



**Biochemische Charakterisierung von cAMP-Gradienten**  
—  
**Einfluss von Phosphodiesterasen**

**Biochemical Characterization of cAMP Gradients**  
—  
**Influence of Phosphodiesterases**

Dissertation zur Erlangung des  
medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

**Charlotte Konrad**

aus

**Volkmarsen**

Würzburg **2019**

**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen**

**1. Betreuer: Prof. Dr. Martin J. Lohse**

**2. Betreuer: Dr. Andreas Bock**

**3. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bauer**

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:**

.....

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Der ubiquitäre Botenstoff cAMP.....</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Entwicklung der Theorie der cAMP-Kompartimentierung .....</b>	<b>3</b>
1.3	<b>Phosphodiesterasen .....</b>	<b>4</b>
1.3.1	<i>Klinische Bedeutung .....</i>	<i>5</i>
1.3.1.1	PDE-Inhibitoren bei erektiler Dysfunktion.....	5
1.3.1.2	PDE-Inhibitoren bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung.....	6
1.3.1.3	Im Fokus: kardiale Anwendungsgebiete .....	6
1.3.2	<i>PDE2A und PDE8A im Fokus aktueller Forschung.....</i>	<i>9</i>
1.3.3	<i>Wahl der analysierten Phosphodiesterasen.....</i>	<i>9</i>
1.3.4	<i>PDE2A3.....</i>	<i>10</i>
1.3.4.1	Nomenklatur und Vorkommen.....	10
1.3.4.2	Struktureller Aufbau der PDE2A3.....	11
1.3.4.3	Pharmakologische Eigenschaften .....	13
1.3.5	<i>PDE8A1.....</i>	<i>13</i>
1.3.5.1	Nomenklatur und Vorkommen.....	13
1.3.5.2	Struktureller Aufbau der PDE8A1 .....	14
1.3.5.3	Pharmakologische Eigenschaften .....	14
1.4	<b>Methodische Grundlagen.....</b>	<b>15</b>
1.4.1	<i>Förster-Resonanz-Energie-Transfer.....</i>	<i>15</i>
1.4.2	<i>Monitoring von cAMP-Leveln mittels Epac1-camps-basiertem Sensor.....</i>	<i>17</i>
1.4.3	<i>Single-Alpha-Helix-Linker.....</i>	<i>18</i>
1.5	<b>Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1	<b>Materialien:.....</b>	<b>21</b>
2.1.1	<i>Bakterienstamm.....</i>	<i>21</i>
2.1.2	<i>Plasmid-Vektoren .....</i>	<i>21</i>
2.1.3	<i>cDNA.....</i>	<i>21</i>
2.1.4	<i>Zyklische Nukleotide.....</i>	<i>21</i>
2.1.5	<i>Chemikalien.....</i>	<i>21</i>
2.1.6	<i>Enzyme und Kits.....</i>	<i>23</i>
2.1.7	<i>Zellkultur.....</i>	<i>23</i>
2.1.8	<i>Weitere Materialien.....</i>	<i>24</i>
2.2	<b>Geräte .....</b>	<b>24</b>
2.3	<b>Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.3.1	<i>Allgemeines .....</i>	<i>26</i>
2.3.2	<i>Zellkultur.....</i>	<i>26</i>
2.3.2.1	Auftauen von HEK-TsA-Zellen .....	26

2.3.2.2	Passagieren der HEK-TsA-Zellen in Kultur .....	27
2.3.2.3	Einfrieren von HEK-TsA-Zelllinien .....	27
2.3.2.4	Transfektion von HEK-TsA-Zellen .....	27
2.3.3	<i>Zytosolpräparation</i> .....	28
2.3.4	<i>Spektrofluorometer-FRET-Messung in vitro</i> .....	28
2.3.5	<i>Methoden der Klonierung</i> .....	30
2.3.5.1	Polymerase-Ketten-Reaktion .....	31
2.3.5.2	Aufreinigung des PCR-Produkts.....	32
2.3.5.3	DNA-Präzipitierung.....	33
2.3.5.4	PCR Peqlab .....	34
2.3.5.5	Restriktion der DNA.....	34
2.3.5.6	Klonierungsstrategien.....	35
2.3.5.7	Ligation .....	38
2.3.5.8	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	39
2.3.5.9	Beurteilung des Ligationserfolgs .....	40
2.3.5.10	Mini-DNA-Präparation.....	40
2.3.5.11	Kontroll-Restriktion .....	41
2.3.5.12	Re-Transformation .....	41
2.3.5.13	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	42
2.3.6	<i>Software</i> .....	43
2.3.6.1	Datenauswertung der FRET-Messungen.....	43
2.3.6.2	Virtuelle Klonierung .....	43
2.3.6.3	Statistik.....	44

