufolge deutet die zusätzliche Bande, die von dem A-Antikörper erkannt wurde, nicht auf eine weitere A-Untereinheit im Kanalkomplex hin.

Eine weitere bisher nicht beobachtete Vernetzungsbande wurde von beiden Antikörpern bei 640 kDa erkannt (A und B, Spur f). Durch die Markierung des Westernblots gegen den

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher (C) konnte geklärt werden, dass es sich hierbei um das Vernetzungsprodukt zwischen CNG-Kanal und einem Austauschermonomer handelt (3A-1B-1AT). Das apparente MG eines Austauschermonomers liegt bei ca. 250 kDa, so dass die Bande bei 640 kDa auch rechnerisch in etwa der Summe aus 429 kDa für den CNG-Kanal (3A-1B) und ca. 250 kDa einem Austauschermonomer (1AT) entspricht. Weiterhin erkannte der Austauscher-Antikörper Banden schwacher Intensität bei 486 kDa, 444 kDa und 369 kDa (C, Spur f), die jedoch nicht weiter charakterisiert wurden. Die Banden bei 281 kDa und 201 kDa (C, Spuren a-f) entsprachen dem Austauschermonomer (Reiländer et al., 1992) sowie einem proteolytischen Abbauprodukt des Austauschers (Kim et al., 1998).

Mit diesem Experiment, bei dem die Vernetzung über Lysine anstelle von Cysteinen stattgefunden hat, konnte gezeigt werden, dass sich die Untereinheiten nicht nur über Cysteine, sondern auch über Lysine miteinander vernetzen lassen. Dies verdeutlicht die enge räumliche Nachbarschaft der Kontaktomänen beider Untereinheiten. Außerdem konnten Proteinbanden ähnlichen Molekulargewichts markiert werden, wodurch das Modell I der Stöchiometrie des CNG-Kanals (3A-1B) durch ein weiteres Experiment unterstützt wird.

Im Gegensatz zur Vernetzung über Cysteine entstand bei der Vernetzung über Lysine ein zusätzliches Vernetzungsprodukt zwischen CNG-Kanal und Austauschermonomer, das für die Stöchiometrieüberlegungen jedoch nicht von Bedeutung war.

### **3.3 Vernetzung des CNG-Kanals mit anderen Proteinen in ROS-Membranen**

#### **3.3.1 Vernetzung mit dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher**

Nachdem bei der amino-spezifischen Vernetzung der Untereinheiten des CNG-Kanals eine Verknüpfung zwischen CNG-Kanal und dem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher nachgewiesen worden war, sollten die Westernblots der thiol-spezifischen Vernetzung ebenfalls auf diesen möglichen Interaktionspartner hin überprüft werden. Dazu habe ich zwei Westernblots der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-unbehandelten und in NEM-behandelten ROS-Membranen mit dem Antikörper PMe 2D9 gegen den Austauscher markiert. Diese Westernblot-Analysen sind in Abbildung 19 dargestellt. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.

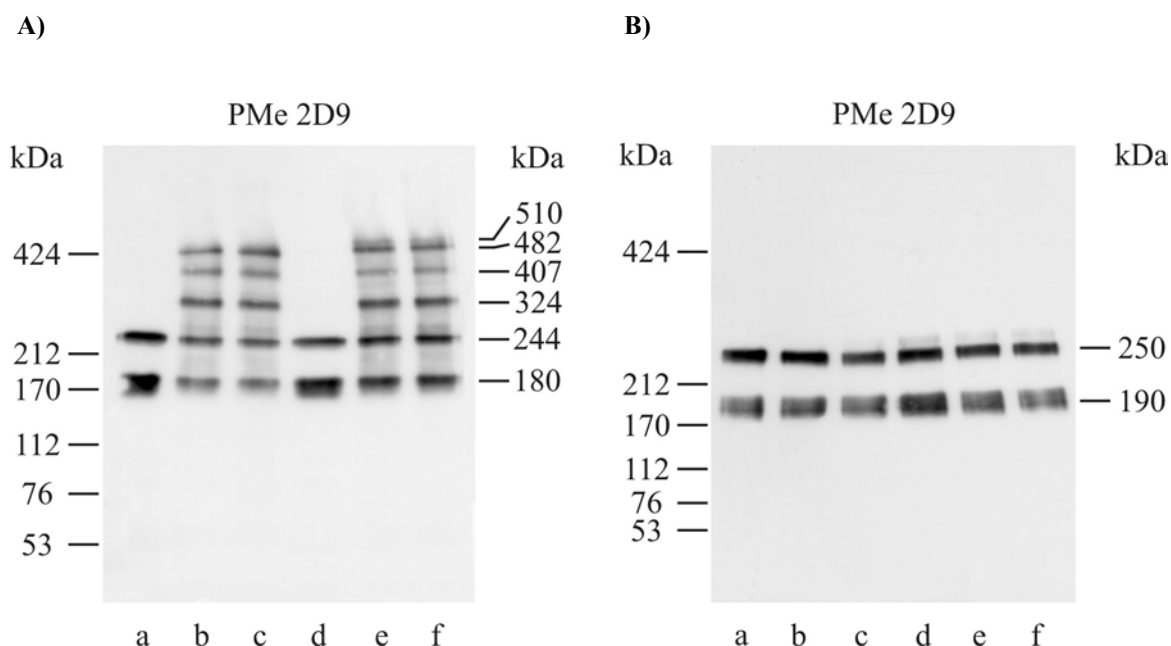


Abb. 19 **Westernblot-Analyse der Antikörpermarkierungen gegen den Austauscher.** **A)** Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-unbehandelten Membranen. Dargestellt ist derselbe Westernblot wie in Abbildung 12 der nach Entfernung gebundener Antikörper (2.7.4) mit dem Antikörper PMe 2D9 gegen den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher markiert wurde. Die Auftragung entspricht der in Abbildung 12: NEM-unbehandelte Membranen (Spuren a und d); Aliquots der Vernetzungsreaktion: 3 h (Spuren b und e) und 7 h (Spuren c und f). **B)** Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten nach NEM-Modifizierung der Membranen. Dargestellt ist derselbe Westernblot wie in Abbildung 14, der nach Entfernung gebundener Antikörper (2.7.4) mit dem Antikörper PMe 2D9 gegen den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher markiert wurde. Die Auftragung entspricht der in Abbildung 14: NEM-behandelte Membranen (Spur a); Aliquots der Vernetzungsreaktion: 1 h (Spur b), 3 h (Spur c), 5 h (Spur d), 7 h (Spur e) und 20 h (Spur f). Auf der linken Seite des Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Abbildung 19 A zeigt den Westernblot der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-unbehandelten Membranen. Die Spuren a bis c zeigen die Vernetzung mit BMDB in Abwesenheit, die Spuren d bis f in Anwesenheit von 8-Br-cGMP. Dargestellt ist derselbe Westernblot wie in Abbildung 12, der nach Entfernung gebundener Antikörper mit dem Antikörper PMe 2D9 gegen den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher markiert wurde. Auf diesem Westernblot wurde in vorhergehenden Markierungen von dem A- und B-Antikörper ein diffuser „Schmier“ im höhermolekularen Bereich nachgewiesen, der nun auf mögliche Vernetzungsprodukte mit dem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher untersucht werden sollte. Vor der Vernetzung wurde das Austauschermonomer bei 244 kDa und ein proteolytisches Abbauprodukt bei 180 kDa nachgewiesen (Spuren a und d). Vernetzungsprodukte traten dann bei 482 kDa, 407 kDa und 324 kDa auf (Spuren b, c, e, f). Diese Banden repräsentieren das Austauscherdimer sowie zwei proteolytische Abbauprodukte. Wurde die thiol-spezifische Vernetzung in Anwesenheit von 8-Br-cGMP durchgeführt, wurden diese Banden ebenfalls nachgewiesen

(Spuren e und f). Allerdings entstand unter dem Einfluss von 8-Br-cGMP eine weitere Vernetzungsbande bei 510 kDa (Spuren e und f), die nicht weiter charakterisiert wurde.

Vergleicht man diese Antikörpermarkierung (Abb. 19) mit den Antikörpermarkierungen desselben Westernblots gegen die Kanaluntereinheiten (vgl. Abb. 12), so waren keine Banden nachweisbar, die sowohl von dem Antikörper gegen den Austauscher als auch von einem der Antikörper gegen die Kanaluntereinheiten erkannt wurden. Im Gegensatz zur amino-spezifischen Vernetzung (vgl. Abb. 18) hat bei der thiol-spezifischen Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals keine Vernetzung zwischen Kanal und Austauscher stattgefunden. Stattdessen trat eine Vernetzungsbande zwischen zwei Austauschermomeren (482 kDa) auf. Dies deutet darauf hin, dass in NEM-unbehandelten Membranen Kanal und Austauscher nur über Lysine, nicht aber über Cysteine miteinander vernetzbar sind. Die Vernetzung über Cysteine führt hingegen unter diesen Versuchsbedingungen bevorzugt zu Verknüpfungen zwischen Austauschermomeren.

Abbildung 19 **B** zeigt den Westernblot der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten nach NEM-Behandlung der Membranen. Die Spuren a bis f zeigen die thiol-spezifische Vernetzung in Anwesenheit von 8-Br-cGMP zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 5, 7 und 20 h. Dargestellt ist derselbe Westernblot wie in Abbildung 14, der nach Entfernung gebundener Antikörper mit dem Antikörper PMe 2D9 gegen den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - $\text{K}^+$ -Austauscher markiert wurde. Auf diesem Westernblot wurden in vorhergehenden Markierungen von dem A- und B-Antikörper trennscharfe Vernetzungsbanden zwischen den beiden Untereinheiten des CNG-Kanals nachgewiesen (vgl. Abb. 14). Die Antikörpermarkierung gegen den Austauscher sollte klären, ob diese Vernetzungsbanden möglicherweise auch den Austauscher enthalten.

Der Antikörper gegen den Austauscher zeigt eine Proteinbande bei 250 kDa, die dem Austauschermonomer entspricht, sowie eine Bande bei 190 kDa, die dem proteolytischen Fragment des Austauschers entspricht. Eine Vernetzungsbande zwischen CNG-Kanal und Austauscher wäre aufgrund des Molekulargewichts der einzelnen Untereinheiten (63 kDa für die A-Untereinheit des CNG-Kanals und 250 kDa für den Austauscher) bei mindestens 310 kDa zu erwarten gewesen. Eine Bande auf dieser Höhe wurde hier jedoch nicht nachgewiesen. Da bei NEM-modifizierten Membranen (B), im Gegensatz zu NEM-unbehandelten Membranen (A), keine Vernetzungsprodukte zwischen Austauschermomeren auftraten, lässt sich schlussfolgern, dass die NEM-Modifizierung der Membranen, bei der alle zugänglichen Thiolgruppen der Membranproteine alkyliert werden, die Vernetzung zwischen den Austauschermomeren verhindert. Eine Vernetzung zwischen Kanal und Austauscher war in beiden Westernblot-Analysen nicht nachweisbar (A und B).

### 3.3.2 Vernetzung mit Peripherin-2

Von Poetsch et al. (2001) wurde über eine thiol-spezifische Interaktion zwischen der B-Untereinheit des CNG-Kanals und Peripherin-2, einem Protein in der Diskmembran, berichtet. Diese Interaktion trat bei der Vernetzung in hypotonisch gewaschenen Membranen auf. Unter Berücksichtigung dieses Aspekts habe ich den Westernblot der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-unbehandelten Membranen (vgl. Abb. 12 bzw. Abb. 19 A) gegen Peripherin-2 markiert. Da weiterhin die amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten bereits eine Interaktion zwischen Kanal und einem weiteren Protein, dem Austausch, gezeigt hat (vgl. Abb. 18), habe ich auch diesen Westernblot mit dem Antikörper mRDS gegen Peripherin-2 markiert. Beide Westernblot-Analysen sind in Abbildung 20 dargestellt. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.

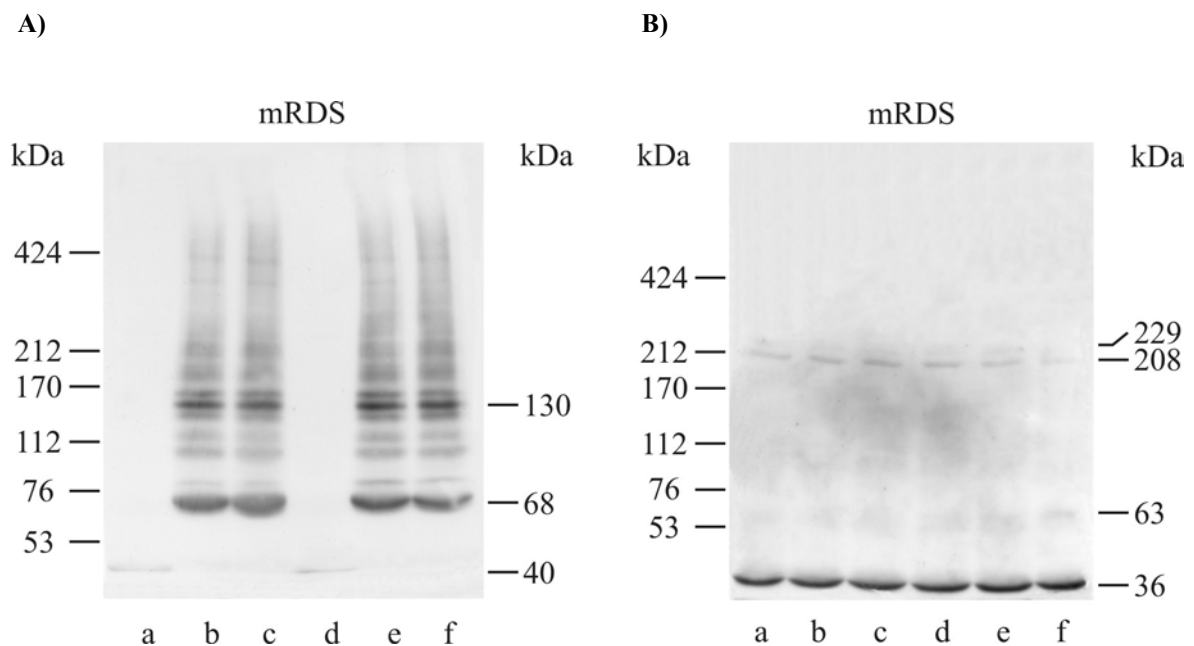


Abb. 20 **Westernblot-Analyse der Antikörpermarkierungen gegen Peripherin-2.** **A)** Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-unbehandelten Membranen; Dargestellt ist derselbe Westernblot wie in Abbildung 12 der nach Entfernung gebundener Antikörper (2.7.4) mit dem Antikörper mRDS gegen Peripherin-2 markiert wurde. Die Auftragung entspricht der in Abbildung 12: NEM-unbehandelte Membranen (Spuren a und d); Aliquots der Vernetzungsreaktion: 3 h (Spuren b und e) und 7 h (Spuren c und f). **B)** Amino-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen; Dargestellt ist derselbe Westernblot wie in Abbildung 18, der nach Entfernung gebundener Antikörper (2.7.4) mit dem Antikörper mRDS gegen Peripherin-2 markiert wurde. Die Auftragung entspricht der in Abbildung 18: NEM-unbehandelte Membranen (Spur a); Aliquots der Vernetzungsreaktion: 1 min (Spur b), 2 min (Spur c), 5 min (Spur d), 10 min (Spur e) und 30 min (Spur f). Auf der linken Seite der Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.



