Zum Mechanismus der Signalübertragung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Biophysik

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. rer. nat. Oliver Peter Ernst

geboren am 04.03.1965 in Istein (Baden)

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Martin J. Lohse

2. Prof. Dr. rer. nat. Georg Büldt

eingereicht: März 2003

Datum der Habilitation: 13. November 2003

1 Einleitung

In der vorliegenden Schrift werden eigene Publikationen in vier Abschnitten zusammengefasst und jeweils im Kontext diskutiert:

1. Einleitung

2. Methodische Entwicklungen

3. Aktive Konformation des Rhodopsins

4. Rezeptor / G-Protein Interface.

Jedem Abschnitt folgt eine Auflistung der eigenen Publikationen. Im Text sind Eigenzitate durch einen Stern [Zitat]* markiert. Ein komplettes Verzeichnis der zitierten Literatur schließt sich dem letzten Abschnitt an.

1 Einleitung

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G protein-coupled receptors, GPCRs) stellen eine der größten Familien membranständiger Rezeptoren an Zelloberflächen des menschlichen Organismus dar (siehe http://www.gpcr.org/7tm). Durch den Empfang verschiedenster extrazellulärer Signale, wie zum Beispiel Hormone, Neurotransmitter, visuelle, gustatorische und olfaktorische Signale, und deren Übertragung in das Zellinnere, sind sie beteiligt an der Kontrolle physiologischer Vorgänge und unseres Verhaltens. Diese zentrale Bedeutung von GPCRs macht deutlich, dass sie in pathologische Prozesse und zahlreiche Krankheiten, wie kardiovaskulären und mental-psychischen Störungen, Degeneration der Netzhaut, Krebs und AIDS involviert sein können [1, 2, 3, 4, 5]. Zudem entsprechen über 3% der menschlichen Gene GPCR-Genen, weshalb GPCRs pharmakologisch von sehr großer Bedeutung sind und mehr als die Hälfte aller neu eingeführten Arzneistoffe gegen diese Rezeptoren gerichtet sind, um deren Wirkung zu stimulieren oder zu blockieren [6, 7].

Die Bindung von spezifischen extrazellulären Liganden induziert in GPCRs eine Konformationsänderung, wodurch diese aktiviert werden (siehe z. B. Übersichtsartikel [8]*). Der so aktivierte Rezeptor (R*) kann dann auf der Innenseite der Zellmembran interagierende heterotrimere G-Proteine, bestehend aus einer Gα•GDP

Untereinheit und einem Dimer aus einer Gβ und einer Gγ Untereinheit, durch Nukleotidaustauschkatalyse aktivieren [9] [10]*. Nach erfolgtem GDP→GTP Austausch, können Gα•GTP und das Gβγ Dimer ihrerseits als Transducer durch Protein-Protein-Interaktion das extrazelluläre Signal an intrazelluläre Effektorproteine weiterleiten (Abbildung 1, Hofmann & Ernst (2001), Ref. [8]*). Topologisch zeichnen sich GPCRs durch sieben Helices aus, die die Zellmembran durchspannen, weshalb sie auch Sieben-Transmembran-Rezeptoren (7TM-Rezeptoren) genannt werden. Die intrazellulären Peptidschleifen verbinden die Transmembranhelices und leiten das Signal für den Nukleotidaustausch zum G-Protein weiter [11, 12, 13] [14]*. Zusammen mit dem C-terminalen Bereich bilden sie die cytosolische Domäne.

Rhodopsin ist das Sehpigment in der Stäbchenzelle der Säugetierretina und dient dem Sehen bei Dämmerlicht ([15], siehe Abbildung 4, Hofmann & Ernst (2001), Ref. [8]*). Es ist der Archetyp der größten von drei GPCR-Familien, der Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs, die mehr als 90% aller GPCRs umfasst [16, 17, 18]. Durch zahlreiche Studien seit der Klonierung von Rhodopsin im Jahr 1983 [19] konnten viele für GPCRs grundlegende Prinzipien aufgeklärt werden. Dies war nicht zuletzt deshalb möglich, weil Rhodopsin etwa 90% der Membranproteine in Diskmembranen des Stäbchenaußensegments ausmacht, und Techniken zur Reinigung großer Mengen von funktionellem Protein entwickelt wurden. Über das G-Protein der Stäbchenzelle, das Transducin, Gt, wird Rhodopsin an den Effektor, eine cGMP spezische Phosphodiesterase, gekoppelt und kann so den Spiegel des *second messenger* cGMP senken. Dies führt zur Hyperpolaristaion der Plasmamembran durch Schließung cGMP-abhängiger Kationenkanäle und somit zur Umwandlung eines Lichtsignals in ein elektrisches Signal.

Als Sehpigment besteht Rhodopsin aus einem Apoprotein (Opsin) und einem Chromophor, der lichtempfindlichen prosthetischen Gruppe Retinal. Dieses Aldehyd-Derivat des Vitamin A ist im Grundzustand des Rhodopsins in der 11-*cis*-Konformation kovalent als inverser Agonist gebunden (Abbildung 1, Ernst & Bartl (2002), Ref. [20]*). Absorbiert Rhodopsin ein Photon, so isomerisiert das Retinal in die agonistische all-*trans*-Konformation und leitet damit die Aktivierungsreaktion des Rhodopsins ein, die nach Millisekunden zu einer aktiven Rezeptorkonformation

R* führt [20, 21, 22, 23]*. Die Ausbildung von R* ist mit dem Durchlaufen verschiedener Photoprodukte mit charakteristischen spektralen Absorptionseigenschaften verbunden und erlaubt vielfältige spektroskopische Untersuchungen (Übersicht in [24, 25, 26, 27] und [20, 22]*). Auch sind aus EPR-, NMR- und Fluoreszenzdepolarisationsuntersuchungen Informationen über die Proteindynamik im dunkeladaptierten Grundzustand und lichtaktivierten Zustand bekannt [28, 29, 30, 31]. Die Möglichkeit der Signaltriggerung durch Licht bei Rhodopsin hat gegenüber anderen GPCRs den Vorteil, dass Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus erleichtert werden.

Vor kurzem konnte auch die Kristallstruktur des inaktiven Rhodopsin Grundzustandes gelöst werden [32, 33, 34]. Sie stellt einen Durchbruch in der GPCR Forschung dar, weil sie die bislang einzige bekannte Struktur eines GPCR ist, und die Modellierung anderer GPCRs erlaubt [35]. Beim Rhodopsin wurden bereits zuvor wichtige Meilensteine der GPCR Forschung erreicht. Hierzu gehören die Bestimmung der Primärstruktur [19, 36, 37], der Einsatz des ersten synthetischen GPCR Gens [38], die Herstellung rekombinanter Zelllinien zur Expression großer Rezeptormengen [39], und die Detektion von Konformationsänderungen bei der Rhodopsinaktivierung [40]. Auch wurde mit Transducin, dem ans Rhodopsin koppelnden G-Protein, die erste Kristallstruktur eines G-Proteins gelöst [41, 42].

Obwohl viel über dieses Rezeptor/G-Proteinsystem bekannt ist, sind entscheidende Fragen noch unbeantwortet: Wie wird Rhodopsin durch Isomerisierung des Retinals aktiviert? Wie katalysiert Rhodopsin den Nukleotidaustausch im Transducin? Abbildung 2 in Hofmann & Ernst (2001), Ref. [8]* zeigt identifizierte Interaktionsstellen an Rhodopsin und Transducin, jedoch ist weder eine räumliche noch temporale Zuordnung der zugehörigen Bindungsstellen bekannt. In den folgenden drei Abschnitten werden meine Beiträge im Rahmen meiner Habilitation zur Beantwortung dieser Fragen diskutiert.

1 Einleitung

Übersichtsarbeiten zu Abschnitt 1 Einleitung:

Hofmann, K.P. & Ernst, O.P. (2001) Vom Licht zum Sehen - Biophysik der visuellen Signaltransduktion. *Z. Med. Phys.* **11**, 217-225.

Ernst, O.P. & Bartl, F.J. (2002) Active States of Rhodopsin. *Chembiochem* **3**, 968-974.

Okada, T., Ernst, O.P., Palczewski, K., & Hofmann, K.P. (2001) Activation of G-protein-coupled receptors: New insights from structural and biochemical studies of rhodopsin. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 318-324. 6759163

Ernst, O.P., Hofmann, K.P., & Palczewski, K. (2003) Vertebrate rhodopsin. Invited review. In: *Photoreceptors and Light Signalling*, Batschauer, A., ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Hofmann, K.P., Jäger, S., & Ernst, O.P. (1995) Structure and function of activated rhodopsin. Invited review. *Isr. J. Chem.* **35**, 339-355.