### **3 ERGEBNISSE.....45**

#### **3.1 Grundlagen ..... 45**

3.1.1	<i>Transientes FRET-Signal und Affinitätsänderung bei Epac1-camps-PDE4A1</i> .....	45
3.1.2	<i>Charakterisierung des transienten FRET-Signals von Epac1-camps-PDE2A3/8A1</i> .....	46

#### **3.2 Charakterisierung der Phosphodiesterase 2A3..... 50**

3.2.1	<i>Ratiometrisches Verhalten der PDE2A3 in vitro</i> .....	50
3.2.2	<i>Reproduzierbarkeit des transienten FRET-Signals</i> .....	52
3.2.3	<i>Inhibition der PDE2A3 durch EHNA</i> .....	52
3.2.4	<i>Konzentrations-Wirkungs-Kurven der PDE2A3</i> .....	52
3.2.5	<i>Einfluss der regulatorischen Untereinheiten der PDE2A3</i> .....	53
3.2.6	<i>Einfluss des 30 nm ER/K-Linkers auf Konzentrations-Wirkungs-Kurven der PDE2A3</i> ...	55
3.2.7	<i>Einfluss von cGMP auf die hydrolytische Aktivität der PDE2A3</i> .....	58

#### **3.3 Charakterisierung der Phosphodiesterase 8A1 ..... 59**

3.3.1	<i>Ratiometrisches Verhalten der PDE8A1 in vitro</i> .....	59
3.3.2	<i>Einfluss von Mangan als Cofaktor der PDE8A1</i> .....	61
3.3.3	<i>Konzentrations-Wirkungs-Kurven der PDE8A1</i> .....	61
3.3.4	<i>Spezifische Inhibition der PDE8A1</i> .....	62
3.3.5	<i>Einfluss der regulatorischen Domänen der PDE8A1</i> .....	62
3.3.6	<i>Einfluss des 30 nm ER/K-Linkers auf Konzentrations-Wirkungs-Kurven der PDE8A1</i> ...	64

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>66</b>
4.1	<b>Bildung verschiedener cAMP-Gradienten durch die PDE2A3 .....</b>	<b>67</b>
4.2	<b>Ausmessung der Domänen niedriger cAMP-Konzentration .....</b>	<b>68</b>
4.2.1	<i>Die PDE2A3 erzeugt Nanodomänen mit einem Radius &lt; 30 nm.....</i>	<i>68</i>
4.2.2	<i>Die katalytische Domäne der PDE2A3 erzeugt Domänen mit einem Radius &gt; 30 nm ...</i>	<i>69</i>
4.2.3	<i>Ursachen der unterschiedlichen Domänen von PDE2katD und PDE2A3 .....</i>	<i>70</i>
4.2.4	<i>cGMP – Modulator der PDE2A3-induzierten Nanodomänen.....</i>	<i>72</i>
4.3	<b>PDE8A1 – eine Phosphodiesterase ohne cAMP-Gradienten-Bildung? 73</b>	
4.4	<b>Analyse von Störfaktoren der <i>in vitro</i> Experimente .....</b>	<b>74</b>
4.5	<b>Bedeutung der gewählten Phosphodiesterasen für die Zelle.....</b>	<b>75</b>
4.5.1	<i>PDE2A3 – Regulator basaler cAMP-Konzentrationen.....</i>	<i>75</i>
4.5.2	<i>PDE8A1 – Feinregulator von einzelnen Signalwegen oder cAMP-Bindungsprotein?.....</i>	<i>76</i>
4.6	<b>Der Einfluss der katalytischen Eigenschaften verschiedener Phosphodiesterasen auf cAMP-Nanodomänen .....</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>87</b>
10.1	<b>Fluoreszenzspektren .....</b>	<b>87</b>
10.2	<b>Ratiometrische Messungen .....</b>	<b>90</b>
<b>11</b>	<b>REFERENZEN.....</b>	<b>94</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>108</b>
<b>13</b>	<b>AFFIDAVIT .....</b>	<b>109</b>
<b>14</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>109</b>
<b>15</b>	<b>CV .....</b>	<b>110</b>