Abbildung 20 **A** zeigt den Westernblot der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-unbehandelten Membranen. Die Spuren a bis c zeigen die Vernetzung mit BMDB in Abwesenheit, die Spuren d bis f in Anwesenheit von 8-Br-cGMP. Dargestellt ist derselbe Westernblot wie in Abbildung 12, der nach Entfernung gebundener Antikörper mit dem Antikörper mRDS gegen Peripherin-2 markiert wurde. Auf diesem Westernblot wurde bei der Markierung mit dem B-Antikörper im höhermolekularen Bereich ein diffuser „Schmier“ mit drei schwachen Banden bei 343 kDa, 289 kDa und 258 kDa nachgewiesen (vgl. Abb. 12, B)

Die Antikörpermarkierung gegen Peripherin-2 (**A**) wies eine hohe Anzahl unspezifischer Vernetzungsprodukte über den gesamten Trennbereich des Gels auf. Eindeutig nachgewiesen wurden nur zwei Vernetzungsprodukte bei 130 kDa und 68 kDa (Spuren b, c, e, f). Wahrscheinlich beruhen diese Banden auf einer Verknüpfung zwischen Peripherin-2-Molekülen untereinander oder zwischen Peripherin-2 und dem ROM-1-Komplex (Loewen & Molday, 2000). Eine weitere Bande schwacher Intensität wurde bei 40 kDa detektiert. Sie repräsentiert das Peripherin-2-Monomer (Poetsch et al., 2001). Obwohl der Antikörper gegen das Peripherin-2 eine Vielzahl von Vernetzungsbanden erkannte, war keine Identifizierung dieser Banden als Vernetzungsprodukt zwischen der B-Untereinheit des CNG-Kanals und dem Peripherin-2 möglich. Ursache für die Vielzahl von Vernetzungsprodukten scheint eine starke Oligomerisierung des Peripherin-2 oder eine starke Vernetzung mit anderen Interaktionspartnern zu sein.

Abbildung 20 **B** zeigt den Westernblot der amino-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen. Die Spuren a bis f zeigen Aliquots der Vernetzungsreaktion, die mit BS<sup>3</sup> durchgeführt wurde. Dargestellt ist derselbe Westernblot wie in Abbildung 18, der nach Entfernung der gebundenen Antikörper mit dem Antikörper mRDS gegen Peripherin-2 markiert wurde. In dieser Analyse wurde hauptsächlich das Monomer des Peripherin-2 bei 36 kDa erkannt (D, Spuren a - f). Banden sehr schwacher Intensität wurden bei 229 kDa und 208 kDa erkannt (Spuren a - f). Eine genaue Identifizierung dieser Banden war nicht möglich. Da sie jedoch bereits in der Kontrolle (Spur a), d.h. vor Zugabe des Vernetzungsreagenzes vorhanden sind, kann es sich hierbei nicht um Vernetzungsprodukte handeln. Die Bande bei 63 kDa (Spuren c - f) repräsentiert hingegen eine Verknüpfung zwischen zwei Peripherin-2-Molekülen untereinander oder zwischen Peripherin-2 und dem ROM-1-Komplex. Die Westernblot-Analyse zeigt, dass die amino-spezifische Vernetzung der Kanaluntereinheiten unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zu Vernetzungsprodukten zwischen CNG-Kanal und Peripherin-2 führt.

### **3.4 Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten des gereinigten Kanals**

Bei der kovalenten Vernetzung der Proteine in den ROS-Membranen besteht die Möglichkeit, dass die CNG-Kanaluntereinheiten auch mit anderen Proteinen verknüpft werden können. Obwohl die Reaktion durch die Behandlung der Membranen mit NEM sehr spezifisch ist und die apparenten MG der entstandenen Vernetzungsprodukte gut mit den apparenten MG der von Stöchiometrie-Modell I vorhergesagten Vernetzungsprodukte korrelieren, ist es auch denkbar, dass diese Proteinbanden Vernetzungsprodukte zwischen CNG-Kanaluntereinheiten und anderen Proteinen darstellen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, sollte der CNG-Kanal zunächst solubilisiert und aus den ROS-Membranen gereinigt werden. Entstehen bei der kovalenten Vernetzung des solubilisierten Kanals die gleichen Vernetzungsprodukte wie bei den Vernetzungsexperimenten in ROS-Membranen, so lässt sich eine Beteiligung anderer Proteine ausschließen.

#### **3.4.1 Reinigung des nativen CNG-Kanals aus Stäbchenaußensegmenten (ROS) durch CaM-Affinitätschromatographie**

Der CNG-Kanal aus Sehstäbchenaußensegmenten wurde affinitätschromatographisch über eine CaM-Sephrose-Säule gereinigt (2.10). Das Säulenuelat wurde in Fraktionen gesammelt, Aliquots der Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt (2.3) und mit Coomassie-Blau gefärbt (2.6). Abbildung 21 zeigt das Ergebnis dieser Färbung, bei der zwei Proteinbanden bei dem apparenten MG von 62 kDa und 230 kDa auftraten (Spuren b-i). Aus Westernblot-Analysen ist bekannt, dass das 62 kDa-Protein die A-Untereinheit und das 230 kDa-Protein die B-Untereinheit des CNG-Kanals sind. Die Färbung zeigt, dass das Eluat der CaM-Säule neben diesen beiden Kanaluntereinheiten nur ganz geringe Mengen anderer Proteine enthält (Spuren b und c). Dies könnten andere CaM-bindende Proteine sein, die mit geringerer Affinität an die Säule binden und deshalb zu Beginn der Elution von der Säule eluiert werden. Sie wurden in den nachfolgenden Fraktionen nicht mehr nachgewiesen (Spuren d - i). Das Ergebnis verdeutlicht den hohen Reinheitsgrad des Kanalproteins, da insbesondere in Fraktionen, die einige Minuten nach Beginn der Elution gesammelt wurden (Spuren d - i), keine anderen Proteine als die beiden Kanaluntereinheiten nachgewiesen wurden.

Auf der linken Seite des Polyacrylamidgels ist das apparente MG der HMW-Markerproteine, auf der rechten Seite das der gefärbten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.

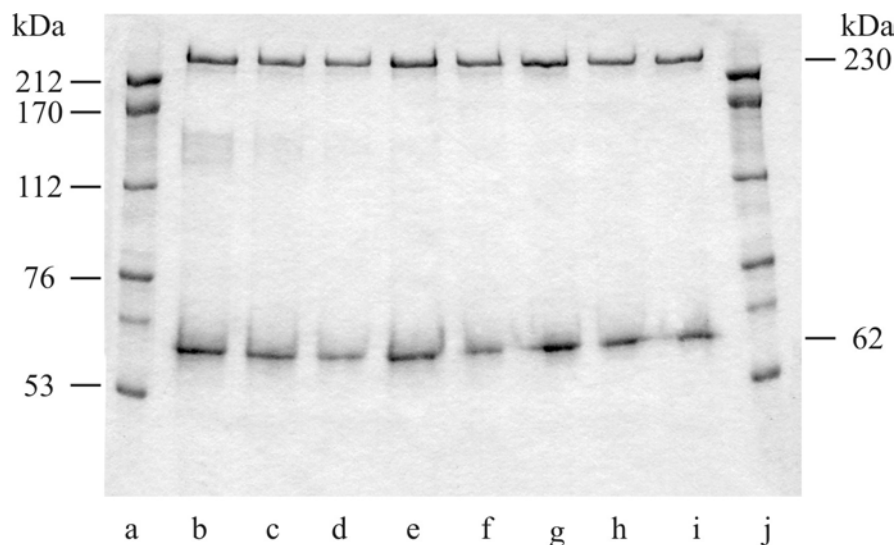


Abb. 21 **Coomassie-Blaufärbung von Proteinen aus Sechstäbchenaußensegmenten, die durch CaM-Affinitätschromatographie gereinigt wurden.** Aliquots der gesammelten Fraktionen des Säuleneluats (0,5 µg gereinigtes Kanalprotein je Spur) wurden in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Spuren b-i). Die Spuren a und j enthalten den HMW-Größenstandard. Auf der linken Seite der Abbildung ist das apparente MG der HMW-Markerproteine, auf der rechten Seite das der gefärbten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

### 3.4.2 Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten des solubilisierten und gereinigten Kanals

Wie das Ergebnis der Reinigung des CNG-Kanals durch CaM-Affinitätschromatographie zeigt (Abb. 21), wurden bei diesem Vorgang alle anderen Membranproteine weitgehend entfernt. Somit standen bei der Vernetzung der beiden Kanaluntereinheiten keine anderen Proteine als mögliche Interaktionspartner zur Verfügung. Eine NEM-Behandlung zur Absättigung zugänglicher Thiolgruppen war deshalb nicht erforderlich.

Für dieses Experiment wurde der solubilierte (2.10.1) und gereinigte CNG-Kanal (2.10.2) nach Aktivierung durch 8-Br-cGMP mit dem thiol-spezifischen Reagenz BMDB vernetzt. Die Inkubationszeit betrug 10, 20, 30 und 60 min. Die Westernblot-Analyse wurde mit dem A-Antikörper UED 7D3 und dem B-Antikörper FPcK #52 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Auch diese Westernblots zeigen ähnliche Banden wie die thiol- und die amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten in ROS-Membranen. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.

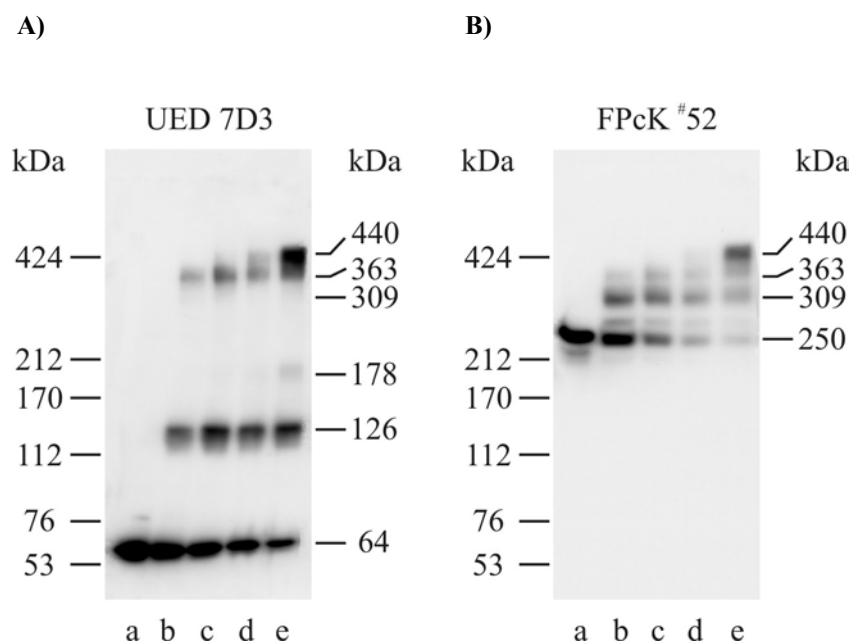


Abb. 22 **Westernblot-Analyse der thiol-spezifischen Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals.** Die Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals wurden in Anwesenheit von 200  $\mu$ M 8-Br-cGMP mit 5  $\mu$ M BMDB vernetzt. Als Kontrolle wurden hypotonisch gewaschene Membranen aufgetragen (Spur a). Folgende Aliquots der Vernetzungsreaktion wurden aufgetragen: 10 min (Spur b), 20 min (Spur c), 30 min (Spur d) und 60 min (Spur e). Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (0,3  $\mu$ g gereinigtes Kanalprotein je Spur). Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (**A**) und gegen die B-Untereinheit (**B**) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite der Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Der A-Antikörper (**A**) erkannte die Bande des A-Monomers bei 64 kDa (Spur a). Die Intensität dieser Bande nimmt im Verlauf der Vernetzungsreaktion deutlich ab. Die Bande des A-Dimers bei 126 kDa ist schon nach 10 min deutlich zu erkennen (Spur b), die Bande des A-Trimers bei 178 kDa wird hingegen erst nach 60 min sichtbar (Spur e). Nach 10-minütiger Inkubation sind außerdem eine sehr schwache Bande bei 309 kDa und eine etwas stärkere Bande bei 363 kDa zu erkennen (Spur b). Diese beiden Banden repräsentieren das Vernetzungsprodukt zwischen einer A- und einer B-Untereinheit (1A-1B) sowie zwischen zwei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit (2A-1B). Nach 30 min Inkubationsdauer tritt außerdem das Endprodukt der Vernetzung (3A-1B) bei 440 kDa auf (Spur d).

Der B-Antikörper (**B**) erkannte das B-Monomer bei 250 kDa (Spur a). Die Intensität dieser Bande nimmt im Verlauf der Vernetzungsreaktion immer weiter ab (Spuren b - e). Nach 10-minütiger Inkubation tritt das Vernetzungsprodukt bei 309 kDa auf (Spur b), dessen Bande mit zunehmender Vernetzungsdauer wieder an Intensität verliert (Spuren c - e), vermutlich da dieses Vernetzungsprodukt (1A-1B) weiter vernetzt wird. Nach 20 min ist das Vernetzungsprodukt 2A-

1B bei 363 kDa zu erkennen (Spur c) und nach 60 min ist die Intensität des Vernetzungsproduktes 3A-1B bei 440 kDa am größten (Spur e). Zusätzlich wurde vom B-Antikörper eine schwache Bande über dem B-Monomer (Spuren b - e) erkannt. Diese Bande wurde jedoch nicht gleichzeitig auch vom A-Antikörper erkannt, so dass es sich nicht um ein zusätzliches Vernetzungsprodukt handeln kann. Vermutlich kommt sie durch eine intramolekulare Vernetzung zustande (vgl. Abb. 10). Die Tatsache, dass beispielsweise die Bande bei 309 kDa von dem A-Antikörper nur äußerst schwach markiert wurde, deutet darauf hin, dass in diesem Zwischenprodukt die Antikörperbindestelle teilweise maskiert wurde („Epitop-Maskierung“).

Die kovalente Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals zeigt, dass die gleichen Proteinbanden markiert wurden, selbst wenn alle anderen möglichen Interaktionspartner durch die Reinigung entfernt worden waren. Das Experiment ist somit eine weitere Unterstützung für das Stöchiometrie-Modell I, welches drei A-Untereinheiten und eine B-Untereinheit (3A-1B) für die Zusammensetzung des CNG-Kanals postuliert. Da das Bandenmuster auch in diesem Experiment nachweisbar war, zeigt dies weiterhin, dass der CNG-Kanal auch nach der Reinigung in solubilisierter Form weitgehend in seinem nativen Zustand vorliegt.

### **3.4.3 Amino-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten des solubilisierten und gereinigten Kanals**

Die Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals wurden auch amino-spezifisch mit BS<sup>3</sup> vernetzt. Die Inkubationszeit betrug 1, 2, 5, 10 und 30 min. Die Westernblot-Analyse wurden mit dem A-Antikörper UED 7D3 und dem B-Antikörper FPcK #52 durchgeführt. Das Resultat dieses Experiments ist in Abbildung 23 dargestellt. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben. Auch diese Ergebnisse sind ähnlich wie die bei dem Experiment zuvor (vgl. Abb. 22).