2 Methodische Entwicklungen

Aufgrund seiner besonderen biophysikalischen Eigenschaften bietet das Rhodopsinsystem den Vorteil, dass die Rhodopsin/Transducin-Interaktion und die G-Protein Aktivierung mit *intrinsic monitoring* verfolgt werden können. Mit spektroskopischen Methoden kann insbesondere die zeitliche Änderung biophysikalischer Eigenschaften der Reaktionspartner gemessen werden. Vorzüge und Weiterentwicklungen verschiedener Methoden sind ausführlich in Ernst et al. (2000), Ref. [43]*, beschrieben. Eine für Diskmembranen der Stäbchenaußensegmente etablierte Methode stellt der kinetische Lichtstreumonitor dar [44, 45, 46]. Die Größe dieser mit Rhodopsin gefüllten Membranpartikel erlaubt die Echtzeit-Messung der lichtinduzierten Bindung von nicht-membrangebundenem Transducin an die Membran als Zunahme der Intensität des unter einem geeigneten Winkel gestreuten nahen Infrarotlichts (Bindungssignal; Abbildung 4, Ernst et al. (2000), Ref. [43]*). In Gegenwart von GTP hingegen führt die Lichtaktivierung des Rezeptors zur Aktivierung des Transducins. Die damit verbundene Dissoziation der bereits im Dunkelzustand membrangebundenen Transducin Fraktion von der Diskmembran lässt sich durch eine entsprechender Abnahme der Lichtstreuintensität verfolgen (Dissoziationssignal). Änderungen der Lichtstreuintensität korrelieren hierbei mit der Änderung der Proteinmasse an der Oberfläche der Diskmembranen [46]. Um rekombinantes Rhodopsin oder Rhodopsinmutanten mit diesen Methoden untersuchen zu können, müssen die solubilisierten und gereinigten Proteine in Lipidvesikel rekonstituiert werden. Da in der Regel die Proteinmenge gering ist, mussten wir entsprechende *micro-scale* Methoden für die Herstellung der Rhodopsin-Lipidvesikel und die Charakterisierung von Rhodopsinmutanten entwickeln [14, 43]*.

Ähnlich wie beim Lichtstreumonitor können Massenänderungen an der Oberfläche von entsprechenden Biosensor-Chips mit Hilfe von Techniken, die auf evaneszenten Feldern an der Grenzfläche zweier optischer Medien beruhen, gemessen werden. Hierzu gehören die Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) Technik und die auf einem planaren Wellenleiter basierende *Resonant Mirror* Technik, die auf Änderungen des Brechungsindex (bzw. der Proteinmasse) im Bereich des evaneszenten Feldes reagieren. Dies ist z. B. der Fall, wenn ein Inter-

aktionspartner aus der umgebenden Lösung in den Bereich des evaneszenten Feldes diffundiert und an einen zweiten auf der Sensoroberfläche immobilisierten Interaktionspartner bindet [47, 48] [43]*.

In Kollaboration mit Stephan Heyse, Christoph Bieri und Horst Vogel von der ETH Lausanne (Schweiz) hatten wir uns zum Ziel gesetzt, ein immobilisiertes, planares Rhodopsin-Lipid-Doppelmembransystem auf einer Goldoberfläche zu rekonstituieren und mittels SPR-Technik die Interaktion mit Transducin zu messen. Einen Überblick über verschiedene Modellmembransysteme auf Biosensoren geben Referenzen [48, 49]. Wir haben uns für eine Festkörper-unterstützte Lipidmembran entschieden, die auf einem wenige Nanometer dicken Wasserfilm schwimmt und über hydrophile Verbindungsstücke geeigneter Länge an der Lipidkopfgruppe synthetischer Thiolipide [50] auf der planaren Goldschicht des SPR-Sensors verankert ist. Zudem sollte die Lipidmembran ein Streifenmuster im Mikrometer Maßstab aufweisen, bei dem Streifen mit fluiden Rhodopsin-Lipid-Doppelmembranen durch einen zweiten Streifentyp mit verankerter Lipidmembran begrenzt werden. Beim zweiten Streifentyp wird eine kovalent gebundene Thiolipid-Monoschicht durch eine zweite Lipidschicht zu einer im Idealfall rhodopsinfreien Doppelmembran ergänzt (siehe Abbildung 1, Heyse et al. (1998), Ref. [51]*). Dies hat den Vorteil, dass diese rhodopsinfreien Lipidmembran-Streifen als Referenzbereiche dienen können und 1-dimensionale bildgebende SPR-Messungen möglich werden. Bei der Funktionalisierung der Goldoberfläche mit Thiolipiden wurde zur Ausbildung des Streifenmusters UV-Lithographie eingesetzt. Durch einen s*elf-assembly* Prozess der Phospholipide und des Rhodopsins aus einer Detergenslösung wurden dann die Festkörper-unterstützten Lipidmembranen auf der funktionalisierten Goldoberfläche erzeugt [51]*.

Es gelang uns ein Modellsystem zu schaffen, das demonstrierte, dass GPCRs tatsächlich auf einer festen Sensoroberfläche immobilisiert und Echtzeitmessungen der GPCR/Transducin Interaktion mittels SPR untersucht werden können [51]*. Rhodopsin wurde bevorzugt in Bereiche mit Phospholipid-Doppelmembranen eingebaut und nur in sehr geringem Maß in Bereiche mit Thiolipidanker. Transducin zeigte eine Dunkelbindung an die Lipidmembran und war gleichmäßig über alle Bereiche der Festkörper-unterstützten Lipidmembran verteilt. Die ermittelte Affinität

war ähnlich der Affinität zu nativen Diskmembranen. Bei Lichtaktivierung des Rhodopsins konnte aufgrund der R*-Transducin Komplexbildung weiteres Transducin an die Membran gebunden werden. Die Rhodopsinaktivierung in Gegenwart von GTP führte wegen der G-Proteinaktivierung wie erwartet zu einer Dissoziation des Transducins von der Membran. Da bei diesen Experimenten, vergleichbar den oben beschriebenen Lichtstreuexperimenten, Änderungen der Proteinmasse an der Lipidmembran stattfinden, wurden den Lichtstreumessungen analoge Bindungs- und Dissoziationssignale erhalten.

Parallel zu den Arbeiten in Lausanne mit dem von Stephan Heyse als Eigenbau realisiertem SPR-Meßgerät ist es uns gelungen, vergleichbare Bindungssignale mit einem kommerziell erhältlichen *Resonant Mirror* Gerät, dem IAsys-System (Thermo Labsystems, Affinity Sensors Division, Cambridge, England), in Berlin zu messen. Hierzu wurden Biotin-modifizierte Lipide durch kurze Ultraschallbehandlung in Diskmembranen inkorporiert und benutzt, um die Diskmembranen über einen immobilisierten anti-Biotin Antikörper auf der Oberfläche des Biosensors zu verankern. Es konnten zeitaufgelöste Bindungs- und Dissoziationssignale des Transducins gemessen werden und eine Rückbindung des Transducins an die Diskmembran nach vollständiger GTP-Hydrolyse verfolgt werden (Abbildung 7, Ernst et al. (2000), Ref. [43]*).

Mit Hilfe der Verankerungstechnik via Biotin ist es uns in einem nächsten Schritt gelungen, Rhodopsin mit einheitlicher Orientierung auf der SPR-Sensoroberfläche zu immobilisieren [52]*. Geminale Hydroxylgruppen in den Kohlenhydrat-Modifikationen in der N-terminalen Region des Rhodopsins wurden mit Natriumperiodat oxidiert und an Biotin-Hydrazid gekoppelt. Der N-Terminus des Rhodopsins wurde so mit einem Biotin-Affinitätsanhängsel versehen und konnte über ein Streptavidin-Verbindungsstück an einer mit Biotin funktionalisierten Sensoroberfläche immobilisiert werden [53]. Gleichzeitig wurde zur Strukturierung der Sensoroberfläche anstatt der UV-Lithographie eine Mikrokontakt-Stempeltechnik, sogenanntes *microcontact printing* [54], eingesetzt (siehe Abbildung 6, (Ernst et al. (2000), Ref. [43]*). Das immobilisierte Rhodopsin zeigte nun das gewünschte Verhalten: i) vernachlässigbare Immobilisation von Rhodopsin in den als Referenzbereich dienenden Streifen, ii) einen starken Kontrast der lichtinduzierten Transducin-Dissoziations-

signale in Proben- bzw. Referenzstreifen, und iii) die Rhodopsinaktivität im Probenbereich konnte durch den Lichtumsatz bzw. die Retinalmenge gesteuert werden. Die so erhaltene Dosis-Wirkungskurve lässt vermuten, dass diese Technik in Zukunft auch auf andere GPCRs angewendet werden kann und das Potenzial besitzt, als Chip-basierte Methode in der Wirkstoffsuche der pharmazeutischen Industrie eingesetzt zu werden [53].

Vor kurzem konnte die Firma Biacore (Uppsala, Schweden), unterstützt durch Probenmaterial und Kenntnisse aus unserem Institut, erste Rhodopsin/Transducin Interaktionen in rekonstituierten Lipidmembranen mit dem von Biacore hergestellten SPR-Gerät (Biacore-System) messen [55]. Ebenfalls wurden Messungen zur Interaktion zwischen Transducin und solubilisiertem Rhodopsin in Detergenslösung mit einem Biacore-System durchgeführt [56].

In einem weiteren Schritt konnten wir die Technik der Rhodopsin-Verankerung über den N-Terminus vereinfachen. Dazu exprimierten wir in COS-1 Zellen Rhodopsinfusionsproteine, die über eine N-terminale Biotinylierungssequenz verfügen. Durch Koexpression des Enzyms Biotin Protein Ligase konnte ein Großteil der Fusionsproteine posttranslational mit Biotin modifiziert werden. Diese Biotinmodifikation erlaubt die Reinigung des Rezeptors über monomeres Avidin und die Rezeptor-Immobilisierung auf der Sensoroberfläche von SPR oder *Resonant Mirror* Geräten und anschließende funktionelle Rekonstitution des Rhodopsins in Lipidmembranen (Qun Liu, Klaus Peter Hofmann, Oliver Ernst, Manuskript in Vorbereitung). Die Expression als ortsspezifisch biotinylierter Rezeptor unterstützt die Charakterisierung von Rhodopsinmutanten, kann aber sehr wahrscheinlich auch auf andere GPCRs übertragen werden. Die Fusion der nativen N-terminalen Rhodopsinsequenz an olfaktorische GPCRs erlaubte die Generierung einer Expressionsbibliothek und die Untersuchung der Wechselwirkung olfaktorischer GPCRs mit verschiedenen Duftstoffen [57]. Es ist deshalb anzunehmen, dass auch der mit der Biotinylierungssequenz modifizierte N-Terminus von Rhodopsin die Expression anderer GPCRs und deren Analyse mit Evaneszentfeld-Techniken ermöglicht.