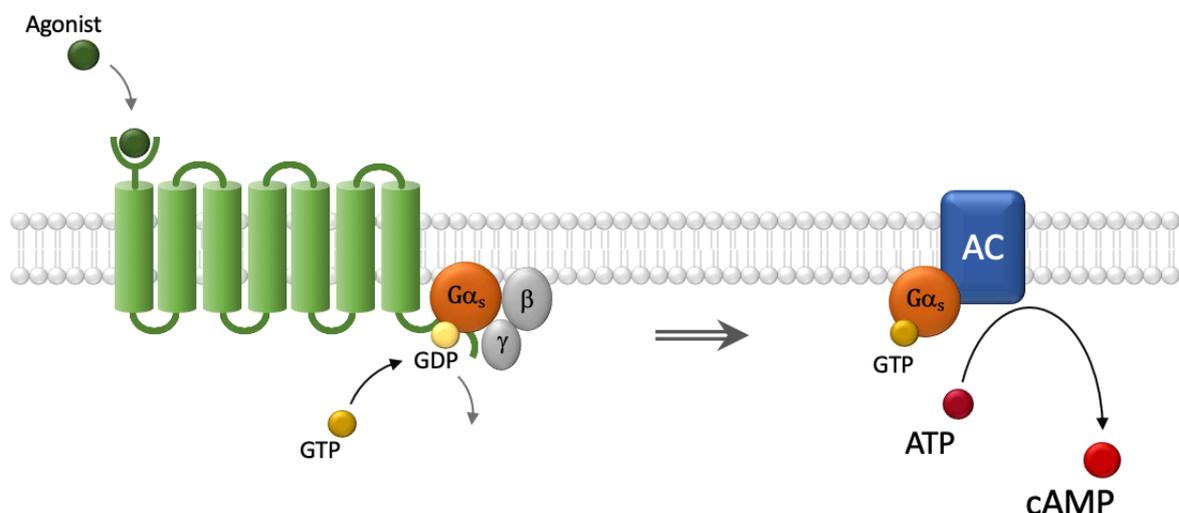
# 1 Einleitung

## 1.1 Der ubiquitäre Botenstoff cAMP

Ein anerkanntes Modell der Signaltransduktion der komplexen Signalkaskaden des menschlichen Körpers ist das Prinzip des „*second messengers*“ (auf Deutsch: zweiter Botenstoff). Cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cyclic adenosine monophosphate = cAMP) ist einer der bekanntesten Vertreter dieser Gruppe und ein universeller *second messenger* vieler wichtiger Signalwege und zellulärer Prozesse, wie:

- Differenzierung, Entwicklung und Exzitations-/Kontraktionskopplung in kardialen Myozyten [1, 2]
- Metabolisierung [3]
- Gen-Expression [3]
- Zellteilung [4]
- Migration [5]
- Exozytose [6]
- Insulin-Sekretion [7]
- Gedächtnisbildung [8, 9].

cAMP wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor- (G protein-coupled receptors = GPCR) vermittelte Aktivierung von membranständige Adenylatcyclasen (AC) hergestellt [10] (Abb. 1) und aktiviert intrazelluläre Proteinkinasen (PKA), welche durch Phosphorylierung weitere Signalwege stimulieren oder inhibieren [11-13].



**Abb. 1 Funktionsweise von G<sub>s</sub>-gekoppelten GPCR.** Nach Agonisten-Bindung (erster Botenstoff) an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (bestehend aus sieben

*Transmembrandomänen, grün) kommt es zur Rezeptoraktivierung und Konformationsänderung desselben, wodurch das heterotrimere G-Protein (bestehend aus  $G\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Untereinheit) aktiviert wird und in die  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheit zerfällt. Im Falle von  $G_s$ -gekoppelten GPCRs stimuliert die  $G\alpha$ -Untereinheit ihrerseits Adenylatcyclasen (AC), welche aus Adenosintriphosphat (ATP) cAMP synthetisieren. [14, 15]*

Daneben sind weitere wichtige Effektoren der cAMP-Wirkung cAMP-gesteuerte Ionenkanäle („cyclic nucleotide-gated ion channels“ = CNG [16] und „hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channels“ = HCN [17]), zwei „exchange proteins directly activated by cAMP“ (Epac1, Epac2) [9, 18] und die zuletzt beschriebenen Transmembranproteine der „Popeye domain containing family“ (POPDC1-3) [19-21]. Abgebaut wird cAMP durch Phosphodiesterasen, welche die Hydrolyse von cAMP zu Adenosin-5'-monophosphat (5'AMP) katalysieren [22-25].