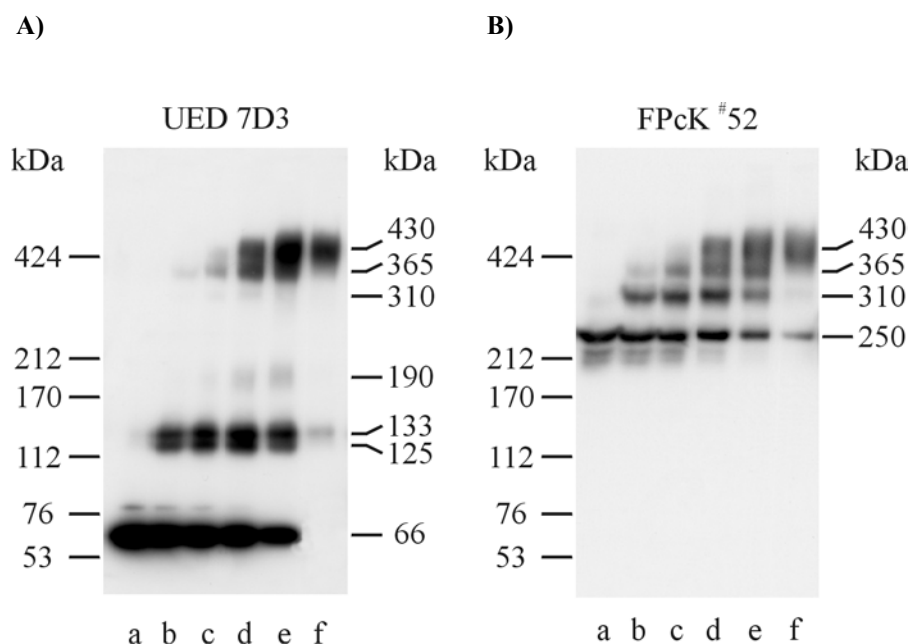


Abb. 23 **Westernblot-Analyse der amino-spezifischen Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals.** Die Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals wurden mit 0,5 mM BS<sup>3</sup> vernetzt. Als Kontrolle wurden hypotonisch gewaschene Membranen aufgetragen (Spur a). Folgende Aliquots der Vernetzungsreaktion wurden aufgetragen: 1 min (Spur b), 2 min (Spur c), 5 min (Spur d), 10 min (Spur e) und 30 min (Spur f). Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (0,3 µg gereinigtes Kanalprotein je Spur). Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (A) und gegen die B-Untereinheit (B) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite der Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Der A-Antikörper (A) erkannte das A-Monomer bei 66 kDa (Spur a). Die Intensität dieser Bande nimmt im Verlauf der Vernetzungsreaktion deutlich ab (Spuren b - f) bis sie vollständig verschwindet (Spur f). Das A-Dimer bei 125 kDa bzw. 133 kDa ist bereits nach 1 min Inkubationsdauer deutlich als Doppelbande zu erkennen (Spur b). Die Intensität der A-Dimerbande nimmt erst zu (Spuren c - e) und anschließend wieder ab (Spur f), vermutlich da dieses Vernetzungsprodukt weiter vernetzt wird. Das A-Trimer bei 190 kDa wird nach 2-minütiger Inkubation erst schwach (Spur c), dann nach 5- bzw. 10-minütiger Inkubation stärker erkannt (Spuren d und e). Diese Bande verschwindet nach 30-minütiger Inkubation vollständig (Spur f), da auch dieses Vernetzungsprodukt vermutlich weiter vernetzt wird. Außerdem sind schon nach 1 min Inkubationsdauer schwache Banden bei 310 kDa und 365 kDa sichtbar (Spur b). Diese beiden Banden stellen die Vernetzungsprodukte zwischen einer A- und einer B-Untereinheit (1A-1B) sowie zwischen zwei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit (2A-2B) dar. Nach 30-minütiger Inkubation ist die Bande 1A-1B bei 310 kDa vermutlich aufgrund der

Weitervernetzung verschwunden (Spur f). Nach 5-minütiger Inkubationsdauer tritt außerdem das Endprodukt der Vernetzung (3A-1B) bei 430 kDa auf (Spur d).

Der B-Antikörper (**B**) erkannte das B-Monomer bei 250 kDa (Spur a). Die Intensität dieser Bande nimmt im Verlauf der Vernetzungsreaktion immer weiter ab (Spuren b - f). Nach 10-minütiger Inkubation tritt das Vernetzungsprodukt 1A-1B bei 310 kDa auf (Spur b), dessen Bande mit zunehmender Vernetzungsdauer wieder an Intensität verliert (Spuren b-e) und nach 30 min weitgehend ganz verschwindet (Spur f), da es wahrscheinlich weiter vernetzt wird. Nach 2 min ist das Vernetzungsprodukt 2A-1B bei 365 kDa zu erkennen (Spur c) und nach 5 min ist das Endprodukt 3A-1B sichtbar (Spur d).

Dieses Experiment zeigt, dass auch durch die amino-spezifischen Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals die gleichen Proteinbanden entstanden. Somit stellt dieses Experiment eine weitere Unterstützung für das Stöchiometrie-Modell I (3A-1B) dar.

### **3.5 Analyse der Spaltprodukte von thiol-spezifisch vernetzten CNG-Kanaluntereinheiten (zweidimensionale SDS-PAGE)**

Um die bisher gewonnenen Hinweise auf die Stöchiometrie des CNG-Kanals zu erhärten, sollten die Vernetzungsprodukte wieder gespalten und ihre resultierenden Spaltprodukte in einer 2D-SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die Analyse sollte wiederum auf dem Westernblot erfolgen. Hierfür wurden die Kanaluntereinheiten des membranständigen CNG-Kanals thiol-spezifisch mit BMDB vernetzt (2.13.1.1). Die Inkubationsdauer betrug 5 h. Die Vernetzungsprodukte wurden in der ersten Dimension einer SDS-PAGE aufgetrennt (75 µg Rhodopsin). Dann wurde die Gelspur, die die unvernetzten A- und B-Untereinheiten sowie die Vernetzungsprodukte enthielt, ausgeschnitten und die darin enthaltenen Vernetzungsprodukte gespalten (2.14). Um die Spaltprodukte in der zweiten Dimension einer SDS-PAGE aufzutrennen, wurde die Gelspur horizontal auf ein zweites Gel montiert. Die Auftrennung der Spaltprodukte in der zweiten Dimension erfolgte - wie in der ersten Dimension der SDS-PAGE - nach der Größe der Untereinheiten. Proteine, die in einer 2D-SDS-PAGE aufgetrennt werden, sind im Westernblot nicht in Form von länglichen, sondern in Form von kugelförmigen Banden oder „Punkten“ nachweisbar. In den beiden folgenden Tabellen sind die Vernetzungsprodukte, ihre jeweiligen Spaltprodukte und die Banden aufgeführt, die aufgrund der Spaltprodukte in der zweiten Dimension zu erwarten waren (Tabelle 5: Nachweis durch den A-Antikörper; Tabelle 6:

Nachweis durch den B-Antikörper). In den Tabellen sind auch die unvernetzten Untereinheiten berücksichtigt.

Tab. 5 **Spaltung thiol-spezifisch vernetzter CNG-Kanaluntereinheiten: Nachweis durch den A-Antikörper.** Vernetzungsprodukte, zugehörige Spaltprodukte und erwartete Banden der Spaltprodukte in der zweiten Dimension einer SDS-PAGE

Vernetzungsprodukt	3A-1B	2A-1B	1A-1B	3A	2A	1A
Spaltprodukt(e)	B +	B +	B +	A	A	A
Nachweis durch den A-Antikörper (kDa) in der zweiten Dimension	63	63	63	63	63	63

Tab. 6 **Spaltung thiol-spezifisch vernetzter CNG-Kanaluntereinheiten: Nachweis durch den B-Antikörper.** Vernetzungsprodukte, zugehörige Spaltprodukte und erwartete Banden der Spaltprodukte in der zweiten Dimension einer SDS-PAGE

Vernetzungsprodukt	3A-1B	2A-1B	1A-1B	1B
Spaltprodukt(e)	B +	B +	B +	B
Nachweis durch den B-Antikörper (kDa) in der zweiten Dimension	240	240	240	240

Abbildung 24 zeigt die Westernblot-Analyse der Spaltprodukte. Derselbe Westernblot wurde nacheinander mit dem Antikörper gegen die A-Untereinheit und die B-Untereinheit markiert. Um die Spaltprodukte den Vernetzungsbanden zuordnen zu können, werden die Vernetzungsprodukte schematisch über dem Westernblot der zweiten Dimension aufgeführt. Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der HMW-Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.



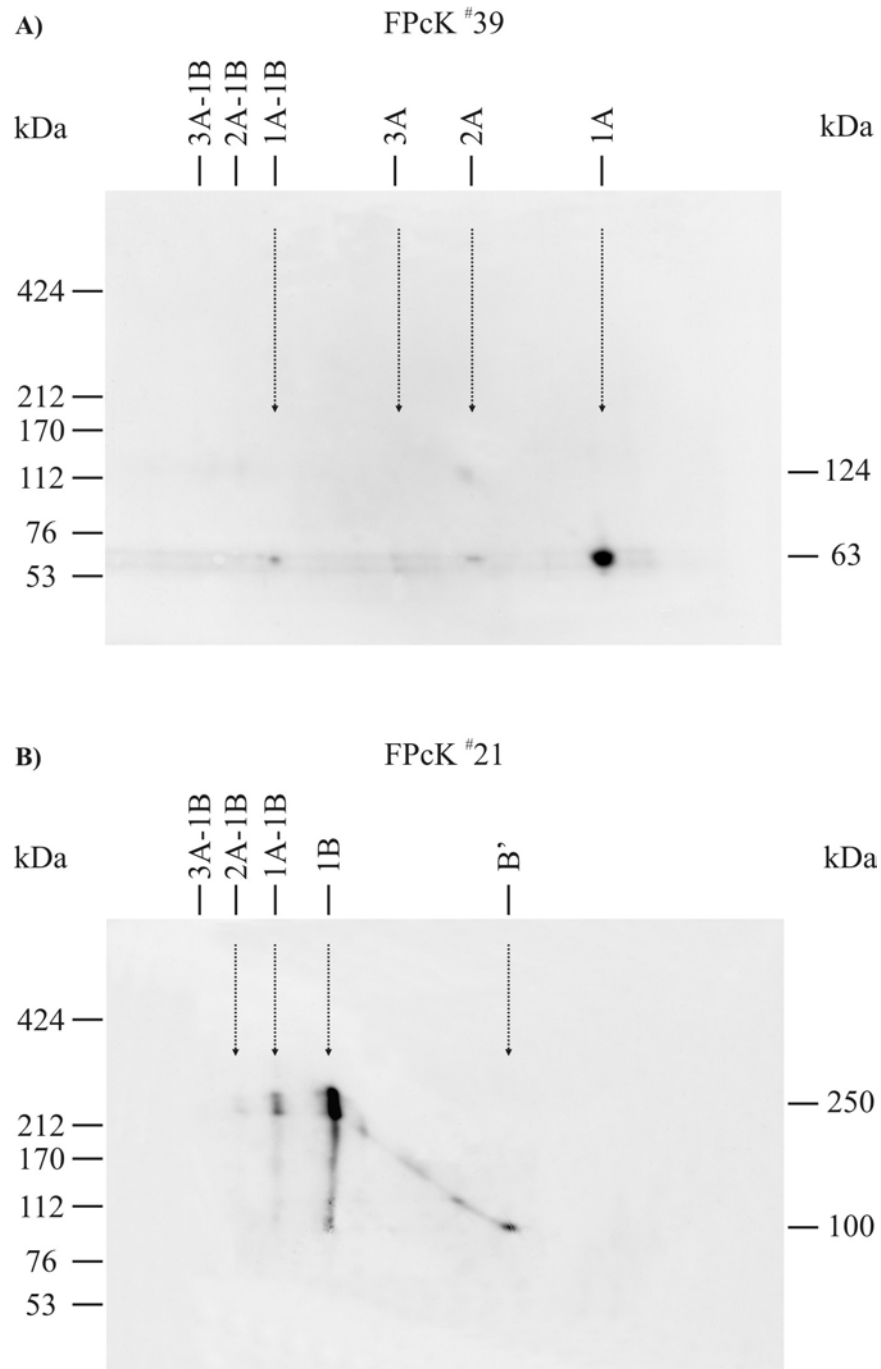


Abb. 24

**Westernblot-Analyse der Spaltprodukte von thiol-spezifisch vernetzten CNG-Kanaluntereinheiten.** ROS-Membranen wurden mit NEM behandelt und die Untereinheiten des CNG-Kanals in Anwesenheit von 50  $\mu$ M 8-Br-cGMP mit 50  $\mu$ M BMDB vernetzt. Die Inkubationszeit betrug 5 h. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel (75  $\mu$ g Rhodopsin). Die Gelspur wurde ausgeschnitten und die Vernetzungsprodukte im Gel gespalten (2.14). Anschließend wurde sie horizontal auf ein zweites Gel montiert und die Spaltprodukte der Vernetzung ihrer Größe nach in der zweiten Dimension der SDS-PAGE aufgetrennt. Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (**A**) und gegen die B-Untereinheit (**B**) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite der Westernblots ist das apparente MG der HMW-Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Mit Hilfe des A-Antikörpers (**A**) ließen sich auf dem Westernblot einige „Proteinpunkte“ markieren. Am deutlichsten ist der Punkt des A-Monomers, das auch in der zweiten Dimension bei 63 kDa zu finden ist. Schwache Punkte des A-Monomers bei 63 kDa sind außerdem in den Spaltprodukten von 2A, 3A und 1A-1B zu erkennen. Von den Vernetzungsprodukten 3A-1B und 2A-1B ließ sich keine A-Untereinheit als Spaltprodukt nachweisen. In der Spur des A-Dimers wurde neben der Bande bei 63 kDa (A-Monomer) auch noch ein Proteinpunkt bei 124 kDa markiert. Hierbei handelt es sich um das A-Dimer, das offenbar nicht vollständig gespalten wurde.

Der B-Antikörper (**B**) erkannte auch nur wenige Proteinpunkte. Am deutlichsten ist der Punkt des B-Monomers, das wieder bei 250 kDa zu erkennen ist. Der Punkt bei 100 kDa repräsentiert die Spleißvariante bzw. das Abbauprodukt der B-Untereinheit. Die Diagonale zeigt die Abbauprodukte der B-Untereinheit, die von dem Antikörper FPcK #21 in vorhergehenden Westernblot-Analysen ebenfalls erkannt wurden (vgl. Abb. 14). Diese Abbauprodukte sind für die Vernetzung der Kanaluntereinheiten jedoch nicht von Bedeutung und spielen auch in der Analyse in der 2D-SDS-PAGE keine Rolle. Deutlich markieren ließ sich auch das B-Monomer nach Spaltung des Vernetzungsproduktes 1A-1B. Nach Spaltung des Vernetzungsproduktes 2A-1B ließ sich ein sehr schwacher Proteinpunkt markieren. Kein Spaltprodukt ist hingegen bei dem Vernetzungsprodukt 3A-1B nachzuweisen.

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass nur von einem einzigen Vernetzungsprodukt zwischen A- und B-Untereinheit(en) die Zusammensetzung in der 2D-SDS-PAGE aufgeklärt werden konnte. So konnten nur die Spaltprodukte der Vernetzungsbande 1A-1B als A- und B-Untereinheiten nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung weiterer höhermolekularer Vernetzungsbanden konnte hingegen nicht aufgeklärt werden. Der B-Antikörper erkannte zwar die B-Untereinheit als Spaltprodukt von 2A-1B, die A-Untereinheit wurde hier als Spaltprodukt jedoch nicht nachgewiesen. Ursache für die fehlenden Nachweise ist sehr wahrscheinlich, dass zu wenig Protein in der ersten Dimension aufgetragen wurde. Dies könnte in Kombination mit einer unvollständigen Spaltung der Vernetzungsprodukte dazu geführt haben, dass nicht genügend Protein für den Antikörpernachweis der Spaltprodukte vorhanden war.

Obwohl nicht alle Spaltprodukte der Vernetzungsbanden nachgewiesen wurden, stellt dieses Experiment insofern eine positive Tendenz dar, als dass die Zusammensetzung von einem A-B-Vernetzungsprodukt mit dieser Methode eindeutig aufgeklärt werden konnte. Der Nachweis der Spaltprodukte ist insgesamt jedoch schwach. Zusätzlich wurde das A-Dimer in der zweiten Dimension nachgewiesen, was auf eine unvollständige Spaltung der Vernetzungsprodukte

hindeutet. Diese beiden Aspekte lassen vermuten, dass sich das Experiment optimieren lässt, indem man in der ersten Dimension mehr Protein auf das Gel aufträgt. Auf diese Weise stünde mehr Protein für die Spaltung zur Verfügung und die Wahrscheinlichkeit, Spaltprodukte im Westernblot nachweisen zu können, würde sich erhöhen.