2 Methodische Entwicklungen

Arbeiten zu Abschnitt 2 Methodische Entwicklungen:

Ernst, O.P., Bieri, C., Vogel, H., & Hofmann, K.P. (1999) Intrinsic biophysical monitors of transducin activation: Fluorescence, UV/Vis spectroscopy, light scattering and evanescent field techniques. *Meth. Enzymol.* **315**, 471-489.

Heyse, S., Ernst, O.P., Dienes, Z., Hofmann, K.P., & Vogel, H. (1998) Incorporation of rhodopsin in laterally structured supported membranes: Observation of transducin activation with spatially and time-resolved surface plasmon resonance. *Biochemistry* **37**, 507-522.

Bieri, C., Ernst, O.P., Heyse, S., Hofmann, K.P., & Vogel, H. (1999) Micropatterned immobilization of a G protein-coupled receptor and direct detection of G protein activation. *Nature Biotechnol.* **17**, 1105-1108.

3 Aktive Konformation des Rhodopsins

Die Belichtung von Rhodopsin führt zu einer 11-*cis* → *trans* Isomerisierung des Chromophors im Femtosekundenbereich. Zwei Drittel der durch das Photon aufgenommenen Energie werden zunächst im Photoprodukt Bathorhodopsin gespeichert und dann sukzessiv durch thermische Relaxation abgegeben. Dabei durchläuft der Rezeptor verschiedene weitere Photoprodukte, die nach Millisekunden in ein Gleichgewicht von Metarhodopsin Konformationen führt (siehe z. B. eigene Übersichtsartikel [20, 21, 22]*). Metarhodopsin I (Meta-I, λ_{max} = 478 nm) steht mit seinem Folgeprodukt Metarhodopsin II (Meta-II, λ_{max} = 380 nm) im Gleichgewicht und kann spektroskopisch durch UV/vis und FTIR Spektroskopie unterschieden werden [20, 23]*. Die Verschiebung des Absorptionsspektrums beruht auf einer Deprotonierung der Schiffbasenbindung zwischen Retinal und Lys-296 in Transmembranhelix 7, die beim Übergang von Meta-I nach Meta-II erfolgt. Dadurch wird eine stabilisierende Salzbrücke zwischen dem Schiffbasenproton und dem Gegenion Glu-113 in Transmembranhelix III aufgebrochen, und es resultiert eine Protonierung des Gegenions [58] (siehe hierzu Abbildung 3 des Übersichtsartikels Hofmann & Ernst (2001), Ref. [8]*, in der Einleitung). Durch eine anschließende Protonenaufnahme aus dem wässrigen Milieu in der cytoplasmatischen Domäne des Rhodopsins kommt es zu einer weiteren Konformationssänderung. Diese ist mit keiner Änderung des Absorptionsspektrums verbunden und führt zu zwei im Gleichgewicht stehenden Subkonformationen des Meta-II, Meta-IIa und Meta-IIb [59]. Die Protonenaufnahme in Meta-II ist an Glu-134 gekoppelt [60, 61], einem Aminosäurerest des in GPCRs hochkonservierten D(E)RY Motivs am cytoplasmatischen Ende der Transmembranhelix III (Glu-134/Arg-135/Tyr-136 in Rhodopsin) [62].

Aus zeitaufgelösten Absorptionsmessungen wurde geschlossen, dass Rhodopsin zur Ausbildung des Meta-II Zustandes neben dem klassischen Reaktionsweg [27, 63] zu geringen Anteilen einen etwas anderen Reaktionsweg einschlagen kann [64, 65]. Hierbei deprotoniert die Schiffbase noch vor Bildung des Meta-I Zustandes, im Meta-I Vorläuferprodukt, Lumirhodopsin, und gelangt auf einem Parallelweg über ein so genanntes Meta-I_{380} Produkt zum Meta-II Zustand. Dieser Reaktionsweg wird in Detergenslösung verstärkt beschritten [66]*. Die Solubilisierung des Rhodopsins

mit Detergens erlaubte es auch, die beiden von Arnis und Hofmann (1993) beschriebenen Meta-II Isoformen, Meta-IIa und Meta-IIb, kinetisch zu unterscheiden [59]. Um die bekannten lichtinduzierten Protonierungsänderungen des Rhodopsins, d. h. Deprotonierung der Schiffbase und Protonenaufnahme aus der Lösung, im solubilisierten Zustand zeitaufgelöst zu untersuchen, haben wir in Kollaboration mit dem Labor von Dave Kliger (University of California, Santa Cruz, USA) Blitzlichtphotolysemessungen an gereinigtem Rhodopsin in Gegenwart des Farbstoffes Bromkresolrot durchgeführt. Durch Analyse der Daten mittels Singulärwertzerlegung und globaler exponentieller Anpassung konnten Informationen zu den Spektren der einzelnen Intermediate und zu deren zeitlicher Entstehung erhalten werden. Die Ergebnisse konnten die früheren Beobachtungen der beiden Labore bestätigen und führten zu einem Reaktionsschema für die Meta-II Bildung in Detergenslösung, das neben dem Meta-I_{380} Produkt die beiden Meta-II Subformen beeinhaltet [66]*.

Erst mit der Meta-II Konformation ist die aktive Form des Rhodopsins erreicht, die mit dem Transducin interagiert und den Nukleotidaustausch katalysiert [67, 68]. Es existiert experimentelle Evidenz, dass im nukleotidfreien Komplex mit Transducin die Meta-IIb Konformation vorliegt [61, 69] und Glu-134 in diesem Komplex protoniert ist [61]. Die konservierte ERY-Region und insbesondere die Protonierung von Glu-134 spielen eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung des aktiven Rhodopsinzustandes. Zu einem analogen Schluss sind wir für den humanen Thrombinrezeptor PAR1 (Protease-aktivierter Rezeptor 1) gekommen [70] [71]*. Diesen Rezeptor konnten wir in Zusammenarbeit mit dem Labor von Günter Schultz (Freie Universität Berlin) funktionell in Sf9 Insektenzellen exprimieren. Die Aktivierung des PAR1 kann einerseits durch proteolytische Spaltung des N-terminalen Bereichs von PAR1 mit der Serinprotease Thrombin oder andererseits durch Zugabe eines von diesem Bereich abgeleiteten Thrombinrezeptor-aktivierenden Hexapeptids, dem Agonisten TRAP6 (SFLLRN-NH_2), erfolgen. Der exprimierte und durch TRAP6 aktivierte Thrombinrezeptor in den Insektenzellmembranen war in der Lage den Nukleotidaustausch bzw. die GTPγS-Aufnahme durch Transducin zu katalysieren. Eine Untersuchung der pH-Abhängigkeit der PAR1 katalysierten Transducin-aktivierung zeigte, dass auch bei diesem Rezeptor, trotz des unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus, die aktive Konformation wie beim Rhodopsin durch die

Protonierung einer titrierbaren Gruppe (apparenter pK_a von 6,4) bestimmt wird [71]*. Ein Kandidat für diese titrierbare Gruppe ist Asp-199, das Pendant zu Glu-134 in Rhodopsin. Analoge Protonierungsänderungen im D(E)RY Motiv bei der Rezeptoraktivierung wurden auch für den α_{1B}-adrenergen Rezeptor vorgeschlagen [72]. Eine Regulation der Rezeptoraktivität durch Protonierung, evtl. neben dem D(E)RY Motiv auch in anderen Regionen [73], scheint ein allgemeines Prinzip für die Rezeptoraktivierung darzustellen [21]*. Die Metarhodopsin Zustände können hierbei als Analoge der GPCR Zustände niedriger und hoher Ligandaffinität aufgefasst werden, bei denen die aktive Rezeptorkonformation durch Protonierung bzw. G-Proteinbindung stabilisiert wird [21]*.

Die Protonierung von Glu-134 zur Stabilisierung der aktiven Rhodopsin-Konformation wird ebenfalls in Experimenten mit Rhodopsinpigmenten, die synthetische Retinalanaloga enthalten, deutlich [74]*. Rhodopsin unterscheidet sich von anderen GPCRs durch den bereits im Grundzustand gebunden Liganden. Dieser ist zudem durch eine kovalente Schiffbasenbindung in der Retinalbindungstasche fixiert. Dies hat für das Rhodopsin zwei entscheidende Vorteile: i) das 11-*cis*-Retinal inaktivert als inverser Agonist das Apoprotein Opsin und verhindert eine spontane Aktivierung des Rezeptors äußerst effektiv, d.h. es dauert daher (virtuell) tausende von Jahren, bis ein Rhodopsinmolekül in der Retina thermisch aktiviert wird. ii) Die Retinal-Protein Interaktionen bewirken eine Stabilisierung des Grundzustandes, die nur durch Energie-Zufuhr in Form von geeigneten Lichtquanten überwunden werden kann [32, 33, 34] [21]*. Dies geschieht mit einer sehr hohen Quantenausbeute von 67% [75] und erlaubt der Photorezeptorzelle auf einzelne Lichtquanten zu reagieren [76]. Durch die Lichtaktivierung ist es möglich, beim Rhodopsin die Aktivität gegenüber dem G-Protein um etwa 10 Größenordnungen zu steigern (siehe z. B. [8, 21]*). Rhodopsin stellt also einen molekularen Schalter dar, im Gegensatz zu anderen GPCRs, die durch Ligandenbindung ihre Aktivität gegenüber dem G-Protein in wesentlich geringerem Umfang modulieren.