Das Prinzip des *second messengers* bedeutet vereinfacht ausgedrückt, dass durch dessen Hilfe extrazelluläre Signale nach Rezeptoraktivierung in intrazelluläre Signale übersetzt werden. Häufig wird dabei von einer gleichmäßigen Verteilung dieses Botenstoffs in der Zelle ausgegangen. Da jedoch cAMP nicht nur der zweite Botenstoff eines einzigen Signalwegs, sondern einer Vielzahl von Signalwegen ist, würden unter dieser Annahme unspezifische intrazelluläre Effekte auf ein spezifisches extrazelluläres Signal folgen. Ein Lösungsansatz für diesen offensichtlichen Widerspruch ist das Prinzip der intrazellulären Kompartimentierung, sprich eine Untergliederung der cAMP-Level in verschiedene Reaktionsräume unterschiedlicher Konzentration, wodurch Signalspezifität ermöglicht wird. [1, 22, 26-38]

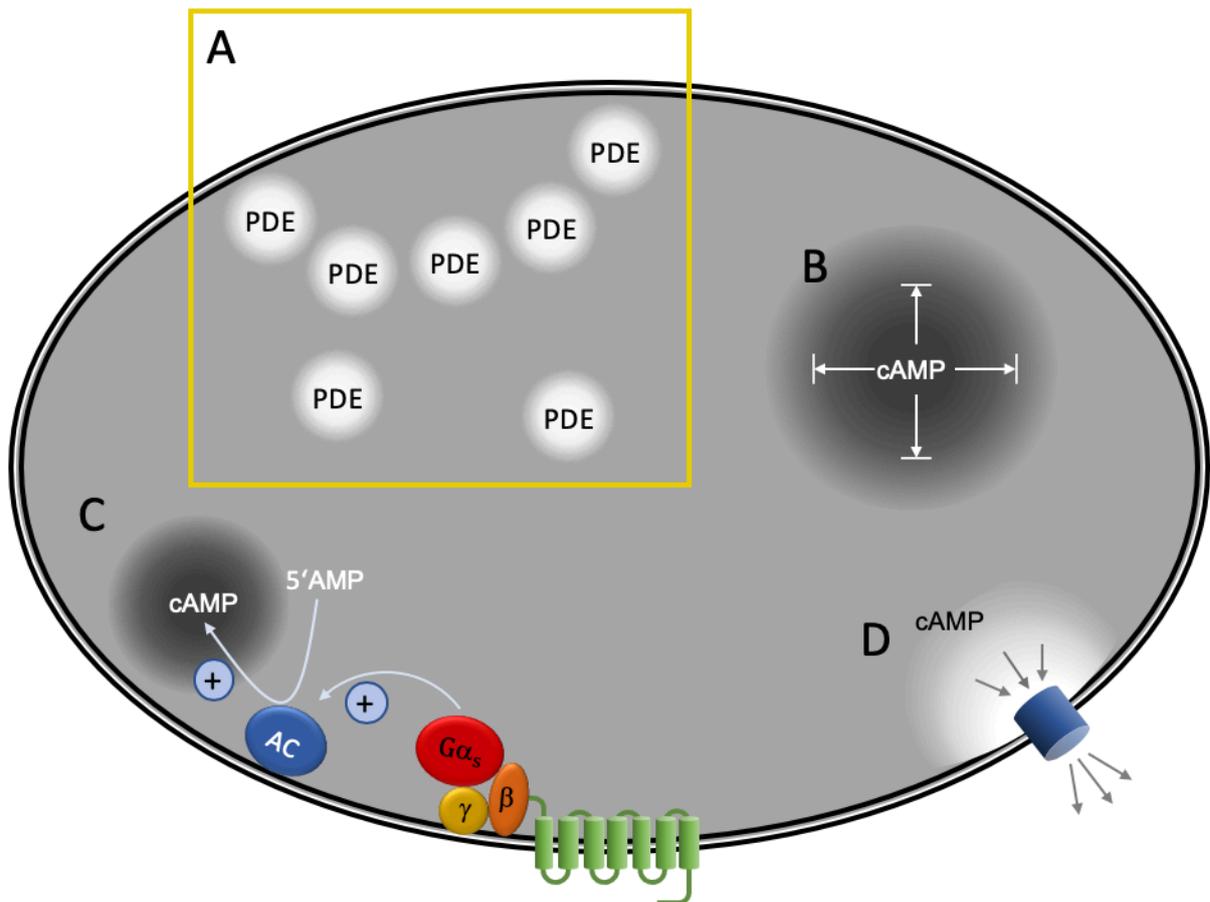
Schon vor Jahrzehnten wurden die ersten Theorien über solche cAMP-Domänen in lebenden Zellen aufgeworfen, jedoch bleibt der zugrunde liegende Mechanismus unklar. Eine generelle Annahme hierbei ist der Einfluss von cAMP-abbauenden Enzymen, wie z.B. Phosphodiesterasen [39-45]. Weitere Mechanismen (Abb. 2), die infrage kommen, eine Kompartimentierung der cAMP-Level zu ermöglichen, sind:

- eine räumlich-begrenzte, an der Zellmembran lokalisierte cAMP-Produktion [40]
- hohe intrazelluläre Level an AC- sowie PDE-Aktivität
- spezifische Lokalisationen von ACs sowie PDEs in definierten Regionen
- cAMP-Pufferung
- cAMP-Export durch Multidrug Resistance-Related Proteine (MRP)
- eine eingeschränkte Diffusion von cAMP durch bisher unbekannte Barrieren

- die zelluläre Architektur.

[38]

Ein weiterer Fokus in der Betrachtung der Kompartimentierung von cAMP-vermittelten Signalwegen liegt auf sogenannten A-Kinase-Anchoring-Proteinen (AKAPs), gerüstbildende Proteine, die die PKA an spezifischen intrazellulären Lokalisationen verankern und somit die Nähe zu spezifischen Modulatoren und Zielstrukturen der PKA ermöglichen. [37, 46-48]



**Abb. 2** Mögliche Strategien der cAMP-Kompartimentierung. Kompartimentierung durch **A** spezifische Lokalisation von Phosphodiesterasen, dadurch lokale cAMP-Hydrolyse, **B** limitierte Diffusion, Veränderung der Viskosität oder cAMP-Pufferung, **C** an der Zellmembran lokalisierte cAMP-Produktion, **D** cAMP-Export durch MRPs. **A** ist hervorgehoben, da diese Strategie in der vorliegenden Arbeit weiterverfolgt wird. (grau: hohe cAMP-Konzentration, weiß: niedrige cAMP-Konzentration)

## 1.2 Entwicklung der Theorie der cAMP-Kompartimentierung

Seit der Erstbeschreibung von cAMP 1958 durch Earl W. Sutherland (1971 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet) wurden Signalwege dieses Botenstoffs untersucht, wobei

jedoch zunächst ein Fokus auf hormonelle Beeinflussung gelegt wurde [49, 50]. Es dauerte dennoch fast 20 Jahre, bis in den 1970er Jahren die ersten Experimente Hinweise auf cAMP-Domänen bzw. Kompartimentierung ergaben [43, 45]. Weitere 20 Jahre später wurden 1996 in einem sehr anschaulichen Modell in Frosch-Ventrikel-Kardiomyozyten cAMP-Kompartimente dargestellt [39] – der erste Nachweis von Gradienten in einer einzelnen Zelle wurde hiermit erbracht und der Grundstein für weitere Verifizierung derselben gelegt. Ein weiterer Meilenstein war die Einführung quantitativer Methoden zur Bestimmung der cAMP-Level [51, 52], bis sich im Laufe des letzten Jahrzehnts zahlreiche, vor allem optische Nachweise der Kompartimente sowohl von cAMP als auch von cGMP als *second messenger* ergaben [22, 29, 40, 51-60]. [38, 61]