### 3.6 Anreicherung des vernetzten Kanals

Um eine größere Menge des vernetzten CNG-Kanals auf ein Polyacrylamidgel auftragen zu können, sollten die Untereinheiten des membranständigen CNG-Kanals mit BMDB vernetzt (2.13.1.1) und der vernetzte Kanal über Ionenaustausch-Chromatographie (2.14) angereichert werden. Das Eluat der Chromatographie wurde umgepuffert und entsalzt (2.15.2) und anschließend konzentriert (2.15.3). Die Gelspur wurde mit 9,3 µg angereichertem Kanalprotein beladen. Abbildung 25 zeigt die Westernblot-Analyse der Antikörpermarkierung gegen die A-Untereinheit (A), gegen die B-Untereinheit (B) und gegen den Austauscher (C). Auf der linken Seite eines jeden Westernblots ist das apparente MG der Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton angegeben.

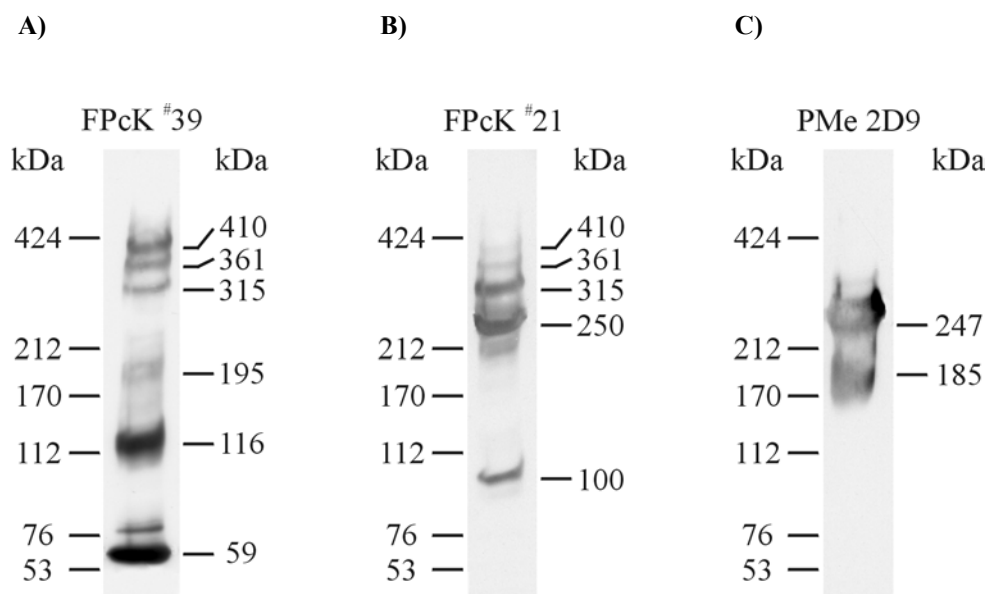


Abb. 25 **Westernblot-Analyse der thiol-spezifisch vernetzten CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen nach Anreicherung über Ionenaustausch-Chromatographie.** ROS-Membranen wurden mit NEM behandelt und die CNG-Kanaluntereinheiten in Anwesenheit von 50 µM 8-Br-cGMP mit 50 µM BMDB vernetzt. Die Vernetzungszeit betrug 5 h. Es wurden 9,3 µg des angereicherten Proteins in der Spur aufgetragen. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 3,5-7,5 %igen Gradientengel. Derselbe Westernblot wurde nacheinander gegen die A-Untereinheit (A), gegen die B-Untereinheit (B) und gegen den Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup>-Austauscher (C) markiert. Gebundene Antikörper wurden zwischen den Markierungen entfernt (2.7.4). Auf der linken Seite der Westernblots ist das apparente MG der HMW-Markerproteine, auf der rechten Seite das der detektierten Proteinbanden in Kilo-Dalton (kDa) angegeben.

Sowohl der A- als auch der B-Antikörper erkannten die drei Vernetzungsbanden bei 410 kDa, 361 kDa und 315 kDa (A und B). Weiterhin erkannte der A-Antikörper Banden bei 195 kDa, 116 kDa und 59 kDa (A). Der B-Antikörper erkannte eine weitere Bande bei 250 kDa (B). Die Markierung gegen den Austauschere zeigt noch einmal, dass unter diesen Bedingungen keine Vernetzung zwischen CNG-Kanal und  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher nachweisbar war (C).

Das Experiment zeigt, dass eine Anreicherung des vernetzten Kanals durch Ionenaustausch-Chromatographie ohne Einfluss auf die Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten möglich ist. Somit sind die Voraussetzungen für eine Optimierung der 2-dimensionalen SDS-PAGE erfüllt. Das bedeutet, dass mehr Kanalprotein für die Spaltung der Vernetzungsprodukte im Gel und die zweidimensionale SDS-PAGE zur Verfügung steht. Man kann demzufolge erwarten, dass sich unter optimierten Bedingungen die Spaltprodukte immunologisch besser nachweisen lassen, und somit zukünftig die Stöchiometrie des nativen CNG-Kanals mit einer weiteren biochemischen Methode untersucht werden kann.

### **3.7 Zusammenfassung**

Der zyklisch Nukleotid-gesteuerte (CNG-) Kanal aus dem Sehtäbchen ist ein Heterooligomer, der aus A- und B-Untereinheiten zusammengesetzt ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untereinheiten des membranständigen und des solubilisierten CNG-Kanals unter verschiedenen Bedingungen und mit unterschiedlichen Vernetzungsreagenzien kovalent miteinander vernetzt und immunologisch mit Antikörpern nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen ein reproduzierbares, charakteristisches Bandenmuster der Vernetzung, welches Hinweise auf die Stöchiometrie des nativen CNG-Kanals liefert.

In der folgenden Tabelle werden die Mittelwerte und Standardabweichungen des apparenten Molekulargewichts für jedes detektierte Vernetzungsprodukt zwischen den CNG-Kanaluntereinheiten mit dem in Stöchiometrie-Modell I vorhergesagten Molekulargewicht der Vernetzungsprodukte verglichen. Zusätzlich ist aufgeführt, welches Vernetzungsprodukt von dem A-Antikörper und welches von dem B-Antikörper markiert wurde. Die Gesamtzahl der ausgewerteten Vernetzungsexperimente beläuft sich auf 23.

Tab. 7 **Mittelwerte und Standardabweichungen des apparenten Molekulargewichts (MG) für jedes Vernetzungsprodukt in Kilo-Dalton (kDa).** Weiterhin angegeben sind die Distanzen ( $\Delta$ ) zwischen den einzelnen Vernetzungsprodukten, die Werte des apparenten Molekulargewichts, die von Modell I für die Vernetzungsprodukte vorhergesagt wurden und die Detektion der Vernetzungsprodukte durch die beiden Antikörper. Es wurden 23 Vernetzungsexperimente ausgewertet (n = 23).

Vernetzungsprodukt	MG (kDa)	$\Delta$ (kDa)	Modell I (kDa)	A-Antikörper	B-Antikörper
3A-1B	429 $\pm$ 11	61	429	+	+
2A-1B	368 $\pm$ 10		366	+	+
1A-1B	312 $\pm$ 10	56	303	+	+
1B	245 $\pm$ 11	67	240	-	+
3A	193 $\pm$ 10	52	189	+	-
2A	122 $\pm$ 10	71	126	+	-
1A	61 $\pm$ 4	61	63	+	-

Aus folgenden Gründen stimmen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit dem Modell I (3A-1B) zur Stöchiometrie des nativen CNG-Kanals, jedoch nicht mit Modell II (2A-2B) überein:

- 1) Der A-Antikörper detektierte sechs, der B-Antikörper vier Proteinbanden. Nach Modell II hätten von beiden Antikörpern jeweils sechs Proteinbanden detektiert werden müssen.
- 2) Das apparente Molekulargewicht der höchsten Bande (Endprodukt) wurde bei einem mittleren Wert von 429 kDa beobachtet; eine Bande bei 606 kDa, die das von Modell II vorhergesagte Endprodukt darstellt, wurde hingegen nicht beobachtet.
- 3) Die Distanzen zwischen den oberen drei Banden, die vom A-Antikörper detektiert wurden sind 61 kDa und 54 kDa. Diese Werte weisen jeweils auf eine zusätzliche A-Untereinheit hin. Eine Distanz, die auf eine zusätzliche B-Untereinheit schließen lässt, wurde nicht beobachtet.
- 4) Die Zusammensetzung der Vernetzungsprodukte, die allein aufgrund ihres MG möglicherweise falsch interpretiert worden wäre, konnte durch Antikörpermarkierungen eindeutig identifiziert werden. Die Vernetzungsprodukte 3A-1B bei ca. 429 kDa und 3A bei ca. 193 kDa ließen sich den von Modell I vorhergesagten Vernetzungsprodukten zuordnen. Hingegen traten keine von Modell II vorhergesagten Vernetzungsprodukte mit zwei B-Untereinheiten bei 606 kDa (2A-2B), 545 kDa (1A-2B) und 480 kDa (2B) auf.

Die Ergebnisse liefern deutliche Hinweise darauf, dass der native CNG-Kanal aus dem Sehstäbchen von Rindernetzhäuten ein Tetramer ist und sich aus drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit zusammensetzt.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untereinheiten des membranständigen sowie des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals aus Rindersehstäbchen mit zwei verschiedenen bifunktionellen Vernetzungsreagenzien kovalent miteinander vernetzt. Vernetzte und unvernetzte Kanaluntereinheiten wurden immunologisch mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und ihr apparentes Molekulargewicht exakt bestimmt. Die Aufklärung der Zusammensetzung der CNG-Kanaluntereinheiten sowie ihre Anordnung im Kanalprotein sind von besonderem Interesse, da jede Untereinheit einen wichtigen Beitrag für die funktionellen Eigenschaften des nativen CNG-Kanals leistet. Bisher wurde die Stöchiometrie der CNG-Kanaluntereinheiten nur mit elektrophysiologischen Methoden an heterolog exprimierten Kanälen untersucht. Die Resultate dieser Untersuchungen sind zudem kontrovers. Deshalb war es erforderlich, die Stöchiometrie und die Anordnung der Untereinheiten mit einer anderen methodischen Vorgehensweise zu untersuchen. Durch die Methode der kovalenten Vernetzung in Verbindung mit dem immunologischen Nachweisverfahren und der Molekulargewichtsbestimmung konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals die Stöchiometrie des nativen CNG-Kanals aus Sehstäbchen biochemisch aufgeklärt werden.

### 4.1 Voraussetzungen für eine kovalente Vernetzung

Um Untereinheiten in einem Proteinkomplex erfolgreich über Vernetzungsreagenzien miteinander verknüpfen zu können, müssen sowohl das Reagenz als auch die zu vernetzenden Proteinuntereinheiten verschiedene Voraussetzungen erfüllen.

#### *Voraussetzungen, die das Vernetzungsreagenz erfüllen muss*

Damit ein Vernetzungsreagenz zwei Interaktionspartner miteinander verknüpfen kann, muss es über zwei reaktive Gruppen verfügen, d.h. es muss bifunktionell sein. Die beiden reaktiven Gruppen sind über einen Abstandsarm miteinander verbunden, der je nach Vernetzungsreagenz zwischen 0,3 nm und 2 nm lang ist. Durch die Länge des Abstandarms wird die mögliche Entfernung zwischen den zu vernetzenden Aminosäuren bestimmt. Mit solchen Reagenzien kann man unter anderem Molekulargewicht und Quartärstruktur von Proteinen, die aus mehreren Polypeptidketten bestehen, bestimmen. Vernetzungsreagenzien können homo- oder heterobifunktionell sein, je nachdem, ob sie zwei gleiche oder zwei unterschiedliche reaktive Gruppen besitzen. Mit homobifunktionellen Reagenzien können verschiedene Interaktionspartner über

zwei identische Gruppen miteinander vernetzt werden. Verfügt ein Interaktionspartner jedoch nicht über eine für das homobifunktionelle Reagenz geeignete Aminosäure oder ist sie räumlich nicht erreichbar, so können heterobifunktionelle Reagenzien eingesetzt werden. Diese haben den Vorteil, zwei unterschiedliche Aminosäuren auf den Interaktionspartnern markieren zu können und auf diese Weise eine Vernetzung zu ermöglichen.

Eine weitere Voraussetzung für ein gutes Vernetzungsreagenz ist eine hohe Selektivität für möglichst nur einen Aminosäuretyp. Reagiert ein Vernetzungsreagenz unselektiv auch mit anderen Aminosäuren, so erhöht sich Anzahl der Vernetzungsmöglichkeiten. Diese können zu einer Vielzahl an Vernetzungsprodukten führen, die sich in einer SDS-Polyacrylamidelektrophorese unter Umständen nicht mehr trennscharf auflösen lassen und nachfolgende Charakterisierungen erschweren. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten mit dem Reagenz 1,4-bismaleidyl-2,3-dihydroxybutan (BMDB) durchgeführt. BMDB gehört, ebenso wie das N-Ethylmaleimid (NEM), das zur Absättigung zugänglicher Thiolgruppen eingesetzt wurde, zur Gruppe der Maleimide. Maleimide haben den Vorteil, außerordentlich selektiv mit Cysteinen zu reagieren. Reaktionen der Maleimide mit Tyrosinen, Methioninen und Histidinen, wie sie beispielsweise bei dem Thiolgruppen-Modifizierungsreagenz Iodacetamid auftreten, können weitgehend ausgeschlossen werden (Wong, 1993). Auch das für die amino-spezifische Vernetzung verwendete Bis(Sulfosuccinimidyl)suberat ( $BS^3$ ) gehört zu den sehr selektiven Reagenzien. Aufgrund seiner reaktiven Gruppen wird es den Succinimiden zugeordnet.  $BS^3$  reagiert ausschließlich mit primären Aminogruppen, wie sie in Polypeptiden nur an der  $\epsilon$ -Position der Lysine und am N-Terminus einer Polypeptidkette zu finden sind. Sowohl die funktionelle Gruppe der Cysteine als auch die der Lysine weist eine sehr hohe chemische Reaktivität auf, die für die nukleophile Reaktion mit den Vernetzungsreagenzien relevant ist. Demzufolge eignen sich thiol-spezifische bzw. amino-spezifische Vernetzungsreagenzien mit hoher Selektivität, wie beispielsweise BMDB bzw.  $BS^3$ , besonders gut für die Vernetzung von Cysteinen bzw. Lysinen.

#### *Voraussetzungen, die die zu vernetzenden Proteinuntereinheiten erfüllen müssen*

Auch die zu vernetzenden Proteinuntereinheiten müssen verschiedenen Voraussetzungen erfüllen, um miteinander verknüpft werden zu können. Dazu gehört beispielsweise die Zugänglichkeit der Aminosäuren, deren funktionelle Gruppen mit dem Vernetzungsreagenz reagieren sollen. Liegt eine sterische Hinderung der Aminosäuren vor, so kann es passieren, dass sie nur sehr schwer bzw. überhaupt nicht für das Reagenz zugänglich sind. Darüber hinaus müssen sich die

funktionellen Gruppen der vernetzbaren Aminosäuren in enger räumlicher Nähe befinden. Der Abstand, den die Aminosäuren dabei voneinander haben dürfen, wird durch die Länge des Abstandsarms im Vernetzungsreagenz bestimmt.

Für den immunologischen Nachweis der Vernetzungsprodukte im Westernblot ist es notwendig, dass die Bindestelle des Antikörpers auch nach der Vernetzungsreaktion noch intakt und zugänglich ist. Eine solche „Epitop-Maskierung“ würde nämlich dazu führen, dass Vernetzungsprodukte in der Westernblot-Analyse möglicherweise nicht erkannt würden. Daraus würde sich dann eine fehlerhafte Interpretation der Resultate ergeben. Um diese Möglichkeit weitgehend auszuschließen, wurden in dieser Arbeit sowohl Vernetzungsreagenzien mit unterschiedlicher Selektivität als auch Antikörper mit unterschiedlichen Bindestellen verwendet.