Retinalanaloga werden in der Rhodopsinforschung seit Jahrzehnten eingesetzt, um Informationen zu gewinnen über die Wechselwirkungen des Retinals mit Aminosäureseitenketten in der Retinalbindungstasche, den Einfluss der Modifikation auf

den Grundzustand, und die Photoreaktion des Rhodopsins [77, 78, 79]. In einem Konzept zur Aktivierung des Rhodopsins werden sterische Interaktionen des Retinals mit der Proteinumgebung angenommen, die die photochemische Reaktion zum aktiven Zustand steuern [80, 81], in Analogie zu einem Aktivierungskonzept für das sensorische Rhodopsin I in *Halobacterium halobium* [80]. Eine hierfür wichtige Rolle scheint die Methylgruppe am Kohlenstoffatom in Position 9 der Retinalpolyenkette zu spielen, da Rhodopsinpigmente, denen diese 9-Methylgruppe fehlt, sogenanntes 9-demethyl-Rhodopsin (mit 9-demethyl-Retinal rekonstituiertes Rhodopsin), nur eine geringe G-Proteinaktivierung aufweisen [82].

Wir konnten in Zusammenarbeit mit Wolfgang Gärtner und Andreas Ockenfels (Max-Planck-Institut Mülheim) zeigen, dass auch beim 9-demethyl-Rhodopsin nach Lichtaktivierung Zustände eingenommen werden, die Meta-I und Meta-II vergleichbar sind. Das Gleichgewicht zwischen den Meta-Zuständen ist jedoch aufgrund der Retinalmodifikation stark auf die inaktive Meta-I Seite verschoben, was die geringe Aktivität gegenüber dem G-Protein erklärt [74]*. Damit wurde auch für das Rhodopsin gezeigt, dass wie bei anderen GPCRs, die agonistischen Eigenschaften des Liganden durch Modifikation der chemischen Struktur beeinflusst werden können. Das Belichten des rhodopsingebundenen 9-demethyl-Retinals führt somit zur Bildung eines partiellen Agonisten *in situ* [74]*. Dieser Befund wurde von anderen durch Infrarotspektroskopie bestätigt [83]. Neben der Auswirkung der Retinalmodifikation in den Meta-Zuständen ist ein Einfluss auf die frühen Photointermediate und deren Bildung wahrscheinlich [84, 85, 86]. Von besonderer Bedeutung war unsere Beobachtung, dass durch Erniedrigung des pH-Wertes das Meta-I / Meta-II Gleichgewicht des 9-demethyl-Rhodopsins auf die Seite des aktiven Meta-II verschoben werden konnte. Zudem zeigte eine mit 9-demethyl-Retinal regenerierte Rhodopsinmutante mit Glu→Gln Substitution an Position 134 eine volle Meta-II Bildung [74]*. Diese Mutation, die quasi die Protonenaufnahme vorwegnimmt, konnte auch die volle katalytische Aktivität bezüglich der G-Protein Aktivierung restaurieren.

Wir haben deshalb dem Retinal in den Meta Zuständen eine Gerüstfunktion bei der Adjustierung von Protonen-Akzeptor und -Donorgruppen zugeschrieben, die die

Protontransfer-Reaktionen bei den Meta-I → Meta-IIa und Meta-IIa → Meta-IIb Übergängen fördert und dadurch die Bildung der aktiven Konformation unterstützt [74]*.

In der Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs gibt es ein zweites konserviertes Motiv, das NPxxY$(x)_{5,6}$F Motiv. Es besteht aus Asn-302/Pro-303/xxx/xxx/Tyr-306 am cytosolischen Ende der Transmembranhelix VII und Phe-313 in der darauffolgenden, parallel zur Membran verlaufenden, cytosolischen Helix 8 (siehe Abbildung 1, Fritze et al. (2003), Ref. [87]*). In der Kristallstruktur des Rhodopsins erkennt man eine hydrophobe Interaktion zwischen Tyr-306 und Phe-313 [32]. Verschiedene Untersuchungen inklusive eigener Mutationsstudien in Helix 8 [88]* legen nahe, dass bei Belichtung des Rhodopsins Konformationsänderungen in dieser Helix stattfinden [29, 31, 89, 90, 91, 92, 93].

In Zusammenarbeit mit dem Labor von Kris Palczewski (University of Washington, Seattle, USA) führten wir Experimente durch, um die Rolle dieses konservierten Motives bei der Rezeptoraktivierung zu verstehen. Dazu exprimierten wir Rhodopsinmutanten, bei denen je ein konservierter Aminosäurerest dieses Motivs durch Alanin ersetzt war. Durch Regeneration mit 11-*cis*-Retinal und 9-demethyl-Retinal konnten wir den Einfluss verschieden starker Agonisten auf die Bildung der aktiven Rhodopsinkonformation untersuchen. UV-vis Spektroskopie erlaubte es, durch Messung des Protonierungszustandes der Retinal-Schiffbase den Aktivierungszustand des Rezeptors im Bereich der Chromophorbindungstasche zu bestimmen. Durch Messung der G-Proteinaktivierung wurden Informationen über den Aktivierungszustand der Interaktionsdomäne zum G-Protein erhalten.

Wir fanden, dass Alanin-Substitutionen des Tyr-306 oder Phe-313 die lichtinduzierte Deprotonierung der Retinalschiffbase, d. h. die Ausbildung einer aktiven Rezeptorkonformation im Bereich der Retinalbindungstasche fördert. Dies spiegelt sich jedoch nicht im Aktivierungszustand der cytoplasmatischen Rezeptoroberfläche wider, da diese Rhodopsinmutanten nur eine geringe G-Proteinaktivierung zeigten. Um zu überprüfen, ob die hydrophobe Interaktion zwischen den Seitenketten der Aminosäurereste 306 und 313 für die G-Protein Interaktion benötigt wird, wurden diese Reste durch Cystein ausgetauscht und die Möglichkeit geschaffen, durch Ausbilden

einer Disulfidbrücke diese Seitenketten kovalent zu verbinden. Zusammen mit den Untersuchungen der Doppelcysteinmutante schlossen wir, dass die hydrophobe Interaktion zwischen Tyr-306 und Phe-313 in der Meta-II Konformation aufgehoben ist und beide Aminosäurereste zur Ausbildung einer Bindungsstelle für das Transducin beitragen. Durch Analyse der Ala-Substitutionen in Kombination mit der Glu-134 → Gln Substitution und Regeneration mit 9-demethyl-Retinal konnten wir Informationen über die Kopplung zwischen Retinal-Bindungsstelle und der cytoplasmatischen Oberfläche erhalten. Nur im Falle der Ala-Substitutionen von Asn-302 oder Pro-303 konnte die durch 9-demethyl-Retinal verminderte Aktivität durch die Glu-134 → Gln Substitution in gewohntem Maße restauriert werden.

Entsprechend unserem Modell [87]* dient das NPxxY$(x)_{5,6}$F Motiv der Stabilisierung des Grundzustands. Asn-302 und Pro-303 kommt eine Rolle bei der Übertragung der lichtinduzierten Änderung der Retinalkonformation, dem Aktivierungssignal, von der Retinalbindungstasche zur cytoplasmatischen Helix 8 zu. Das Aufbrechen der hydrophoben Interaktion zwischen Tyr-306 und Phe-313 stellt dabei einen Teil der für die Interaktion mit dem Transducin nötigen strukturellen Änderungen dar. Mit unserer Arbeit wurden zwei weitere Module, die NP und die Y$(x)_{5,6}$F Submotive, identifiziert, die zusammen mit dem D(E)RY Motiv und der Retinalbindungsstelle das Retinal in die Lage versetzen, die Sieben-Transmembranhelix-Struktur zu funktionalisieren [87]*. Aufgrund der hohen Konserviertheit des NPxxY$(x)_{5,6}$F Motivs [62], ist anzunehmen, dass sich die am Rhodopsin gewonnenen Erkenntnisse auf den größten Teil der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs übertragen lassen.

3 Aktive Konformation des Rhodopsins

Arbeiten zu Abschnitt 3 Aktive Konformation des Rezeptors:

Szundi, I., Mah, T.L., Lewis, J.W., Jäger, S., Ernst, O.P., Hofmann, K.P., & Kliger, D.S. (1998) Proton transfer reactions linked to rhodopsin activation. *Biochemistry* **37**, 14237-14244.

Seibert, C., Harteneck, C., Ernst, O.P., Schultz, G., & Hofmann, K.P. (1999) Activation of the rod G-protein Gt by the thrombin receptor (PAR 1) expressed in Sf9 cells. *Eur. J. Biochem.* **266,** 911-916.

Meyer, C.K., Böhme, M., Ockenfels, A., Gärtner, W., Hofmann, K.P., & Ernst, O.P. (2000) Signaling states of rhodopsin: Retinal provides a scaffold for activating proton transfer switches. *J. Biol. Chem.* **275**, 19713-19718.

Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K.P., & Ernst, O.P. Role of the Conserved NPXXY$(X)_{5,6}$F Motif in the Rhodopsin Ground State and During Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **100**, 2290-2295.

4 Rezeptor / G-Protein Interface

Zu den lichtinduzierten Konformationsänderungen der cytoplasmatischen Rhodopsinoberfläche, dem Interface zum G-Protein, gehören die im vorigen Abschnitt beschriebenen Änderungen in den D(E)RY und NPxxY$(x)_{5,6}$F Regionen. Aus umfangreichen ESR-Studien der Arbeitsgruppen Hubbell und Khorana, in denen ESR-Sonden durch ortsgerichtete Cys Mutagenese (*site-directed spin labeling*) [30] an allen Stellen der cytoplasmatischen Oberfläche eingebracht wurden, weiß man, dass sich der cytoplasmatische Teil der sechsten Transmembranhelix im solubilisierten Rhodopsin nach Lichtaktivierung aus dem Sieben-Helix-Bündel herausbewegt [40, 94]. Neben dieser großen Helixbewegung über 6-8Å gibt es noch kleinere Bewegungen der cytoplasmatischen Enden der Transmembranhelices II und VII [29]. Wann die dominante Bewegung der Transmembranhelix VI erfolgt, beim Übergang von Meta-I → Meta-IIa oder Meta-IIa → Meta-IIb, ist nicht bekannt und Gegenstand gemeinsamer Untersuchungen mit dem Labor von Wayne Hubbell (University of California, Los Angeles, USA). Diese Konformationsänderungen ermöglichen dann die Interaktion des Transducins mit den bekannten Bindungsstellen am Rhodopsin, der zweiten und dritten cytoplasmatischen Schleife und der cytoplasmatischen Helix 8 (siehe Abbildung 2, Hofmann & Ernst (2001), Ref. [8]*, in der Einleitung und Refs. [95, 96, 97] [88]*).

Als Bindungsstellen am G-Protein wurden die C- und N-terminalen Bereiche der Gtα Untereinheit [98, 99, 100, 101, 102] und der farnesylierte C-terminale Bereich der Gγ Untereinheit identifiziert [103]. Untersuchungen am α_2-adrenergen Rezeptor lassen vermuten, dass auch der C-terminale Bereich der Gβ Untereinheit mit dem Rhodopsin interagiert [104]. Eine gegenseitige Zuordnung der Bindungsstellen an Rhodopsin und Transducin wurde erst in den letzten Jahren begonnen und liefert noch kein genaues Bild der Interaktion im Komplex aus aktiviertem Rhodopsin und Transducin [99, 100, 105, 106] [88]*.

Die Beteiligung der cytoplasmatischen Helix 8 des Rhodopsins (früher als vierte cytoplasmatische Schleife bezeichnet) bei der Interaktion mit Transducin wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (siehe Ref. [105]). Um die Rolle dieser cyto-

plasmatischen Helix zu klären, haben wir in Zusammenarbeit mit dem Labor von Tom Sakmar (Rockefeller University, New York, USA) und Peter Henklein (Institut für Biochemie, Charité, Humboldt Universität Berlin) Rhodopsinmutanten untersucht, bei denen Teile dieser Helix gegen Sequenzen aus dem β_2-adrenergen Rezeptor ausgetauscht wurden [88]*. Wir haben hierzu eine neue Methode entwickelt, um die Bindung von Transducin und synthetischen Peptiden, die von den C-Termini der Gtα und der farnesylierten Gγ Untereinheiten abgeleitet waren, zu erforschen. Diese Methode beruht auf der Photolyse von Rhodopsin im Meta-II Zustand [69]. Wird Meta-II mit blauem Licht belichtet, bilden sich mit unterschiedlicher Kinetik zwei Photoprodukte aus, P470 und P500, deren Absorptionsmaxima gegenüber Meta-II rotverschoben sind. Das langsamer gebildete Produkt P500 (Entstehung im Millisekundenbereich) hat ein Absorptionsspektrum, das dem Rhodopsingrundzustand ähnelt, stellt jedoch ein eigenes Photoprodukt mit protonierter Schiffbase und Retinal in der all-*trans* Konformation dar [107].

Wir konnten zeigen, dass es möglich ist, die Entstehung dieses Photoproduktes durch die Bindung von Transducin oder den C-terminalen Gtα und Gγ Peptiden konzentrationsabhängig zu unterdrücken [88, 108]*. Damit war eine Methode entwickelt, die spezifisch die Rezeptor-G-Protein-Interaktion im Komplex aus aktiviertem Rhodopsin und Transducin bzw. Transducinfragmenten prüft. Unsere Untersuchungen identifizierten eine Tripeptidsequenz (Asn-310/Lys-311/Gln-312) im N-terminalen Bereich der cytoplasmatischen Helix 8 als entscheidend für die Interaktion mit Transducin, während der C-terminale Bereich der Helix nicht für die Interaktion wichtig ist. Die Aminosäurereste 310-312 liegen im $NPxxY(x)_{5,6}F$ Motiv zwischen Tyr-306 und Phe-313, die über ihre hydrophoben Seitenketten interagieren. Circulardichroismus Studien aus dem Labor Sakmar an synthetischen Peptiden, deren Sequenzen von der cytoplasmatischen Helix 8 abgeleitet waren, zeigten, dass die identifizierte Tripeptidsequenz (AS 310-312) wichtig ist für die Induktion der α-helicalen Konformation der cytoplasmatischen Helix 8 [92]. Dies steht in Einklang mit unseren Untersuchungen zum $NPxxY(x)_{5,6}F$ Motiv (siehe vorhergehender Abschnitt), die einen Mechanismus zur Konformationsänderung bzw. Aktivierung dieser Region aufzeigen.

Darüberhinaus haben unsere Studien gezeigt, dass diese Region sowohl an der Interaktion der C-terminalen Bereiche von Gtα als auch Gγ beteiligt ist, entweder durch direkte Bindung oder über allosterische Regulation. Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass die letzten in der Transducin-Kristallstruktur noch aufgelösten Aminosäurereste der Gtα und Gγ C-Termini, Asn-343 bei Gtα (350 Aminosäuren) und Glu-66 bei Gγ (71 Aminosäuren) über 42Å voneinander entfernt sind. Um diese Diskrepanz zu erklären, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die sich nicht gegenseitig ausschließen müssen: i) sowohl Transducin als auch Rezeptor durchlaufen relativ große Konformationsänderungen bei der Ausbildung des R*-Transducin Komplexes, ii) das Rhodopsin bindet als Rezeptordimer, iii) die C-Termini des Transducins binden nicht gleichzeitig an R*. In der Literatur gibt es Evidenz für Homo- und Heterodimerisierung von GPCRs [109, 110]. Für den inaktiven Dunkel-Grundzustand des Rhodopsins wurden vor kurzem sogar oligomere Strukturen aus Reihen von Rhodopsindimeren beschrieben [111].

Um den Prozess der Nukleotidaustauschkatalyse zu verstehen und Fragen der Stoichiometrie zwischen Rhodopsin und Transducin im R*-Transducin Komplex zu klären, wäre eine Kristallstruktur sehr wünschenswert. Eine solche Momentaufnahme eines bestimmten Zustandes innerhalb des Nukleotidaustausch-Prozesses kann jedoch nur wenig zum Ablauf dieser katalytischen Interaktion aussagen. Wir haben begonnen diesen dynamischen Prozess auf molekularer Ebene zu untersuchen und konnten dazu in Zusammenarbeit mit Oleg Kisselev (Saint Louis University, St. Louis, Missouri, USA) ein mechanistisches Modell angeben [108]*. Hierzu haben wir synthetische C-terminale Peptide der Gtα und Gγ Untereinheiten des Transducins mit verschiedenen spektroskopischen Methoden untersucht, sowohl in Form direkter Interaktion mit R* mittels Blitzlichtphotolyse als auch in Form von Kompetitionsexperimenten zur katalytischen Aktivierung des Transducins durch R*. Nach unseren Ergebnissen stabilisieren beide Peptide den Meta-II Zustand und kompetieren gegen Transducin um die Bindung an R*. Das farnesylierte, von der Gγ Untereinheit abgeleitete Peptid kann jedoch nicht das Gβγ Dimere in seiner Funktion beim Nukleotidaustausch in der Gtα Untereinheit ersetzen. Dies ist in Einklang mit neuen Untersuchungen, denen zufolge für das Gβγ Dimere eine Hebelfunktion beim

Öffnen der Nukleotidbindungstasche in Gtα vorgeschlagen wird [112]. Die beiden Peptide zeigen deutliche Unterschiede in ihrem Kompetitionsverhalten und ihrer pH-Abhängigkeit bei der Transducinaktivierung. Wir haben aus unseren Resultaten einen sequentiellen Mechanismus für die Bindung der C-terminalen Bereiche von Gtα und Gγ an R* geschlossen und dafür ein „sequential fit“ Modell vorgeschlagen [108]*. Hiernach führt die Bindung zwischen zwei zusammengehörenden Interaktionsdomänen an Transducin und Rhodopsin zu einer Konformationsänderung an Rezeptor und/oder G-Protein, die dann die Interaktion des zweiten Domänenpaares erlaubt.

Wir arbeiten zur Zeit daran, dieses Modell zu verfeinern, um die Reihenfolge der Interaktion der C-terminalen Bereiche von Gtα und Gγ mit R* zu klären und mit der GDP-Freisetzung bzw. GTP-Aufnahme zu korrelieren (Rolf Herrmann, Petra Henklein, Peter Henklein, Klaus Peter Hofmann, Oliver Ernst, Manuskript in Vorbereitung).