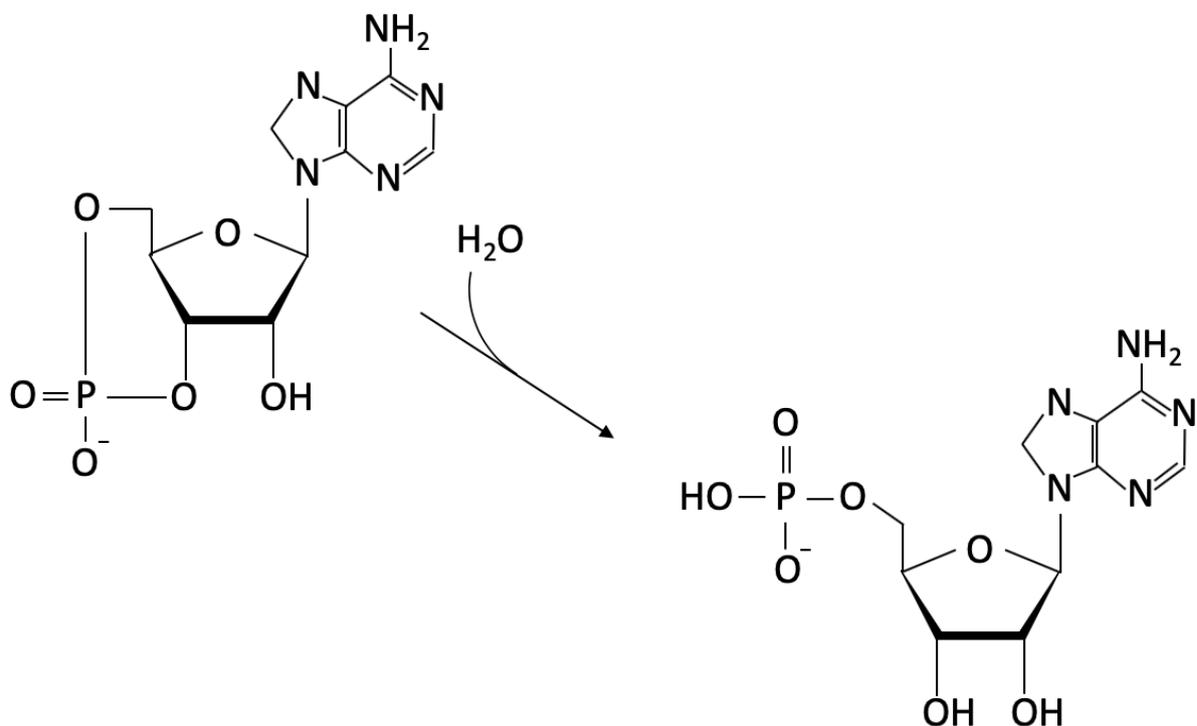
Aktuell werden zusätzlich vor allem mathematische Modelle zurate gezogen, um den genauen Ursachen für cAMP-Kompartimentierung auf den Grund zu gehen [1, 26, 30, 38, 62]. Unter anderem kristallisieren sich hier vor allem der Einfluss von cAMP-Puffern, Veränderungen der Viskosität (und damit limitierte Diffusion) und strukturelle Hindernisse als bedeutende Einflussgrößen heraus. Ob Phosphodiesterasen allein im Stande sind, Kompartimente aufzubauen, wird insbesondere unter mathematischer Betrachtung bisweilen kontrovers diskutiert [1, 26, 38, 62]. Nichtsdestotrotz wird der Gedankengang, dass durch Hydrolyse von cAMP Bereiche der Zelle mit niedrigerer cAMP-Konzentration entstehen [25, 63-66], dadurch unterstützt, dass die Inhibition von genau diesen PDEs zu einer Aufhebung der kompartimentierten Signale führt [38, 39, 67, 68].

### 1.3 Phosphodiesterasen

Die Familie der Phosphodiesterasen (PDEs) besteht aus einer heterogenen Gruppe von 11 Isoenzymen (PDE1-11), welche durch 21 Gene codiert werden, von denen allerdings zusätzlich verschiedene Spleißvarianten existieren, sodass mehr als 100 verschiedene mRNAs für Phosphodiesterasen codieren [69]. Die Nomenklatur gestaltet sich wie folgt: die erste Zahl beschreibt die Zugehörigkeit zur Familie des Isoenzym, der nachfolgende Buchstabe die Genfamilie und die zum Schluss folgende Zahl die Spleißvariante.