## **4.2 Thiol-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen**

Die CNG-Kanaluntereinheiten verfügen über sehr wenig Cysteine in ihren Polypeptidketten. So weist die Primärsequenz der A-Untereinheit nur 6 Cysteine auf. Davon befinden sich drei Cysteine in transmembranalen Segmenten, die höchstwahrscheinlich nicht zugänglich sind und deshalb für die Vernetzungsreaktion keine Rolle spielen. Die Primärsequenz der B-Untereinheit weist 15 Cysteine auf. Davon befinden sich fünf in transmembranalen Segmenten. Somit stehen höchstwahrscheinlich für die Vernetzungsreaktion der Kanaluntereinheiten nur drei Cysteine der A-Untereinheit und zehn Cysteine der B-Untereinheit zur Verfügung. Diese geringe Anzahl vernetzbarer Cysteine birgt die Gefahr, dass möglicherweise bei einer thiol-spezifischen Vernetzungsreaktion nicht alle im Kanalkomplex vorhandenen Untereinheiten miteinander verknüpft werden. Andererseits hat eine Vernetzung über Cysteine jedoch den Vorteil einer sehr hohen Spezifität, eben weil nur so wenige Cysteine für die Reaktion zur Verfügung stehen.

Das erste Vernetzungsexperiment, bei dem die CNG-Kanaluntereinheiten in der ROS-Membran thiol-spezifisch miteinander verknüpft wurden (Abb. 12), führte zwar zu identifizierbaren Vernetzungsprodukten zwischen den A-Untereinheiten, jedoch waren in diesem Experiment keine spezifischen Vernetzungsprodukte zwischen den A-Untereinheiten und der B-Untereinheit zu beobachten. Sowohl der A- als auch der B-Antikörper markierten im höhermolekularen Bereich, wo die Vernetzungsprodukte zwischen den beiden Untereinheiten erwartet wurden, lediglich einen diffusen „Schmier“. Ursache für diesen „Schmier“ ist vermutlich die Entstehung von vielen verschiedenen Vernetzungsprodukten zwischen den beiden Kanaluntereinheiten mit



anderen räumlich eng benachbarten Proteinen, die ebenfalls über vernetzbare Cysteine verfügen. Hierbei könnte beispielsweise das Peripherin-2, ein Protein in der Diskmembran, von Bedeutung sein. Poetsch et al. (2001) fanden in ROS-Membranen eine Interaktion zwischen dem GARP-Teil der B-Untereinheit und Peripherin-2, die auf eine thiol-spezifische Verknüpfung zurückzuführen war. Möglicherweise unterbinden diese Verknüpfungen mit anderen Proteinen die Vernetzung der beiden Kanaluntereinheiten miteinander. Denkbar ist aber auch, dass die Verknüpfung der beiden Kanaluntereinheiten durch die räumliche Nähe anderer Interaktionspartner lediglich eingeschränkt wird. Somit wäre eine Vernetzungsbande zwischen den A-Untereinheiten und der B-Untereinheit in dem höhermolekularen „Schmier“ zwar vorhanden, jedoch aufgrund der vielen anderen Vernetzungsbanden und zu geringer Intensität nicht als trennscharfe Bande nachweisbar. Um dies zu überprüfen musste man einerseits verhindern, dass andere Interaktionspartner an der Vernetzungsreaktion teilnehmen können, andererseits musste man versuchen, die Effizienz der Vernetzung zwischen den beiden Kanaluntereinheiten zu erhöhen.

Eine gute Möglichkeit, Cysteine abzusättigen, ist die Inkubation mit dem thiol-spezifischen Modifizierungsreagenz N-Ethylmaleimid (NEM). Die NEM-Modifizierung von ROS-Membranen führt zur Alkylierung aller freien Thiolgruppen von Cysteinen des CNG-Kanals und der anderen Membranproteine, so dass diese Cysteine für eine Vernetzung nicht mehr zur Verfügung stehen. Wurde die thiol-spezifische Vernetzung der Kanaluntereinheiten nach NEM-Behandlung der Membranen durchgeführt, so traten im höhermolekularen Bereich trennscharfe Vernetzungsbanden anstelle des diffusen „Schmiers“ auf (Abb. 13). Jetzt konnten spezifische Vernetzungsprodukte zwischen den A-Untereinheiten und der B-Untereinheit nachgewiesen werden. Daraus kann man schlussfolgern, dass durch die NEM-Modifizierung viele Interaktionen der Kanaluntereinheiten mit anderen Membranproteinen weitgehend verhindert werden und somit der Nachweis der Interaktion zwischen den beiden Kanaluntereinheiten nun möglich ist. Dieses Ergebnis zeigt allerdings auch, dass nicht alle vorhandenen Cysteine der CNG-Kanaluntereinheiten für das Modifizierungsreagenz zugänglich sind. Die Cysteine, die für die Vernetzung der Untereinheiten verantwortlich sind, werden durch NEM scheinbar nicht alkyliert. Möglicherweise sind diese Cysteine für das Modifizierungsreagenz aufgrund sterischer Hinderung im Kanalkomplex nicht erreichbar.

Die Effizienz der Vernetzung zwischen den A-Untereinheiten und der B-Untereinheit des Kanals konnte in diesem Experiment außerdem durch die Anwesenheit von 8-Br-cGMP deutlich gesteigert werden. Bereits die thiol-spezifische Vernetzung in NEM-unbehandelten Membranen

hatte Hinweise darauf geliefert, dass die Entstehung der Vernetzungsprodukte zwischen den A-Untereinheiten durch die Anwesenheit von 8-Br-cGMP begünstigt worden war. (Abb. 12). Bei der Vernetzung in NEM-behandelten Membranen hatte die Anwesenheit von 8-Br-cGMP ebenfalls einen Einfluss auf die Vernetzungsreaktion. So traten bei Anwesenheit von 8-Br-cGMP Vernetzungsbanden sowohl in höhere Anzahl als auch mit höherer Intensität auf (Abb. 13). Diese Vernetzungsbanden konnten als Vernetzungsprodukte zwischen den A-Untereinheiten und der B-Untereinheit des CNG-Kanals identifiziert werden. Offenbar werden durch die Anwesenheit des Liganden Konformationsänderungen im CNG-Kanal induziert, wodurch Cysteine zugänglicher werden und für das Vernetzungsreagenz besser erreichbar sind.

Tatsächlich konnten mehrere Studien zeigen, dass die Bindung von 8-Br-cGMP ein bestimmtes Cystein der A-Untereinheit zugänglicher macht. Dabei handelt es sich um das Cystein 481, das sich unmittelbar vor der cGMP-Bindestelle auf der C-Linker-Region befindet (Serre et al., 1995; Gordon et al., 1997; Brown et al., 1998; Zheng & Zagotta, 2000; Rosenbaum & Gordon, 2002). Es ist durchaus denkbar, dass dieses Cystein auch für die Verknüpfung von zwei Kanaluntereinheiten verantwortlich ist. Für eine Verknüpfung von insgesamt drei A-Untereinheiten mit einer B-Untereinheit müssen jedoch mindestens zwei Cysteine auf der A-Untereinheit zugänglich sein. Die 8-Br-cGMP-induzierte Konformationsänderung in der cGMP-Bindestelle zieht weitere Konformationsänderungen nach sich, die schließlich zum Öffnen des CNG-Kanals führen. Es ist daher möglich, dass zwei weitere Cysteine, die in der Primärsequenz der A-Untereinheit in der Nähe des Cysteins 481 liegen, ebenfalls an der Vernetzungsreaktion beteiligt sind. So könnte das Cystein 505, das sich innerhalb der cGMP-Bindestelle befindet, und/oder das Cystein 573, das C-terminal der cGMP-Bindestelle liegt, durch die 8-Br-cGMP-induzierte Konformationsänderung zugänglicher werden und die Vernetzung weiterer Kanaluntereinheiten ermöglichen. Auch die B-Untereinheit verfügt über ein Cystein unmittelbar vor der cGMP-Bindestelle. Dieses befindet sich an Position 1080 und stellt das zu dem Cystein 481 korrespondierende Cystein der A-Untereinheit dar. Da sich das Cystein 1080 der B-Untereinheit ebenfalls auf einer C-Linker-Region befindet, könnte es auch infolge der Konformationsänderung zugänglicher werden und eine Vernetzung ermöglichen. Darüber hinaus könnte das Cystein 1104 der B-Untereinheit, das sich innerhalb der cGMP-Bindestelle und in unmittelbarer Nähe zum Cystein 1080 befindet, ebenso wie das Cystein 505 der A-Untereinheit, bei der Vernetzung eine Rolle spielen.

Die verhältnismäßig schlechte Zugänglichkeit der Cysteine wurde bei der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-behandelten Membranen sehr deutlich:

Obwohl die Vernetzung in Anwesenheit von 8-Br-cGMP durchgeführt wurde, war eine relativ lange Inkubationsdauer (1 h) für die Verknüpfung der A-Untereinheiten mit der B-Untereinheit erforderlich. Dies deutet darauf hin, dass die an der Vernetzung beteiligten Cysteine, trotz 8-Br-cGMP-Anwesenheit, nicht sehr gut zugänglich sind. Die Tatsache, dass die Kanaluntereinheiten jedoch trotz der geringen Anzahl verfügbarer Cysteine miteinander vernetzt wurden, unterstreicht dagegen die hohe Spezifität dieser thiol-spezifischen Vernetzungsreaktion.

### **4.3 Der native CNG-Kanal aus Sehstäbchen besteht aus drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit**

#### *Kovalente Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen*

Unter Ausdehnung der Inkubationszeiten von 1 h auf 3, 5, 7 bzw. 20 h konnte bei der thiol-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in NEM-behandelten ROS-Membranen eine Vernetzung aller im Kanalkomplex vorhandenen Untereinheiten erreicht und das Endprodukt nachgewiesen werden (Abb. 14). Das Ergebnis dieses Experiments zeigt ein Bandenmuster, das aus folgenden Gründen mit den in Stöchiometrie-Modell I (3A-1B) vorhergesagten Vernetzungsprodukten übereinstimmt:

In diesem Bandenmuster wurden, in Übereinstimmung mit Modell I, von sieben markierten Proteinbanden drei sowohl von dem A- als auch von dem B-Antikörper erkannt (3A-1B, 2A-1B, 1A-1B). Von den vier weiteren Banden wurden drei ausschließlich von dem A-Antikörper (3A, 2A, 1A) und eine ausschließlich von dem B-Antikörper erkannt (1B). Auch die apparenten Molekulargewichte der Vernetzungsbanden stimmen mit denen der vorhergesagten Vernetzungsprodukte gut überein. Das Endprodukt der Vernetzung wurde bei 443 kDa beobachtet und liegt somit nahe bei dem von Modell I (3A-1B) vorhergesagten Wert von 429 kDa. Eine Proteinbande, die nach Modell II (2A-2B) das Endprodukt bei 606 kDa hätte zeigen sollen, wurde nicht beobachtet. Darüber hinaus entsprach die Differenz zwischen den Molekulargewichten der drei höchsten Vernetzungsprodukte (3A-1B, 2A-1B, 1A-1B) jeweils dem Molekulargewicht einer zusätzlichen A-Untereinheit, nicht jedoch dem einer zusätzlichen B-Untereinheit. Schließlich zeigt die Westernblot-Analyse Vernetzungsprodukte, die drei A-Untereinheiten beinhalten und ausschließlich von Modell I vorhergesagt worden waren (3A-1B und 3A). Nach Stöchiometrie-Modell II (2A-2B) hätten diese Vernetzungsbanden nicht auftreten dürfen. Stattdessen hätten jedoch Vernetzungsbanden mit zwei B-Untereinheiten nachweisbar sein müssen. Die Ergebnisse zeigen aber, dass keine Vernetzungsprodukte nachweisbar sind, die auf die Anwesenheit von zwei B-Untereinheiten schließen lassen (2A-2B, 1A-2B und 2B).

Die oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die Kriterien für das Stöchiometrie-Modell I (3A-1B) von dem Vernetzungsexperiment erfüllt werden. Darüber hinaus entspricht die erwartete elektrophoretische Mobilität der Vernetzungsprodukte der Summe der Einzelkomponenten. Somit kann man schlussfolgern, dass sich der native CNG-Kanal aus Sechstäbchen aus drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit zusammensetzt.

Diese Aussage wird in der vorliegenden Arbeit durch ein weiteres Ergebnis unterstützt, da die amino-spezifische Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen ebenfalls zur Entstehung dieses Bandenmusters führte (Abb. 18). Somit wird die von Stöchiometrie-Modell I postulierte Untereinheitenzusammensetzung von 3A-1B durch einen weiteren experimentellen Ansatz bestätigt.

Das Ergebnis der amino-spezifischen Vernetzung bestätigt außerdem die Tatsache, dass bereits bei der thiol-spezifischen Vernetzung alle im Kanalkomplex vorhandenen Untereinheiten spezifisch verknüpft wurden. Es bestand die Vermutung, dass aufgrund der geringen Anzahl vernetzbarer Cysteine möglicherweise nicht alle im CNG-Kanal vorhandenen Untereinheiten miteinander vernetzt werden können. Lysine befinden sich im Gegensatz zu Cysteinen in wesentlich höherer Anzahl in der Primärsequenz der beiden Untereinheiten, wodurch sich die Anzahl der Vernetzungsmöglichkeiten stark erhöht. Dennoch entstanden bei der amino-spezifischen Vernetzung keine Vernetzungsprodukte, die auf weitere Kanaluntereinheiten hindeuteten. Trotz der hohen Anzahl an Vernetzungsmöglichkeiten wurden bei der Vernetzung über Lysine nur zwei zusätzliche Proteinbanden markiert, die bei der thiol-spezifischen Vernetzung nicht beobachtet worden waren. Eine davon ist nachweislich auf die Verknüpfung zwischen CNG-Kanal und einem Monomer des  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (3A-1B-AT) zurückzuführen. Die andere Bande entstand vermutlich durch Verknüpfung des A-Dimers mit einem weiteren, nicht identifizierten Protein. Da diese zusätzlich auftretende Bande aber nicht die Vernetzung der beiden Kanaluntereinheiten beeinflusste, deutet sie nicht auf eine weitere A-Untereinheit hin.

Eine Absättigung von freien Aminogruppen, ähnlich der thiol-spezifischen NEM-Modifizierung, war bei der amino-spezifischen Vernetzung in ROS-Membranen nicht notwendig. Das Ergebnis zeigt, dass die Vernetzungsprodukte zwischen den beiden Kanaluntereinheiten als trennscharfe Banden nachweisbar waren, obwohl sich bei der Vernetzung andere mögliche Interaktionspartner in räumlicher Nähe befanden. Diese hatten bei der thiol-spezifischen Vernetzung eine Verknüpfung der A-Untereinheiten mit der B-Untereinheit eingeschränkt bzw. verhindert. Offenbar begünstigt jedoch die hohe Anzahl der Lysine die Vernetzung der beiden

verschiedenen Kanaluntereinheiten, so dass diese nicht durch Verknüpfungen mit anderen räumlich eng benachbarten Proteinen in dem Maße eingeschränkt bzw. verhindert wird wie es bei der thiol-spezifischen Vernetzung der Fall ist. Dass die Interaktion mit anderen Proteinen jedoch nicht ganz auszuschließen ist, zeigt die erhöhte Anzahl schwacher Hintergrundbanden, die bei der amino-spezifischen Vernetzung beobachtet wurden. Obwohl sie die Trennschärfe der Vernetzungsbanden etwas schmälerten, waren die Vernetzungsprodukte der beiden Kanaluntereinheiten eindeutig nachweisbar. Demzufolge war bei der amino-spezifischen Vernetzung auch keine Anwesenheit von 8-Br-cGMP erforderlich, um die Effizienz der Verknüpfung zwischen den A-Untereinheiten und der B-Untereinheit zu steigern. Da scheinbar genügend Lysine auf den Untereinheiten für die Vernetzung zur Verfügung standen, brauchten sie nicht, wie im Falle der wenigen Cysteine, durch 8-Br-cGMP zugänglicher gemacht werden. Des Weiteren ist die hohe Anzahl der Lysine wahrscheinlich auch für die schnelle Vernetzung des A-Monomers bis hin zum vollständigen Verschwinden der Monomerbande in kurzer Inkubationszeit (30 min) verantwortlich (Abb. 18 A). Bei der thiol-spezifischen Vernetzung, bei der nur wenige Cysteine zur Verfügung stehen und die Vernetzungsmöglichkeiten wesentlich geringer sind, verschwindet die A-Monomerbande selbst nach sehr langen Inkubationszeiten nicht (20 h) (Abb. 14 A).