4 Rezeptor / G-Protein Interface

Arbeiten zu Abschnitt 4 Rezeptor / G-Protein Interface:

Ernst, O.P., Meyer, C.K., Marin, E.P., Henklein, P., Fu, W.-Y., Sakmar, T.P., & Hofmann, K.P. (2000) Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin α and γ subunits. *J. Biol. Chem.* **275**, 1937-1943.

Kisselev, O.G., Meyer, C.K., Heck, M., Ernst, O.P., & Hofmann, K.P. (1999) Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: evidence for a sequential fit mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **96,** 4898-4903.

Weitere Publikationen:

Ernst, O.P., Hofmann K.P., & Sakmar, T.P. (1995) Characterization of rhodopsin mutants that bind transducin but fail to induce GTP nucleotide uptake - classification of mutant pigments by fluorescence, nucleotide release, and flash-induced light scattering assays. *J. Biol. Chem.* **270**, 10580-10586.

Fitter, J., Ernst, O.P., Hauß, T., Lechner, R.E., Hofmann, K.P., & Dencher, N.A. (1998) Molecular motions and hydration of purple membranes and disk membranes studied by neutron scattering. *Eur. Biophys. J.* **27**, 638-645.

Fitter, J., Verclas, S.A.W., Lechner, R.E., Büldt, G., Ernst, O.P., Hofmann, K.P., & Dencher, N.A. (1999) Bacteriorhodopsin and rhodopsin studied by incoherent neutron scattering: dynamical properties of ground states and light activated intermediates. *Physica B* **266**, 35-40.

Pulvermüller, A., Gießl, A., Heck, M., Wottrich, R., Schmitt, A., Ernst, O.P., Choe, H.-W., Hofmann, K.P., & Wolfrum, U. (2001) Calcium dependent assembly of centrin/G-protein complex in photoreceptor cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2194-2203.

Literaturverzeichnis

[1] Rockman, H. A.; Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J. (2002): Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function, Nature 415, pp. 206-212.

[2] Schöneberg, T.; Schulz, A. and Gudermann, T. (2002): The structural basis of G-protein-coupled receptor function and dysfunction in human diseases, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 144, pp. 143-227.

[3] Rattner, A.; Sun, H. and Nathans, J. (1999): Molecular genetics of human retinal disease, Annu. Rev. Genet. 33, pp. 89-131.

[4] Berger, E. A.; Murphy, P. M. and Farber, J. M. (1999): Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease, Annu. Rev. Immunol. 17, pp. 657-700.

[5] Seifert, R. and Wenzel-Seifert, K. (2002): Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 366, pp. 381-416.

[6] Sautel, M. and Milligan, G. (2000): Molecular manipulation of G-protein-coupled receptors: a new avenue into drug discovery, Curr. Med. Chem. 7, pp. 889-896.

[7] Schwalbe, H. and Wess, G. (2002): Dissecting G-protein-coupled receptors: structure, function, and ligand interaction, Chembiochem 3, pp. 915-919.

[8] Hofmann, K. P. and Ernst, O. P. (2001): Vom Licht zum Sehen - Biophysik der visuellen Signaltransduktion [To see from light--biophysics of visual signal transduction], Z. Med. Phys. 11, pp. 217-225.

[9] Hamm, H. E. (1998): The many faces of G protein signaling, J. Biol. Chem. 273, pp. 669-672.

[10] Ernst, O. P. (1994): Zum Mechanismus der Aktivierung des G-Proteins durch den Rezeptor bei der visuellen Signaltransduktion: Freisetzung des GDP aus dem Rezeptor-G-Protein-Komplex, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg im Breisgau.

[11] König, B.; Arendt, A.; McDowell, J. H.; Kahlert, M.; Hargrave, P. A. and Hofmann, K. P. (1989): Three cytoplasmic loops of rhodopsin interact with transducin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, pp. 6878-6882.

[12] Schöneberg, T.; Schultz, G. and Gudermann, T. (1999): Structural basis of G protein-coupled receptor function, Mol. Cell. Endocrinol. 151, pp. 181-193.

[13] Franke, R. R.; König, B.; Sakmar, T. P.; Khorana, H. G. and Hofmann, K. P. (1990): Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transducin, Science 250, pp. 123-125.

[14] Ernst, O. P.; Hofmann, K. P. and Sakmar, T. P. (1995): Characterization of rhodopsin mutants that bind transducin but fail to induce GTP nucleotide uptake. Classification of mutant pigments by fluorescence, nucleotide release, and flash-induced light-scattering assays, J. Biol. Chem. 270, pp. 10580-10586.

[15] Rodieck, R.W. (1998): The first steps in seeing, Sinauer Associates, Inc.,

Sunderland, MA, U.S.A., ISBN: 0878937579.

[16] Pierce, K. L.; Premont, R. T. and Lefkowitz, R. J. (2002): Seven-transmembrane receptors, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, pp. 639-650.

[17] Gether, U. (2000): Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors, Endocr. Rev. 21, pp. 90-113.

[18] Rana, B. K. and Insel, P. A. (2002): G-protein-coupled receptor websites, Trends Pharmacol. Sci. 23, pp. 535-536.

[19] Nathans, J. and Hogness, D. S. (1983): Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin, Cell 34, pp. 807-814.

[20] Ernst, O. P. and Bartl, F. J. (2002): Active states of rhodopsin, Chembiochem 3, pp. 968-974.

[21] Okada, T.; Ernst, O. P.; Palczewski, K. and Hofmann, K. P. (2001): Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies, Trends Biochem. Sci. 26, pp. 318-324.

[22] Ernst, O. P.; Hofmann, K. P. and Palczewski, K. (2003): Vertebrate rhodopsin, Batschauer, A., Photoreceptors and Light Signalling, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

[23] Hofmann, K. P.; Jäger, S. and Ernst, O. P. (1995): Structure and function of activated rhodopsin, Isr. J. Chem. 35, pp. 339-355.

[24] Kliger, D. S. and Lewis, J. W. (1995): Spectral and kinetic characterization of visual pigment photointermediates, Isr. J. Chem. 35, pp. 289-307.

[25] Siebert, F. (1995): Application of FTIR spectroscopy to the investigation of dark structures and photoreactions of visual pigments, Isr. J. Chem. 35, pp. 309-323.

[26] Shichida, Y. and Imai, H. (1998): Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals, Cell. Mol. Life Sci. 54, pp. 1299-1315.

[27] Hofmann, K. P. (2000): Late photoproducts and signaling states of bovine rhodopsin, Hoff, A.J., Handbook of Biological Physics 3 pp. 91-142, Elsevier, Amsterdam.

[28] Klein-Seetharaman, J. (2002): Dynamics in rhodopsin, Chembiochem 3, pp. 981-986.

[29] Altenbach, C.; Klein-Seetharaman, J.; Cai, K.; Khorana, H. G. and Hubbell, W. L. (2001): Structure and function in rhodopsin: Mapping light-dependent changes in distance between residue 316 in helix 8 and residues in the sequence 60-75, covering the cytoplasmic end of helices TM1 and TM2 and their connection loop CL1, Biochemistry 40, pp. 15493-15500.

[30] Columbus, L. and Hubbell, W. L. (2002): A new spin on protein dynamics, Trends Biochem. Sci. 27, pp. 288-295.

[31] Mielke, T.; Alexiev, U.; Glasel, M.; Otto, H. and Heyn, M. P. (2002): Light-induced changes in the structure and accessibility of the cytoplasmic loops of rhodopsin in the activated MII state, Biochemistry 41, pp. 7875-7884.

[32] Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.

and Miyano, M. (2000): Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, Science 289, pp. 739-745.

[33] Teller, D. C.; Okada, T.; Behnke, C. A.; Palczewski, K. and Stenkamp, R. E. (2001): Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G protein-coupled receptors (GPCRs), Biochemistry 40, pp. 7761-7772.

[34] Okada, T.; Fujiyoshi, Y.; Silow, M.; Navarro, J.; Landau, E. M. and Shichida, Y. (2002): Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by x-ray crystallography, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, pp. 5982-5987.

[35] Klabunde, T. and Hessler, G. (2002): Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors, Chembiochem 3, pp. 928-944.

[36] Ovchinnikov Yu, A. (1982): Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships, FEBS Lett. 148, pp. 179-191.

[37] Hargrave, P. A.; McDowell, J. H.; Curtis, D. R.; Wang, J. K.; Juszczak, E.; Fong, S. L.; Rao, J. K. and Argos, P. (1983): The structure of bovine rhodopsin, Biophys. Struct. Mech. 9, pp. 235-244.

[38] Ferretti, L.; Karnik, S. S.; Khorana, H. G.; Nassal, M. and Oprian, D. D. (1986): Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, pp. 599-603.

[39] Reeves, P. J.; Thurmond, R. L. and Khorana, H. G. (1996): Structure and function in rhodopsin: high level expression of a synthetic bovine opsin gene and its mutants in stable mammalian cell lines, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, pp. 11487-11492.

[40] Farrens, D. L.; Altenbach, C.; Yang, K.; Hubbell, W. L. and Khorana, H. G. (1996): Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin, Science 274, pp. 768-770.

[41] Noel, J. P.; Hamm, H. E. and Sigler, P. B. (1993): The 2.2 A crystal structure of transducin-α complexed with GTPγS, Nature 366, pp. 654-663.

[42] Lambright, D. G.; Sondek, J.; Bohm, A.; Skiba, N. P.; Hamm, H. E. and Sigler, P. B. (1996): The 2.0 A crystal structure of a heterotrimeric G protein, Nature 379, pp. 311-319.

[43] Ernst, O. P.; Bieri, C.; Vogel, H. and Hofmann, K. P. (2000): Intrinsic biophysical monitors of transducin activation: fluorescence, UV-visible spectroscopy, light scattering, and evanescent field techniques, Methods Enzymol. 315, pp. 471-489.

[44] Kühn, H.; Bennett, N.; Michel-Villaz, M. and Chabre, M. (1981): Interactions between photoexcited rhodopsin and GTP-binding protein: kinetic and stoichiometric analyses from light-scattering changes, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, pp. 6873-6877.

[45] Schleicher, A. and Hofmann, K. P. (1987): Kinetic study on the equilibrium between membrane-bound and free photoreceptor G-protein, J. Membr. Biol. 95, pp. 271-281.

[46] Heck, M.; Pulvermüller, A. and Hofmann, K. P. (2000): Light scattering methods to monitor interactions between rhodopsin-containing membranes and soluble proteins, Methods Enzymol. 315, pp. 329-347.

[47] Myszka, D. G. (1999): Survey of the 1998 optical biosensor literature, J. Mol. Recognit. 12, pp. 390-408.

[48] Heyse, S.; Stora, T.; Schmid, E.; Lakey, J. H. and Vogel, H. (1998): Emerging techniques for investigating molecular interactions at lipid membranes, Biochim. Biophys. Acta 1376, pp. 319-338.

[49] Cooper, M. A. (2002): Optical biosensors in drug discovery, Nat. Rev. Drug. Discov. 1, pp. 515-528.

[50] Lang, Holger; Duschl, Claus and Vogel, H. (1994): A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces, Langmuir 10, pp. 197-210.

[51] Heyse, S.; Ernst, O. P.; Dienes, Z.; Hofmann, K. P. and Vogel, H. (1998): Incorporation of rhodopsin in laterally structured supported membranes: observation of transducin activation with spatially and time-resolved surface plasmon resonance, Biochemistry 37, pp. 507-522.

[52] Bieri, C.; Ernst, O. P.; Heyse, S.; Hofmann, K. P. and Vogel, H. (1999): Micropatterned immobilization of a G protein-coupled receptor and direct detection of G protein activation, Nat. Biotechnol. 17, pp. 1105-1108.

[53] Beaumont, K. and Negulescu, P. (1999): Chipping away at GPCR function, Nat. Biotechnol. 17, p. 1060.

[54] Xia, Y. and Whitesides, G.M. (1998): Soft lithography, Angew. Chem. Int. Ed. 37, pp. 550-575.

[55] Karlsson, O. P. and Lofas, S. (2002): Flow-mediated on-surface reconstitution of G-protein coupled receptors for applications in surface plasmon resonance biosensors, Anal. Biochem. 300, pp. 132-138.

[56] Clark, W. A.; Jian, X.; Chen, L. and Northup, J. K. (2001): Independent and synergistic interaction of retinal G-protein subunits with bovine rhodopsin measured by surface plasmon resonance, Biochem. J. 358, pp. 389-397.

[57] Krautwurst, D.; Yau, K. W. and Reed, R. R. (1998): Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library, Cell 95, pp. 917-926.

[58] Jäger, F.; Fahmy, K.; Sakmar, T. P. and Siebert, F. (1994): Identification of glutamic acid 113 as the Schiff base proton acceptor in the metarhodopsin II photointermediate of rhodopsin, Biochemistry 33, pp. 10878-10882.

[59] Arnis, S. and Hofmann, K. P. (1993): Two different forms of metarhodopsin II: Schiff base deprotonation precedes proton uptake and signaling state, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, pp. 7849-7853.

[60] Arnis, S.; Fahmy, K.; Hofmann, K. P. and Sakmar, T. P. (1994): A conserved carboxylic acid group mediates light-dependent proton uptake and signaling by rhodopsin, J. Biol. Chem. 269, pp. 23879-23881.

[61] Fahmy, K.; Sakmar, T. P. and Siebert, F. (2000): Transducin-dependent protonation of glutamic acid 134 in rhodopsin, Biochemistry 39, pp. 10607-10612.

[62] Mirzadegan, T.; Benkö, G.; Filipek, S. and Palczewski, K. (2003): Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin, Biochemistry 42, pp. 2759-2767.

[63] Matthews, R. G. ; Hubbard, R. ; Brown, P. K. and Wald, G. (1963): Tautomeric forms of metarhodopsin, J. Gen. Physiol. 47, pp. 215-240.

[64] Thorgeirsson, T. E.; Lewis, J. W.; Wallace-Williams, S. E. and Kliger, D. S. (1992): Photolysis of rhodopsin results in deprotonation of its retinal Schiff's base prior to formation of metarhodopsin II, Photochem. Photobiol. 56, pp. 1135-1144.

[65] Thorgeirsson, T. E.; Lewis, J. W.; Wallace-Williams, S. E. and Kliger, D. S. (1993): Effects of temperature on rhodopsin photointermediates from lumirhodopsin to metarhodopsin II, Biochemistry 32, pp. 13861-13872.

[66] Szundi, I.; Mah, T. L.; Lewis, J. W.; Jäger, S.; Ernst, O. P.; Hofmann, K. P. and Kliger, D. S. (1998): Proton transfer reactions linked to rhodopsin activation, Biochemistry 37, pp. 14237-14244.

[67] Emeis, D.; Kühn, H.; Reichert, J. and Hofmann, K. P. (1982): Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes leads to a shift of the photoproduct equilibrium, FEBS Lett. 143, pp. 29-34.

[68] Kibelbek, J.; Mitchell, D. C.; Beach, J. M. and Litman, B. J. (1991): Functional equivalence of metarhodopsin II and the Gt-activating form of photolyzed bovine rhodopsin, Biochemistry 30, pp. 6761-6768.

[69] Arnis, S. and Hofmann, K. P. (1995): Photoregeneration of bovine rhodopsin from its signaling state, Biochemistry 34, pp. 9333-9340.

[70] Seibert, C. (2000): Heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung des Thrombin-Rezeptors PAR1, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.

[71] Seibert, C.; Harteneck, C.; Ernst, O. P.; Schultz, G. and Hofmann, K. P. (1999): Activation of the rod G-protein Gt by the thrombin receptor (PAR1) expressed in Sf9 cells, Eur. J. Biochem. 266, pp. 911-916.

[72] Scheer, A.; Fanelli, F.; Costa, T.; De Benedetti, P. G. and Cotecchia, S. (1997): The activation process of the α_{1B}-adrenergic receptor: potential role of protonation and hydrophobicity of a highly conserved aspartate, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, pp. 808-813.

[73] Ghanouni, P.; Schambye, H.; Seifert, R.; Lee, T. W.; Rasmussen, S. G.; Gether, U. and Kobilka, B. K. (2000): The effect of pH on β_2 adrenoceptor function. Evidence for protonation-dependent activation, J. Biol. Chem. 275, pp. 3121-3127.

[74] Meyer, C. K.; Böhme, M.; Ockenfels, A.; Gärtner, W.; Hofmann, K. P. and Ernst, O. P. (2000): Signaling states of rhodopsin. Retinal provides a scaffold for activating proton transfer switches, J. Biol. Chem. 275, pp. 19713-19718.

[75] Dartnall, H. J. (1968): The photosensitivities of visual pigments in the presence of hydroxylamine, Vision Res. 8, pp. 339-358.

[76] Hecht, S. (1941): Energy, quanta, and vision, J. Gen. Physiol. 25, pp. 819-822.

[77] Ottolenghi, M. and Sheves, M. (1989): Synthetic retinals as probes for the binding site and photoreactions in rhodopsins, J. Membr. Biol. 112, pp. 193-212.

[78] Nakanishi, K. and Crouch, R. K. (1995): Application of artificial pigments to structure determination and study of photoinduced transformations of retinal proteins, Isr. J. Chem. 35, pp. 253-272.

[79] Lou, J.; Tan, Q.; Karnaukhova, E.; Berova, N.; Nakanishi, K. and Crouch, R. K. (2000): Synthetic retinals: convenient probes of rhodopsin and visual transduction process, Methods Enzymol. 315, pp. 219-237.

[80] Yan, B.; Nakanishi, K. and Spudich, J. L. (1991): Mechanism of activation of sensory rhodopsin I: evidence for a steric trigger, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, pp. 9412-9416.

[81] Shieh, T.; Han, M.; Sakmar, T. P. and Smith, S. O. (1997): The steric trigger in rhodopsin activation, J. Mol. Biol. 269, pp. 373-384.

[82] Ganter, U. M.; Schmid, E. D.; Perez-Sala, D.; Rando, R. R. and Siebert, F. (1989): Removal of the 9-methyl group of retinal inhibits signal transduction in the visual process. A Fourier transform infrared and biochemical investigation, Biochemistry 28, pp. 5954-5962.

[83] Vogel, R.; Fan, G. B.; Sheves, M. and Siebert, F. (2000): The molecular origin of the inhibition of transducin activation in rhodopsin lacking the 9-methyl group of the retinal chromophore: a UV-Vis and FTIR spectroscopic study, Biochemistry 39, pp. 8895-8908.

[84] Einterz, C. M.; Hug, S. J.; Lewis, J. W. and Kliger, D. S. (1990): Early photolysis intermediates of the artificial visual pigment 13-demethylrhodopsin, Biochemistry 29, pp. 1485-1491.