#### *Kovalente Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals*

Bei der thiol-spezifischen Vernetzung der Untereinheiten des solubilisierten und gereinigten CNG-Kanals (Abb. 22) wurden die gleichen Vernetzungsprodukte nachgewiesen, wie sie auch bei der thiol-spezifischen Vernetzung der Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen markiert worden waren. Im Gegensatz zu diesem experimentellen Ansatz, konnten bei der Vernetzung des gereinigten CNG-Kanals ausschließlich die Kanaluntereinheiten verknüpft werden. Da die Kanalreinigung einen hohen Reinheitsgrad aufwies (Abb. 21), war die Beteiligung anderer möglicher Interaktionspartner weitgehend ausgeschlossen. Demzufolge brauchte keine NEM-Behandlung zur Absättigung von Cysteinen anderer Interaktionspartner durchgeführt werden. Um bei der Vernetzung des gereinigten Kanals die wenigen vernetzbaren Cysteine zugänglicher zu machen, wurde die Reaktion in Anwesenheit von 8-Br-cGMP durchgeführt. Die Ergebnisse stimmen mit denen der kovalenten Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten in ROS-Membranen gut überein. Dies bestätigt, dass bei der Vernetzung der Untereinheiten des CNG-Kanals in ROS-Membranen keine anderen Proteine an der Entstehung des Bandenmusters beteiligt waren.

Die amino-spezifische Vernetzung der Untereinheiten des gereinigten CNG-Kanals (Abb. 23) führte zu den gleichen Vernetzungsprodukten wie sie bei der thiol-spezifischen Vernetzung des gereinigten Kanals sowie bei der thiol- und amino-spezifischen Vernetzung der Untereinheiten des CNG-Kanals in ROS-Membranen nachgewiesen worden waren. Bei der amino-spezifischen Vernetzung der Untereinheiten des gereinigten Kanals waren die Vernetzungsprodukte zwischen den Kanaluntereinheiten gut nachweisbar. Da scheinbar genügend Lysine auf den Untereinheiten für die Vernetzung zur Verfügung stehen, war es nicht notwendig, die Effizienz der Vernetzung durch Anwesenheit von 8-Br-cGMP steigern.

Die unterschiedliche Anzahl der zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen spielt auch für die Vernetzung der Untereinheiten des gereinigten CNG-Kanals eine Rolle. So ist die A-Monomerbande bei der thiol-spezifischen Vernetzung nach 60 min nicht vollständig verschwunden (Abb. 22 A), während bei der amino-spezifischen Vernetzung vermutlich die höhere Anzahl an Lysinen bereits nach 30 min zu einem vollständigen Verschwinden des A-Monomers führt (Abb. 23 A).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die kovalente Vernetzung der Untereinheiten des membranständigen und des solubilisierten CNG-Kanals über Cysteine- und Lysine zu einem reproduzierbaren Bandenmuster führte, dessen Kriterien in Tabelle 7 zusammengefasst sind. Durch die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts konnten die Proteinbanden als folgende Vernetzungsprodukte identifiziert werden ( $n = 23$ ): 3A-1B ( $429 \text{ kDa} \pm 11 \text{ kDa}$ ), 2A-1B ( $368 \text{ kDa} \pm 10 \text{ kDa}$ ), 1A-1B ( $312 \text{ kDa} \pm 10 \text{ kDa}$ ), 3A ( $193 \text{ kDa} \pm 10 \text{ kDa}$ ) und 2A ( $122 \text{ kDa} \pm 10 \text{ kDa}$ ). Weiterhin wurde die unvernetzte A-Untereinheit ( $61 \text{ kDa} \pm 4 \text{ kDa}$ ) und die unvernetzte B-Untereinheit ( $245 \text{ kDa} \pm 11 \text{ kDa}$ ) nachgewiesen. Wie anhand der Standardabweichungen der einzelnen Mittelwerte zu erkennen ist, waren die Abweichungen im Laufverhalten der Proteinbanden in insgesamt 23 Experimenten gering.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der CNG-Kanals aus Sehstäbchen ein tetramerer Kanalkomplex ist, der sich aus drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit zusammensetzt. Die Möglichkeit, dass der native CNG-Kanal aus Sehstäbchen eine pentamere Struktur aufweist, kann durch die Experimente weitgehend ausgeschlossen werden. Weder durch sehr lange Inkubationszeiten (20 h) der Reaktion, noch durch sehr lange Exposition bei der Entwicklung der Westernblots konnte ein Vernetzungsprodukt aus fünf Untereinheiten nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte das tetramere Endprodukt des CNG-Kanals in den Experimenten durch zwei unterschiedliche Vernetzungsreagenzien und durch verschiedene

Antikörpermarkierungen beobachtet werden, so dass auch sterische Hinderung und „Epitop-Maskierung“ weitestgehend ausgeschlossen werden können. Weiterhin hätte im Falle eines Pentamers, der sich beispielsweise aus vier porenbildenden A-Untereinheiten und einer sogenannten „hanging-out“ B-Untereinheit, die nicht an der Porenbildung beteiligt ist, zusammensetzen würde, eine vierte A-Untereinheit in den Experimenten nachgewiesen werden müssen. Die Westernblot-Analyse zeigt jedoch weder eine Bande bei dem entsprechenden Molekulargewicht noch eine entsprechende Markierung durch den A-Antikörper.

Bei der Methode der kovalenten Vernetzung mit anschließender Westernblot-Analyse ist es allerdings möglich, dass höhermolekulare Vernetzungsprodukte durch Antikörper nicht identifiziert werden können, wenn sie aufgrund ihrer Größe nicht auf die PVDF-Membran transferiert werden und stattdessen im Polyacrylamidgel verbleiben. Für die vorliegende Arbeit würde dies bedeuten, dass Vernetzungsprodukte mit mehr als einer B-Untereinheit, z.B. für das Tetramer 2A-2B oder für das Pentamer 3A-2B, in der Westernblot-Analyse möglicherweise nicht nachgewiesen werden können, obwohl sie vorhanden sind.

Diese Fehlerquelle kann für die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse jedoch aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden. Das apparente Molekulargewicht der B-Untereinheit beträgt 240 kDa, wohingegen sich das von der Primärsequenz berechnete Molekulargewicht auf 155 kDa beläuft. Für den Transfervorgang auf die PVDF-Membran ist allerdings nur das berechnete Molekulargewicht ausschlaggebend. Demzufolge hätte ein mögliches B-Dimer ein berechnetes Molekulargewicht von 310 kDa. In den Experimenten konnte jedoch das Myosindimer als zusätzliches Standardprotein mit einem größeren berechneten Molekulargewicht von 424 kDa problemlos geblottet werden (Abb. 10). Außerdem wurde das B-Monomer in den Westernblot-Analysen eindeutig von dem B-Antikörper identifiziert. Dies lässt auf gute Transfereigenschaften der B-Untereinheit schließen, die auf den stark negativ geladenen GARP-Teil zurückzuführen sind und schließt die Anwesenheit einer weiteren B-Untereinheit in den vorliegenden Experimenten aus.

#### **4.4 Vergleich mit anderen Studien**

Bereits in früheren Studien wurde die Untereinheitenzusammensetzung des CNG-Kanals in Sebstäbchen untersucht. Dabei hat man sich die Fähigkeit des Sebstäbchenkanals,  $\text{Ni}^{2+}$  über Histidine zu koordinieren, zunutze gemacht (Karpen et al., 1993). Als Folge dieser  $\text{Ni}^{2+}$ -Koordinierung wird der Offen-Zustand des Kanals stabilisiert und es kommt bei nicht-sättigender cGMP-Konzentration zu einer Zunahme des Stromes ( $\text{Ni}^{2+}$ -Potenzierung). Gordon

und Zagotta (1995b) konnten mit dieser Methode Hinweise auf eine tetramere Stöchiometrie des heterolog exprimierten CNG-Kanals aus Sechstäbchen finden. Nachdem sie festgestellt hatten, dass für die  $\text{Ni}^{2+}$ -Bindung ein Histidin (H420) auf der C-Linker-Region der A-Untereinheit verantwortlich ist, stellten sie Tandemkonstrukte her (Heterodimere), die sowohl wildtyp (H420) als auch mutierte A-Untereinheiten (H420Q) trugen. Wurde nur ein Typ Heterodimere, d.h. nur WT/H420Q oder nur H420Q/WT, exprimiert, so konnte keine  $\text{Ni}^{2+}$ -Potenzierung festgestellt werden. Erst bei Koexpression der beiden unterschiedlichen Heterodimere trat eine Potenzierung des Stromes auf. Gordon und Zagotta (1995b) folgerten daraus, dass die Anordnung der Kanaluntereinheiten für die  $\text{Ni}^{2+}$ -Potenzierung wichtig ist. Bei Expression der einzelnen Heterodimere treten demnach überwiegend Kanäle auf, bei denen die Histidine nicht auf benachbarten Untereinheiten liegen (WT/H420Q/WT/H420Q). Koexprimiert man die beiden unterschiedlichen Heterodimere, entsteht hingegen eine weitere Kanalpopulation. Diese weist eine benachbarte Anordnung der  $\text{Ni}^{2+}$ -bindenden Untereinheiten auf (WT/WT/H420Q/H420Q), wodurch die Kanäle zur  $\text{Ni}^{2+}$ -Koordinierung befähigt werden.

Obwohl diese Studie zusammen mit einer anderen Studie von Liu et al. (1996) Hinweise darauf liefert, dass der Kanal ein Tetramer ist, blieb in beiden Studien die B-Untereinheit unberücksichtigt.

In zwei weiteren elektrophysiologischen Studien wurde die  $\text{Ni}^{2+}$ -Technik auf heterooligomere Sechstäbchen-Kanäle angewendet, leider jedoch mit kontroversen Ergebnissen. Shammatt und Gordon (1999) koexprimierten mutierte A- und B-Monomere, wobei sie den Einbau der B-Untereinheit anhand der für Heterooligomere charakteristischen cAMP-Empfindlichkeit überprüften. Bei den A-Untereinheiten war die  $\text{Ni}^{2+}$ -Bindestelle mutiert (H420Q), bei den B-Untereinheiten hingegen war eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Bindestelle eingefügt worden, indem an korrespondierender Stelle zum H420 der A-Untereinheit das Asparagin 546 der B-Untereinheit durch ein Histidin ersetzt worden war (N546H). Unter der Annahme, dass die  $\text{Ni}^{2+}$ -Koordinierung nur durch zwei Histidine auf benachbarten Untereinheiten erfolgen kann (Gordon & Zagotta, 1995), die A-Untereinheiten dafür aber nicht in Frage kamen, führten Shammatt und Gordon (1999) die Potenzierung des Stromes in ihren Experimenten auf die B-Untereinheiten zurück, die sich demzufolge ebenfalls in benachbarter Anordnung befinden müssen. Somit postulieren sie für den tetrameren CNG-Kanal eine benachbarte Anordnung (A/A/B/B).

Dieses Ergebnis wurde jedoch von He et al. (2000) in Frage gestellt. Diese Arbeitsgruppe konstruierte Heterodimere, die aus einer mutierten A-Untereinheit (H420Q) und einer wildtyp B-Untereinheit (WT) zusammengesetzt waren. Bei Expression der H420Q/WT-Heterodimere



wurde durch Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$  in dieser Studie eine Zunahme des Stromes beobachtet. Da die A-Untereinheiten allerdings keine  $\text{Ni}^{2+}$ -Bindestelle besaßen, konnte nach diesem Ergebnis die  $\text{Ni}^{2+}$ -Koordinierung nur durch die wildtyp B-Untereinheiten vermittelt werden. Darüber hinaus war der Potenzierungseffekt selbst dann noch vorhanden, wenn alle Aminosäuren, die sich auf der C-Linker-Region der B-Untereinheit befinden und  $\text{Ni}^{2+}$  binden können, mutiert worden waren. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass neben der C-Linker-Region auch andere Regionen der B-Untereinheit an der  $\text{Ni}^{2+}$ -Bindung beteiligt sein könnten.

He et al. (2000) schlossen aus folgenden Gründen daraus, dass keine zwei benachbarte A-Untereinheiten im Kanal für eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Koordinierung erforderlich sind: Zum einen trat bei Expression der H420Q/WT-Heterodimere, eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Potenzierung auf, die nicht durch die A-Untereinheiten vermittelt werden konnte und auf die B-Untereinheiten zurückgeführt wurde. Zum anderen führte die Expression der Heterodimere zu Kanälen, die durch l-cis-Diltiazem blockierbar und für cAMP empfindlich waren. Da dies charakteristische Eigenschaften der nativen heterooligomeren CNG-Kanäle sind, waren demzufolge bei der Expression der H420Q/WT auch heterooligomere Kanäle mit A- und B-Untereinheiten entstanden. Außerdem legten die Autoren die Annahme zugrunde, dass sich exprimierte Heterodimere in einer sogenannten „head-to-tail“-Anordnung zusammenlagern. Dabei geht man davon aus, dass sich die erste Untereinheit des einen Tandemkonstrukts an die zweite Untereinheit eines anderen Tandemkonstrukts anlagert (und umgekehrt). Demzufolge sind nach He et al. (2000) bei der Expression der H420Q/WT-Heterodimere Kanäle mit diagonaler Anordnung entstanden, die sie auch für den nativen Kanal postulieren (A/B/A/B).

Sowohl He et al. (2000) als auch Shammatt und Gordon (1999) überprüften den Einbau der wildtyp B-Untereinheit der Heterodimere anhand der cAMP-Empfindlichkeit und/oder anhand der l-cis-diltiazem-Empfindlichkeit. Da diese Parameter aber keine Rückschlüsse auf die Anzahl der B-Untereinheiten zulassen, können beide Studien eine A/A/A/B oder B/B/B/A-Anordnung der Untereinheiten im tetrameren Kanalkomplex nicht ausschließen. Nachdem He et al. (2000) festgestellt hatten, dass die  $\text{Ni}^{2+}$ -Bindung nicht unbedingt zwei benachbarte A-Untereinheiten erfordert und auch durch andere Regionen der wildtyp B-Untereinheiten erfolgen kann, ergibt sich für die Studie von Shammatt und Gordon (1999) eine andere Möglichkeit der Zusammenlagerung der exprimierten Untereinheiten als die, die von den Autoren gefolgert worden war. So ist es durchaus denkbar, dass sich bei der Koexpression der Monomere drei mutierte A-Untereinheiten (H420Q) und eine B-Untereinheit (N546H) zu einem Kanal zusammenlagern und die  $\text{Ni}^{2+}$ -Potenzierung durch verschiedene Regionen ein und derselben B-

Untereinheit vermittelt wird. Außerdem könnte ebenso eine Zusammenlagerung von drei B-Untereinheiten (N546H) und einer A-Untereinheit (H420Q) auftreten, ohne dass es in dem Experiment festgestellt werden könnte.

Ebenso kann die Studie von He et al. (2000) diese beiden Möglichkeiten der Zusammenlagerung in ihren Experimenten nicht ausschließen. Auch in ihren Experimenten könnten Kanäle mit drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit entstehen, wenn von den unterschiedlichen Heterodimeren jeweils nur die erste Untereinheit in den Kanal eingebaut würde. Die jeweils zweite Untereinheit der Heterodimere wären dann sogenannte „hanging-out“ Untereinheiten. Die  $\text{Ni}^{2+}$ -Potenzierung könnte wiederum durch verschiedene Regionen ein und derselben B-Untereinheit vermittelt werden. Der Einbau von zwei B-Untereinheiten, wie ihn He et al. (2000) in ihren Studien annehmen, kann weder durch die Überprüfung der cAMP- noch durch die l-cis-Diltiazem-Empfindlichkeit festgestellt werden, da man mit diesen Parametern zwar auf die Anwesenheit der B-Untereinheit im Kanal, jedoch nicht auf ihre Anzahl schließen kann. Umgekehrt könnten sich auch hier drei B-Untereinheiten und eine A-Untereinheit zu einem Kanal zusammenlagern und die jeweils zweiten Untereinheiten der Heterodimere als „hanging-out“-Untereinheiten verbleiben. Somit scheinen die Rückschlüsse auf die Stöchiometrie, die in beiden Studien durch die Expression von Heterodimeren gewonnen wurden, nicht sicher zu sein.

Auch andere Arbeitsgruppen fanden Hinweise dafür, dass die Expression von Tandemkonstrukten keine sicheren Rückschlüsse auf die Stöchiometrie zulässt. So fanden McCormack und Mitarbeiter bereits 1992 Hinweise darauf, dass nicht alle Untereinheiten von Heterodimeren in funktionelle Kanäle eingebaut werden. Sie exprimierten Tandemkonstrukte mit wildtyp (L370) und mutierten Untereinheiten (L370V) des *Shaker*  $\text{K}^+$ -Kanals und überprüften die Spannungsabhängigkeit der Ströme der resultierenden Kanäle. Bei Expression von WT/L370V-Heterodimeren beobachteten sie eine Spannungsabhängigkeit, die den wildtyp Kanälen ähnelte. Bei Expression der L370V-WT-Heterodimere fanden sie eine Spannungsabhängigkeit, die Kanälen glich, die nur aus mutierten Untereinheiten bestehen. Auch die Expression von Heterodimeren, die eine wildtyp und eine trunkierte Untereinheit trugen (WT/102), wobei die trunkierte Untereinheit nachweislich die Expression von funktionellen Kanälen unterdrückt, führte zu Kanälen mit einer Spannungsabhängigkeit, die für wildtyp Kanäle charakteristisch ist. Nach diesen Ergebnissen fand kein gesicherter Einbau aller Untereinheiten der exprimierten Heterodimere statt, wodurch Aussagen über die Stöchiometrie des Kanals erschwert werden.

Darüber hinaus fanden Sukharev et al. (1999) in einer Studie am mechanosensitiven MscL-Kanal aus *Escherichia coli* mit biochemischen Methoden wie Ausschlusschromatographie, analytische Ultrazentrifugation und kovalenter Vernetzung eine pentamere Struktur dieses Kanals (Perozo et al., 2002), die mit dem Resultat der Kristallstruktur des mechanosensitiven Kanals aus dem *Mycobacterium tuberculosis* (Tb-MscL) übereinstimmt (Chang, et al., 1998). Für die kovalente Vernetzung des MscL-Kanals exprimierten Sukharev et al. (1999) Heterodimere und Heterotrimere. Erwartungsgemäß sollte sowohl die Vernetzung der Heterodimere als auch die Vernetzung der Heterotrimere zu hexameren Kanälen führen. Überraschenderweise entsprachen jedoch die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle weitgehend denen des pentameren wildtyp Kanals. Die Autoren schlossen daraus, dass bei Expression der Heterodimere bzw. Heterotrimere nicht alle Untereinheiten der Tandemkonstrukte in den Kanal eingebaut werden. Demnach werden bei der kovalenten Vernetzung der Tandemkonstrukte in beiden Fällen nur fünf Untereinheiten miteinander vernetzt, die dann die Pore ausbilden. Die sechste Untereinheit wird nicht vernetzt und liegt vermutlich als „hanging-out“-Untereinheit vor.

Die Ergebnisse beider Studien lassen die Aussage zu, dass die Expression von Tandemkonstrukten nicht geeignet ist, um mit elektrophysiologischen Methoden auf die Stöchiometrie von nativen Kanälen zu schließen.

#### **4.5 Sind CNG-Kanäle asymmetrische Proteinkomplexe?**

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass der native CNG-Kanal aus Sebstäbchen ein Tetramer ist, der sich aus drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit zusammensetzt. Demzufolge weist der Kanal eine Asymmetrie bezüglich der Anzahl der verschiedenen Untereinheiten auf. Higgins et al. (2002) untersuchten den nativen Sebstäbchenkanal mit Einzelmolekül-Elektronenmikroskopie. Die hochauflösenden Bildanalysen zeigen den Kanal eindeutig als Tetramer. Eine Aufklärung der Stöchiometrie war jedoch mit diesem Verfahren nicht möglich, da der GARP-Teil der B-Untereinheit vermutlich wegen seiner Beweglichkeit eine zu geringe Elektronendichte aufweist und somit nicht identifiziert werden konnte. Es ist aufgrund dieser Studie nicht auszuschließen, dass der Kanal eine 3A-1B-Stöchiometrie aufweist.

Im Übrigen besteht auch der native olfaktorische CNG-Kanal aus drei verschiedenen Untereinheiten (Bönigk et al., 1999). Die A2- und die A4-Untereinheiten dieses Kanals sind der A1-Untereinheit des CNG-Kanals aus Sebstäbchen ähnlich, während die B1b-Untereinheit des olfaktorischen Kanals ein Spleißprodukt der B1a-Untereinheit des Sebstäbchenkanals ist

(Dhallan et al., 1990; Ludwig et al., 1990; Bradley et al., 1994; Liman & Buck, 1994; Sautter et al., 1998). Nur die Koexpression von allen drei Untereinheiten führt zu einem Kanal mit funktionellen Eigenschaften, die denen des nativen olfaktorischen Kanals entsprechen. Dies lässt die Aussage zu, dass sich auch im olfaktorischen Kanal drei Untereinheiten asymmetrisch zu einem tetrameren Proteinkomplex zusammenlagern.

## 4.6 Ausblick

CNG-Kanäle übernehmen wichtige Funktionen bei der Signalverarbeitung in Photorezeptoren und den olfaktorischen Neuronen des Riechepithels. Auch in den Geweben der Niere, Hoden, des Herzen und in Spermien wurden sie lokalisiert. Nachdem nun zum ersten Mal die Stöchiometrie eines nativen CNG-Kanals mit einer biochemischen Methode aufgeklärt wurde, kann diese Methode auch auf CNG-Kanäle aus anderen Geweben angewendet werden. Weiterführende Untersuchungsmöglichkeiten sind durch zweidimensionale SDS-Polyacrylamidelektrophorese, Einzelmolekül-Elektronenmikroskopie, modernen Fluoreszenzmethoden sowie durch biophysikalische Methoden wie analytische Ultrazentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation gegeben. Somit ist zu erwarten, dass sich durch die Aufklärung der Stöchiometrie verschiedener CNG-Kanäle Erkenntnisse über die funktionellen Unterschiede der einzelnen Familienmitglieder ergeben.

Darüber hinaus kann die Methode der kovalenten Vernetzung eingesetzt werden, um die Wechselwirkungen der CNG-Kanaluntereinheiten miteinander oder die mit anderen Proteinen eingehender zu untersuchen. In Verbindung mit einer Trypsin-Proteolyse und einer massenspektrometrischen Analyse ist es möglich, die an der Vernetzung beteiligten Aminosäuren der jeweiligen Polypeptidkette genau zu lokalisieren. Dadurch können wertvolle Informationen über Strukturbeziehungen und Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Proteinen gewonnen werden.

## 5 Zusammenfassung

Der zyklisch Nukleotid-gesteuerte (CNG-) Kanal aus Rindersehstäbchen ist ein Heterooligomer, der aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt ist. Aufgrund von elektrophysiologischen Untersuchungen an heterolog exprimierten CNG-Kanälen wurde für die Stöchiometrie dieses Kanals eine Zusammenlagerung von zwei A- und zwei B-Untereinheiten postuliert (2A-2B).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Untereinheiten-Stöchiometrie des nativen CNG-Kanals mit biochemischen Methoden untersucht. Hierzu wurden die Untereinheiten des Kanals in ROS-Membranen sowohl thiol-spezifisch über Cysteine als auch amino-spezifisch über Lysine mit Hilfe von bifunktionellen Vernetzungsreagenzien kovalent vernetzt. Beide experimentelle Ansätze führten zu sehr definierten Vernetzungsprodukten, die auch bei der thiol- und amino-spezifischen Vernetzung der CNG-Kanaluntereinheiten des solubilisierten und gereinigten Kanals auftraten. Vernetzte und unvernetzte Kanaluntereinheiten wurden in SDS-Polyacrylamidgradientengelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Um die Zusammensetzung der einzelnen Vernetzungsprodukte zu untersuchen, wurde der immunologische Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen die A- und die B-Untereinheit durchgeführt. Alternativ verwendete A- bzw. B-Antikörper, die andere Bindestellen auf den Untereinheiten erkennen, markieren die gleichen Proteinbanden, so dass eine „Epitop-Maskierung“ infolge der kovalenten Vernetzung ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich zum immunologischen Nachweisverfahren wurde das apparente Molekulargewicht der Vernetzungsprodukte exakt bestimmt. Dadurch konnten Rückschlüsse auf die Anzahl der verschiedenen Untereinheiten in einem Vernetzungsprodukt gewonnen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass der native CNG-Kanal aus Rindersehstäbchen ein Tetramer ist, der sich aus drei A-Untereinheiten und einer B-Untereinheit (3A-1B) zusammensetzt.

Diese Arbeit zeigt auch, dass die kovalente Vernetzung eine gute Möglichkeit darstellt, die Stöchiometrie von CNG-Kanälen zu untersuchen. Dies ist insbesondere deswegen von sehr großem Interesse, da die Untereinheitenzusammensetzung die funktionellen Eigenschaften der Kanäle beeinflusst. So wird es in Zukunft sehr interessant sein, die Stöchiometrie der CNG-Kanäle in anderen Geweben wie Sehzapfen oder Spermien mit dieser Methode zu untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Baumann, S.W., Baur, R. & Sigel, E. (2001). Subunit arrangement of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 36275-36280.
- Bjerrum, O.J., Larsen, K.P. & Heegaard, N.H.H. (1988). Non-specific binding and artifacts. Specificity problems and troubleshooting with an atlas of immunoblotting artifacts. In *Handbook of immunoblotting proteins*. Bjerrum, O.J. & Heegaard, N.H.H. (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I: pp. 227-254.
- Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dosé, A., Illing, M., Molday, R.S. & Kaupp, U.B. (1993). Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron* **10**, 865-877.
- Bönigk, W., Bradley, J., Müller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnet, G., Kaupp, U.B. & Frings, S. (1999). The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J. Neurosci.* **19**, 5332-5347.
- Bradley, J., Frings, S., Yau, K.-W. & Reed, R. (2001). Nomenclature for ion channel subunits. *Science* **294**, 2095.
- Bradley, J., Li, J., Davidson, N., Lester, H.A. & Zinn, K. (1994). Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: A subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8890-8894.
- Brown, R.L., Snow, S.D. & Haley, T.L. (1998). Movement of gating machinery during the activation of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Biophys. J.* **75**, 825-833.
- Burns, M.E. & Baylor, D.A. (2001). Activation, deactivation, and adaption in rod photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 779-805.
- Catterall, W.A. (1988). Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* **242**, 50-61.
- Catterall, W.A. (1991). Structure and function of voltage-gated sodium and calcium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1**, 5-13.
- Catterall, W.A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**, 13-25.
- Chang, G., Spencer, R.H., Lee, A.T., Barclay, M.T. & Rees, D.C. (1998). Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* **282**, 2220-2226.

- Chen, T.-Y., Illing, M., Molday, L.L., Hsu, Y.-T., Yau, K.-W. & Molday, R.S. (1994). Subunit 2 (or  $\beta$ ) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11757-11761.
- Chen, T.-Y., Peng, Y.-W., Dhallan, R.S., Ahamed, B., Reed, R.R. & Yau, K.-W. (1993). A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* **362**, 764-767.
- Clement, J.P. 4<sup>th</sup>, Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L. & Bryan, J. (1997). Association and stoichiometry of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel subunits. *Neuron* **18**, 827-838.
- Colville, C.A. & Molday, R.S. (1996). Primary structure and expression of the human beta-subunit and related proteins of the rod photoreceptor cGMP-gated channel. *J. Biol. Chem.* **271**, 32968-32974.
- Cook, N.J., Hanke, W. & Kaupp, U.B. (1987). Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 585-589.
- Cook, N.J., Molday, L.L., Reid, D., Kaupp, U.B. & Molday, R.S. (1989). The cGMP-gated channel of bovine rod photoreceptors is localized exclusively in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **264**, 6996-6999.
- Cooper, E., Couturier, S. & Ballivet, M. (1991). Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **350**, 235-238.
- Corey, S., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D.E. (1998). Number and stoichiometry of subunits in the native atrial G-protein-gated  $\text{K}^+$  channel,  $\text{I}_{\text{KACH}}$ . *J. Biol. Chem.* **273**, 5271-5278.
- Deutsch, C. (2002). Potassium channel ontogeny. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 19-46.
- Devillers-Thiéry, A., Galzi, J.L., Eiselé, J.L., Bertrand, S., Bertrand, D. & Changeux, J.P. (1993). Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels. *J. Membr. Biol.* **136**, 97-112.
- Dhallan, R.S., Yau, K.-W., Schrader, K.A. & Reed, R.R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* **347**, 184-187.
- Dzeja, C., Hagen, V., Kaupp, U.B. & Frings, S. (1999).  $\text{Ca}^{2+}$  permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* **18**, 131-144.
- Eismann, E., Bönigk, W. & Kaupp, U.B. (1993). Structural features of cyclic nucleotide-gated channels. *Cell. Physiol. Biochem.* **3**, 332-351.

- Eismann, E., Müller, F., Heinemann, S.H. & Kaupp, U.B. (1994). A single negative charge within the pore region of a cGMP-gated channel controls rectification, Ca<sup>2+</sup> blockage and ionic selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1109-1113.
- Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. & Lyubarsky, A.L. (1985). Introduction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**, 310-313.
- Finn, J.T., Grunwald, M.E. & Yau, K.-W. (1996). Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 395-426.
- Flynn, G.E., Johnson, J.P. & Zagotta, W.N. (2001). Cyclic nucleotide-gated channels: shedding light on the opening of a channel pore. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 642-651.
- Frings, S., Lynch, J.W. & Lindemann, B. (1992). Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. *J. Gen. Physiol.* **100**, 45-67.
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M. & Kaupp, U.B. (1995): Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **15**, 169-179.
- Geysen, J. (1988). Desorption of antibodies for reuse of blots. In *Handbook of immunoblotting proteins*. Bjerrum, O.J. & Heegaard, N.H.H. (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I: pp. 213-220.
- Gordon, S.E., Varnum, M.D. & Zagotta, W.N. (1997). Direct interaction between amino- and carboxyl-terminal domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **19**, 431-441.
- Gordon, S.E. & Zagotta, W.N. (1995a). A histidine residue associated with the gate of the cyclic nucleotide-activated channels in rod photoreceptors. *Neuron* **14**, 177-183.
- Gordon, S.E. & Zagotta, W.N. (1995b). Subunit interactions in coordination of Ni<sup>2+</sup> in cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10222-10226.
- Goulding, E.H., Ngai, J., Kramer, R.H., Colicos, S., Axel, R., Siegelbaum, S.A. & Chess, A. (1992). Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* **8**, 45-58.
- Goulding, E.H., Tibbs, G.R., Liu, D. & Siegelbaum, S.A. (1993). Role of H5 domain in determining pore diameter and ion permeation through cyclic nucleotide-gated channels. *Nature* **364**, 61-64.
- Goulding, E.H., Tibbs, G.R. & Siegelbaum, S.A. (1994). Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation. *Nature* **372**, 369-374.