[85] Lewis, J. W.; Fan, G. B.; Sheves, M.; Szundi, I. and Kliger, D. S. (2001): Steric barrier to bathorhodopsin decay in 5-demethyl and mesityl analogues of rhodopsin, J. Am. Chem. Soc. 123, pp. 10024-10029.

[86] Szundi, I.; de Lera, A. R.; Pazos, Y.; Alvarez, R.; Oliana, M.; Sheves, M.; Lewis, J. W. and Kliger, D. S. (2002): Bleaching kinetics of artificial visual pigments with modifications near the ring-polyene chain connection, Biochemistry 41, pp. 2028-2035.

[87] Fritze, O.; Filipek, S.; Kuksa, V.; Palczewski, K.; Hofmann, K. P. and Ernst, O. P. (2003): Role of the conserved NPxxY$(x)_{5,6}$F motif in the rhodopsin ground state and during activation, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, pp. 2290-2295.

[88] Ernst, O. P.; Meyer, C. K.; Marin, E. P.; Henklein, P.; Fu, W. Y.; Sakmar, T. P. and Hofmann, K. P. (2000): Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin α and γ subunits, J. Biol. Chem. 275, pp. 1937-1943.

[89] Klein-Seetharaman, J.; Getmanova, E. V.; Loewen, M. C.; Reeves, P. J. and Khorana, H. G. (1999): NMR spectroscopy in studies of light-induced structural changes in mammalian rhodopsin: applicability of solution ^{19}F NMR, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, pp. 13744-13749.

[90] Altenbach, C.; Cai, K.; Khorana, H. G. and Hubbell, W. L. (1999): Structural features and light-dependent changes in the sequence 306-322 extending from helix VII to the palmitoylation sites in rhodopsin: a site-directed spin-labeling study, Biochemistry 38, pp. 7931-7937.

[91] Imamoto, Y.; Kataoka, M.; Tokunaga, F. and Palczewski, K. (2000): Light-induced conformational changes of rhodopsin probed by fluorescent alexa594 immobilized on the cytoplasmic surface, Biochemistry 39, pp. 15225-15233.

[92] Krishna, A. G.; Menon, S. T.; Terry, T. J. and Sakmar, T. P. (2002): Evidence that helix 8 of rhodopsin acts as a membrane-dependent conformational switch, Biochemistry 41, pp. 8298-8309.

[93] Abdulaev, N. G. and Ridge, K. D. (1998): Light-induced exposure of the cytoplasmic end of transmembrane helix seven in rhodopsin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, pp. 12854-12859.

[94] Sheikh, S. P.; Zvyaga, T. A.; Lichtarge, O.; Sakmar, T. P. and Bourne, H. R. (1996): Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F, Nature 383, pp. 347-350.

[95] Filipek, S.; Stenkamp, R. E.; Teller, D. C. and Palczewski, K. (2003): G protein-coupled receptor rhodopsin: A prospectus, Annu. Rev. Physiol. 65, pp. 851-879.

[96] Menon, S. T.; Han, M. and Sakmar, T. P. (2001): Rhodopsin: structural basis of molecular physiology, Physiol. Rev. 81, pp. 1659-1688.

[97] Hamm, H. E. (2001): How activated receptors couple to G proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, pp. 4819-4821.

[98] Hamm, H. E.; Deretic, D.; Arendt, A.; Hargrave, P. A.; König, B. and Hofmann, K. P. (1988): Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the α subunit, Science 241, pp. 832-835.

[99] Cai, K.; Itoh, Y. and Khorana, H. G. (2001): Mapping of contact sites in complex formation between transducin and light-activated rhodopsin by covalent crosslinking: use of a photoactivatable reagent, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, pp. 4877-4882.

[100] Itoh, Y.; Cai, K. and Khorana, H. G. (2001): Mapping of contact sites in complex formation between light-activated rhodopsin and transducin by covalent crosslinking: use of a chemically preactivated reagent, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, pp. 4883-4887.

[101] Garcia, P. D.; Onrust, R.; Bell, S. M.; Sakmar, T. P. and Bourne, H. R. (1995): Transducin-α C-terminal mutations prevent activation by rhodopsin: a new assay using recombinant proteins expressed in cultured cells, Embo J. 14, pp. 4460-4469.

[102] Onrust, R.; Herzmark, P.; Chi, P.; Garcia, P. D.; Lichtarge, O.; Kingsley, C. and Bourne, H. R. (1997): Receptor and βγ binding sites in the α subunit of the retinal G protein transducin, Science 275, pp. 381-384.

[103] Kisselev, O. G.; Ermolaeva, M. V. and Gautam, N. (1994): A farnesylated domain in the G protein gamma subunit is a specific determinant of receptor coupling, J. Biol. Chem. 269, pp. 21399-21402.

[104] Taylor, J. M.; Jacob-Mosier, G. G.; Lawton, R. G.; VanDort, M. and Neubig, R. R. (1996): Receptor and membrane interaction sites on Gβ. A receptor-derived peptide binds to the carboxyl terminus, J. Biol. Chem. 271, pp. 3336-3339.

[105] Marin, E. P.; Krishna, A. G.; Zvyaga, T. A.; Isele, J.; Siebert, F. and Sakmar,

T. P. (2000): The amino terminus of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin modulates rhodopsin-transducin interaction, J. Biol. Chem. 275, pp. 1930-1936.

[106] Acharya, S.; Saad, Y. and Karnik, S. S. (1997): Transducin-α C-terminal peptide binding site consists of C-D and E-F loops of rhodopsin, J. Biol. Chem. 272, pp. 6519-6524.

[107] Bartl, F. J.; Ritter, E. and Hofmann, K. P. (2001): Signaling states of rhodopsin: Absorption of light in active metarhodopsin II generates an all-*trans*-retinal bound inactive state, J. Biol. Chem. 276, pp. 30161-30166.

[108] Kisselev, O. G.; Meyer, C. K.; Heck, M.; Ernst, O. P. and Hofmann, K. P. (1999): Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: evidence for a two-site sequential fit mechanism, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, pp. 4898-4903.

[109] Kunishima, N.; Shimada, Y.; Tsuji, Y.; Sato, T.; Yamamoto, M.; Kumasaka, T.; Nakanishi, S.; Jingami, H. and Morikawa, K. (2000): Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor, Nature 407, pp. 971-977.

[110] Devi, L. A. (2001): Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking, Trends Pharmacol. Sci. 22, pp. 532-537.

[111] Fotiadis, D.; Liang, Y.; Filipek, S.; Saperstein, D. A.; Engel, A. and Palczewski, K. (2003): Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes, Nature 421, pp. 127-128.

[112] Rondard, P.; Iiri, T.; Srinivasan, S.; Meng, E.; Fujita, T. and Bourne, H. R. (2001): Mutant G protein α subunit activated by Gβγ: a model for receptor activation?, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, pp. 6150-6155.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

....

Datum Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Klaus Peter Hofmann, der mein Interesse an Rhodopsin und der visuellen Signaltransduktion geweckt hat. Über all die Jahre hat er mich gefördert, indem er mir ermöglichte, meine Forschung in verschiedene Richtungen zu entwickeln, und mich mit wichtigen Kollaborationspartnern im In- und Ausland zusammenbrachte. Für wertvolle Anregungen und viele freundschaftliche Ratschläge bin ich ihm sehr dankbar.

Besonders danken möchte ich meinen Mitarbeitern für ihr Engagement und ihre Tatkraft. Frau Christine Koch, Romana Kukina und Dr. Christoph Seibert leisteten Pionierarbeit beim Aufbau des Gen- und Zellkulturlabors. Im Rahmen ihrer Doktorarbeiten haben Dr. Christoph Meyer und Olaf Fritze wertvolle Ergebnisse zu meiner Arbeit beigesteuert.

Für die Zusammenarbeit danke ich Dr. Franz Bartl, Dr. Christoph Bieri, Prof. Hui-Woog Choe, Dr. Jörg Fitter, Dr. Peter Henklein, Rolf Herrmann, Dr. Stefan Heyse, Dr. Stefan Jäger, Prof. Oleg Kisselev und Eglof Ritter. Bedanken möchte ich mich bei meinen längjährigen Kollegen aus „Freiburger Tagen“, Dr. Martin Heck und Dr. Alexander Pulvermüller, die mit Rat und Tat zur Seite standen. Meinen Kollegen Dr. Elke Hessel, Dr. Sigurd Magnus, Dr. Dieter Maretzki, Dr. Wolfgang Meier und Dr. Manfred Pohl danke ich für ihre Unterstützung und Ratschläge in der Lehre. Mein Dank gilt Jana Engelmann, Helena Seibel und Ingrid Semjonow für ihre zuverlässige technische Unterstützung. Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des IMPBs, auch den ehemaligen, bedanken, die ein Umfeld geschaffen haben, in dem es Spass machte zu arbeiten.

Ich danke Prof. Tom Sakmar für den Einblick in ein effektiv geführtes Gen- und Zellkulturlabor. Ich bin dankbar für die Zusammenarbeit mit den Laboren von Prof. Kris Palczewski, Prof. Horst Vogel, Prof. Dave Kliger, Prof. Günter Schultz, Prof. Wolfgang Gärtner, Prof. Uwe Wolfrum, Prof. Norbert Dencher und Prof. Georg Büldt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Forschungsförderung der Charité möchte ich meinen Dank für die finanzielle Unterstützung der Arbeit aussprechen.

Zu guter letzt möchte ich meiner Frau Cordula und meiner Tochter Laura für den Rückhalt in der Familie danken.