- 
- Griffon, N., Büttner, C., Nicke, A., Kuhse, J., Schmalzing, G. & Betz, H. (1999). Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *EMBO J.* **18**, 4711-4721.
- Grunwald, M.E., Yu, W.P., Yu, H.H. & Yau, K.-W. (1998). Identification of a domain on the beta-subunit of the rod cGMP-gated cation channel that mediates inhibition by calcium-calmodulin. *J. Biol. Chem.* **273**, 9148-9157.
- Guy, H.R., Durell, S.R., Warmke, J., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991). Similarities in amino acid sequences of *Drosophila eag* and cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **254**, 730.
- Hackos, D.H. & Korenbrot, J.I. (1999). Divalent cation selectivity is a function of gating in native and recombinant cyclic nucleotide-gated ion channels from retinal photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **113**, 799-817.
- Haynes, L.W. (1995a). Permeation of internal and external monovalent cations through the catfish cone photoreceptor cGMP-gated channel. *J. Gen. Physiol.* **106**, 485-505.
- Haynes, L.W. (1995b). Permeation and block by internal and external divalent cations of the catfish cone photoreceptor cGMP-gated channel. *J. Gen. Physiol.* **106**, 507-523.
- Haynes, L.W. & Yau, K.-W. (1985). Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. *Nature* **317**, 66-70.
- He, Y., Ruiz, M.L. & Karpen, J.W. (2000). Constraining the subunit order of rod cyclic nucleotide-gated channels reveals a diagonal arrangement of like subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 895-900.
- Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels. *Science* **258**, 1152-1155.
- Henn, D.K., Baumann, A. & Kaupp, U.B. (1995). Probing of the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7425-7429.
- Higgins, M.K., Weitz, D., Warne, T., Schertler, F.X. & Kaupp, U.B. (2002). Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: the arrangement of the cytoplasmic domains. *EMBO J.* **21**, 2087-2094.
- Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V. & Hebert, S.C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**, 31-38.
- Hu, D.H., Kimura, S. & Maruyama, K. (1989). Myosin oligomers as the molecular mass standard in the estimation of molecular mass of nebulin (~800 kDa) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biomedical Research* **10**, 165-168.

- 
- Ikebe, M., Komatsu, S., Woodhead, J.L., Mabuchi, K., Ikebe, R., Saito, J., Craig, R. & Higashihara, M. (2001). The tip of the coiled-coil rod determines the filament formation of smooth muscle and nonmuscle myosin. *J. Biol. Chem.* **276**, 30293-30300.
- Inagaki, N., Gono, T. & Seino, S. (1997). Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett.* **409**, 232-236.
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1990). A superfamily of ion channels. *Nature* **345**, 672.
- Johnson, J.P. & Zagotta, W.N. (2001). Rotational movement during cyclic nucleotide-gated channel opening. *Nature* **412**, 917-921.
- Kaplan, R.S. & Pedersen, P.L. (1985). Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B. *Anal. Biochem.* **150**, 97-104.
- Karpen, J.B., Brown, R.L., Stryer, L. & Baylor, D.A. (1993). Interactions between divalent cations and the gating machinery of cyclic GMP-activated channels in salamander retinal rods. *J. Gen. Physiol.* **101**, 1-25.
- Kaupp, U.B. (1995). Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 434-442.
- Kaupp, U.B., Dzeja, C., Frings, S., Bendig, J. & Hagen, V. (1998). Applications of caged compounds of hydrolysis-resistant analogs of cAMP and cGMP. *Methods Enzymol.* **291**, 415-430.
- Kaupp, U.B. & Koch, K.-W. (1992). Role of cGMP and Ca<sup>2+</sup> in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 153-175.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. & Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**, 762-766.
- Kaupp, U.B. & Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated channels. *Physiol. Rev.* **82**, 769-824.
- Kim, T.S.Y., Reid, D.M. & Molday, R.S. (1998). Structure-function relationships and localization of the Na/Ca-K exchanger in rod photoreceptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 16561-16567.
- Körschen, H.G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Müller F., Dosé, A., Godde, M., Molday, L., Kaupp, U.B. & Molday, R.S. (1995). A 240 kDa protein represents the complete  $\beta$  subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. *Neuron* **15**, 627-636.

- 
- Kubo, Y., Baldwin, T.J., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1993a). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-133.
- Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P.A., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1993b). Primary structure and functional expression of a rat G-protein coupled muscarinic potassium channel. *Nature* **364**, 802-806.
- Kumar, V.D. & Weber, I.T. (1992). Molecular model of the cyclic GMP-binding domain of the cyclic GMP-gated ion channel. *Biochemistry* **31**, 4643-4649.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langosch, D., Thomas, L. & Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7394-7398.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. & Barhanin, J. (1996). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J* **15**, 1004-1011.
- Liman, E.R. & Buck, L.B., (1994). A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* **13**, 611-621.
- Liman, E.R., Tytgat, J. & Hess, P. (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**, 861-871.
- Liu, J. & Siegelbaum, S.A. (2000). Change of pore helix conformational state upon opening of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **28**, 899-909.
- Liu, D.T., Tibbs, G.T. & Siegelbaum, S.A. (1996). Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* **16**, 983-990.
- Loewen, C.J.R. & Molday, R.S. (2000). Disulfide-mediated oligomerization of Peripherin/Rds and Rom-1 in photoreceptor disk membranes. *J. Biol. Chem.* **275**, 5370-5378.
- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. & Kaupp, U.B. (1990). Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* **270**, 24-29.
- Luzio, J.P. & Jackson, P. (1988). Epitope mapping of proteins. In *Handbook of immunoblotting proteins*. Bjerrum, O.J. & Heegaard, N.H.H. (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. pp. II: 13-23.
- MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.

- 
- Matulef, K., Flynn, G.E. & Zagotta, W.N. (1999). Molecular rearrangements in the ligand-binding domain of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **24**, 443-452.
- McCormack, K., Lin, L., Iverson, L.E., Tanouye, M.A. & Sigworth, F.J. (1992). Tandem linkage of *Shaker* K<sup>+</sup> channel subunits does not ensure the stoichiometry of expressed channels. *Biophys. J.* **63**, 1406-1411.
- Meyer, T.S. & Lamberts, B.L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of *parotid saliva* proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144-145.
- Molday, R.S., Molday, L.L., Dosé, A., Clark-Lewis, I., Illing, M., Cook, N.J., Eismann, E. & Kaupp, U.B. (1991). The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell. Characterization and orientation of the amino terminus. *J. Biol. Chem.* **266**, 21917-21922.
- Müller, F. & Kaupp, U.B. (1998). Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* **85**, 49-61.
- Nakamura, T. & Gold, G.H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**, 442-444.
- Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Kurasaki, M., Takahashi, H. & Numa, S. (1986). Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* **320**, 188-192.
- Numa, S. (1989). A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. In *The Harvey Lectures*. Kaback, H.R., Kirschner, M.W., Numa, S., et al., (eds.), A. Liss Incorporation, New York, pp. 121-165.
- Pagès, F., Ildefonse, M., Ragno, M., Crouzy, S. & Bennet, N. (2000). Coexpression of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the rod cyclic GMP-gated channel restores native sensitivity to cyclic AMP: role of D604/N1201. *Biophys. J.* **78**, 1227-1239.
- Palczewski, K. & Saari, J.C. (1997). Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 500-504.
- Paoletti, P., Young, E.C. & Siegelbaum, S.A. (1999). C-linker of cyclic nucleotide-gated channels controls coupling of ligand binding to channel gating. *J. Gen. Physiol.* **113**, 17-33.
- Perozo, E., Cortes, D.M., Sompornpisut, P., Kloda, A. & Martinac, B. (2002). Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature* **418**, 942-948.
- Poetsch, A., Molday, L.L. & Molday, R.S. (2001). The cGMP-gated channel and related glutamic acid-rich proteins interact with Peripherin-2 at the rim region of rod photoreceptor disc membranes. *J. Biol. Chem.* **276**, 48009-48016.

- Raab-Graham, K.F. & Vandenberg C.A. (1998). Tetrameric subunit structure of the native brain inwardly rectifying potassium channel  $K_{ir} 2.2$ . *J. Biol. Chem.* **273**, 19699-19707.
- Reiländer, H., Achilles, A., Friedel, U., Maul, G., Lottspeich, F. & Cook, N.J. (1992). Primary structure and functional expression of the Na/Ca-K exchanger from bovine photoreceptors. *EMBO J.* **11**, 1689-1695.
- Rho, S.-H. & Park, C.-S. (1998). Extracellular proton alters the divalent cation binding affinity in a cyclic nucleotide-gated channel pore. *FEBS Lett.* **440**, 199-202.
- Root, M.J. & MacKinnon, R. (1993). Identification of an external divalent cation-binding site in the pore of a cGMP-activated channel. *Neuron* **11**, 459-466.
- Rosenbaum, T. & Gordon, S.E. (2002). Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron* **33**, 703-713.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y. & Stevens, C.F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* **280**, 1596-1599.
- Sautter, A., Zong, X., Hofmann, F. & Biel, M. (1998). An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel  $\beta$  subunit expressed in olfactory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4696-4701.
- Schild, D. & Restrepo, D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.* **78**, 429-466.
- Schnetkamp, P.P. & Daemen, F.J. (1982). Isolation and characterization of osmotically sealed bovine rod outer segments. *Methods Enzymol.* **81**, 110-116.
- Schulteis, C.T., Nagaya, N. & Papazian, D.M. (1996). Intersubunit interaction between amino- and carboxyl-terminal cysteine residues in tetrameric *Shaker*  $K^+$  channels. *Biochemistry* **35**, 12133-12140.
- Schwarzer, A., Schauf, H. & Bauer, P.J. (2000). Binding of the cGMP-gated channel to the Na/Ca-K exchanger in rod photoreceptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 13448-13454.
- Seifert, R., Eismann, E., Ludwig, J., Baumann, A. & Kaupp, U.B. (1999). Molecular determinants of a  $Ca^{2+}$ -binding site in the pore of cyclic nucleotide-gated channels: S5/S6 segments control affinity of intrapore glutamates. *EMBO J.* **18**, 119-130.
- Serre, V., Ildefonse, B. & Bennett, N. (1995). Effects of cysteine modification on the activity of the cGMP-gated channel from retinal rods. *J. Membr. Biol.* **146**, 145-162.
- Sesti, F., Straforini, M., Lamb, T.D. & Torre, V. (1994). Gating, selectivity and blockage of single channels activated by cyclic GMP in retinal rods of the tiger salamander. *J. Physiol.* **474**, 203-222.

- Shammat, I.M. & Gordon, S.E. (1999). Stoichiometry and arrangement of subunits in rod cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **23**, 809-819.
- Shieh, C.-C., Coghlan, M., Sullivan, J.P. & Gopalakrishnan, M. (2000). Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.* **52**, 557-593.
- Shyng, S. & Nichols, C.G. (1997). Octameric stoichiometry of the K<sub>ATP</sub> channel complex. *J. Gen. Physiol.* **110**, 655-664.
- Stryer, L. (1991). Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* **266**, 10711-10714.
- Stühmer, W. (1991). Structure-function studies of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 65-78.
- Sugimoto, Y., Yatsunami, K., Tsujimoto, M., Khorana, H.G. & Ichikawa, A. (1991). The amino acid sequence of a glutamic acid-rich protein from bovine retina as deduced from the cDNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3116-3119.
- Sukharev, S.I., Schroeder, M.J. & McCaslin, D.R. (1999). Stoichiometry of the large conductance bacterial mechanosensitive channel of *E. coli*. A biochemical study. *J. Membr. Biol.* **171**, 183-193.
- Takio, K., Wade, R.D., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. A. & Titani, K. (1984). Guanosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase, a chimeric protein homologous with two separate protein families. *Biochemistry* **23**, 4207-4218.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313-318.
- Torre, V. & Menini, A. (1994). Selectivity and single-channel properties of the cGMP-activated channel in amphibian rods. In *Handbook of membrane channels: molecular and cellular physiology*. Peracchia, C. (ed.), San Diego, Academic Press, pp. 345-358.
- Torre, V., Straforini, M., Sesti, F. & Lamb, T.D. (1992). Differential channel-gating properties of two classes of cyclic GMP-activated channel in vertebrate photoreceptors. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **250**, 209-215.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tretter, V., Ehy, N., Fuchs, K. & Sieghart, W. (1997). Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA<sub>A</sub> receptor subtype. *J. Neurosci.* **17**, 2728-2737.

- 
- Trudeau, M. & Zagotta, W. (2002). An intersubunit interaction regulates trafficking of rod cyclic nucleotide-gated channels and is disrupted in an inherited form of blindness. *Neuron* **34**, 197-207.
- Vetter, J. (1993). Untersuchungen zur oligomeren Struktur des cGMP-gesteuerten Ionenkanals aus Photorezeptoren. Dissertation, Forschungszentrum Juelich.
- Weber, I.T. & Steitz, T.A. (1987). Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 311-326.
- Weber, I.T., Shabb, J.B. & Corbin, J.D. (1989). Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: a key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites. *Biochemistry* **28**, 6122-6127.
- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. & Taylor, S.S. (1987). Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**, 343-351.
- Weyand, I. (1996). Cyclic nucleotide-gated channels in sperm. In *Signal Transduction in Testicular Cells*. Hansson, V. et al. (ed.), Springer Verlag, Heidelberg, pp. 53-68.
- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Müller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. & Kaupp, U.B. (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**, 859-863.
- Wong, S.S. (1993). Chemistry of protein conjugation and cross-linking. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Yang, J., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (1995). Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* **15**, 1441-1447.
- Yau, K.-W. (1994). Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald lecture. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.* **35**, 9-32.
- Yau, K.-W. & Baylor, D.A. (1989). Cyclic GMP-activated conductances of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 289-327.
- Zagotta, W.N. & Siegelbaum, S.A. (1996). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 235-263.
- Zheng, J. & Zagotta, W.N. (2000). Gating rearrangements in cyclic nucleotide-gated channels revealed by patch-clamp fluorometry. *Neuron* **28**, 369-374.
- Zimmerman, A.L. & Baylor, D.A. (1986). Cyclic GMP-sensitive conductance of retinal rods consists of aqueous pores. *Nature* **321**, 70-72.

- 
- Zong, X., Zucker, H., Hofmann, F. & Biel, M. (1998). Three amino acids in the C-linker are major determinants of gating in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* **17**, 353-362.
- Zufall, F., Firestein, S. & Shepherd, G.M. (1994). Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 577-607



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp betreut worden.

Die unten genannte Teilpublikation wird voraussichtlich im Dezember 2002 veröffentlicht.

“Subunit Stoichiometry of the Native CNG channel of Rod Photoreceptor Cells”



## **Abstract**

The cyclic nucleotide-gated (CNG) channel from rod photoreceptors is a heterooligomer composed of two different subunits. Due to electrophysiological studies with heterologously expressed CNG channels, a subunit stoichiometry of two A- and two B-subunits has been postulated for this channel complex (2A-2B).

In the present study, the subunit stoichiometry of the native CNG channel was investigated by applying biochemical methods. For this purpose, the subunits of the CNG channel in ROS membranes were cross-linked using thiol-specific as well as amino-specific cross-link reagents. Both approaches resulted in distinct cross-link products which could also be observed when thiol-specific and amino-specific cross-linking of subunits of the solubilised and purified CNG channel were performed. Cross-linked and non-cross-linked channel subunits were subjected to SDS-Polyacrylamide electrophoresis carried out on gradient gels and transferred to PVDF-membranes. In order to determine the subunit composition of each cross-link species the protein bands were analysed by Western blotting using specific antibodies against the A- and B-subunits. Other A- and B-antibodies which recognize different epitopes of the channel subunits show the same cross-link products. Therefore, epitope masking as a result of cross-linking can be widely excluded. In addition to the immunological verification, the apparent molecular weight of the cross-link products was determined precisely. These results lead to the number of different subunits that are present in a cross-link product.

The results of the present study show unambiguously that the native CNG channel from rod photoreceptors is a tetrameric complex comprising three A-subunits and one B-subunit.

Furthermore, this study suggests that chemical cross-linking is a suitable method to investigate the stoichiometry of CNG channels. This is of great interest since the subunit stoichiometry determines many of the functional properties of these channels. In future it will be very interesting to examine the subunit stoichiometry of CNG channels in other tissues like cones or sperms by applying chemical cross-linking.