PDEs sind die einzigen Enzyme, die cAMP durch Hydrolyse von cAMP zu 5'AMP degradieren, wodurch sie eine wichtige Rolle in der intrazellulären cAMP-Homöostase einnehmen. [46, 70]

Neben den cAMP-spezifischen Phosphodiesterasen (PDE4, 7, 8) gibt es die Gruppe der cGMP-spezifischen PDEs (PDE5, 6, 9), die folglich die Hydrolyse von cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) zu Guanosin-5'-monophosphat katalysieren, und die größte Gruppe der PDEs mit dualer Substratspezifität (PDE1, 2, 3, 10, 11), die sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren. [69]



**Abb. 3 Hydrolyse von cAMP zu 5'AMP.** Dieser Schritt wird katalysiert durch cAMP-hydrolysierende Phosphodiesterasen. [71]

### 1.3.1 Klinische Bedeutung

#### 1.3.1.1 PDE-Inhibitoren bei erektiler Dysfunktion

Cyclisches Adenosinmonophosphat ist ein universeller *second messenger* vieler Signalwege im menschlichen Körper. Obwohl die genaue Signaltransduktion noch nicht gänzlich verstanden ist, gibt es eine Reihe von Pharmaka, die erfolgreich seit Jahrzehnten klinisch eingesetzt werden und in diesen Signalweg eingreifen. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist der erstmals 1996 publizierte PDE5-Inhibitor

Sildenafil zur Behandlung erektiler Dysfunktion [72], der der breiten Bevölkerung unter dem Handelsnamen Viagra® (Pfizer Inc., New York, NY, USA) bekannt ist. Die Zielstruktur, die Phosphodiesterase 5, ist im Gegensatz zu den in dieser Arbeit dargestellten Phosphodiesterasen, PDE2A3 und PDE8A1, cGMP spezifisch [69] und wird daher im Weiteren nicht näher betrachtet.

### **1.3.1.2 PDE-Inhibitoren bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung**

Standardmäßig werden in der klinischen Praxis auch Inhibitoren der in dieser Arbeit im Hintergrund dargestellten PDE4 verwendet. Diese werden leitliniengerecht bei schwerer und sehr schwerer Atemflusslimitierung, Symptomen einer chronischen Bronchitis und häufigen Exazerbationen einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease = COPD) erfolgreich eingesetzt. In diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass durch Gabe des PDE4-Inhibitors Roflumilast zusätzlich zu der Therapiestufe LABA / ICS (inhalative lang wirksame  $\beta$ 2-Sympathomimetika / inhalative Glucocorticoide) und LAMA / LABA / ICS (inhalative lang wirksamen  $\beta$ 2-Sympathomimetika / inhalative lang wirksame Muskarin-Rezeptor-Antagonisten / inhalative Glucocorticoiden) Krankenhaus-aufenthalte wegen Exazerbationen vermindert werden können. [73, 74]

### **1.3.1.3 Im Fokus: kardiale Anwendungsgebiete**

Als weiterer Meilenstein in der klinischen cAMP-Forschung ist der Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und einer Dysregulation der cAMP-vermittelten Signalwege hervorzuheben [75]. Mit dem PDE3-Inhibitor Milrinon wurde im Jahr 1983 eine positiv inotrope und vasodilatative Substanz gefunden, die bei schwerer chronischer kongestiver Herzinsuffizienz eine vielversprechende Therapieoption darstellte [76, 77]. So wurde mit Milrinon versucht, durch Hemmung des cAMP-Abbaus die Spiegel des *second messengers* zu erhöhen, um damit eine erhöhte Kontraktilität zu ermöglichen [78]. Die Therapie schien vielversprechend, bis 1991 in der randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblind-Studie PROMISE (1.088 Patienten) eine erhöhte Mortalität unter Dauertherapie der schweren Herzinsuffizienz gefunden wurde [79]. Jahre später wurde in der OPTIME-CHF, einer von 1997-1999 gelaufenen, 951 Patienten einschließenden, prospektiven, randomisierten und Placebo-kontrollierten Doppelblind-Studie, zwar keine erhöhte Mortalität festgestellt, jedoch zeigte sich, dass es unter Milrinon-Therapie zu interventionsbedürftigen Hypotensionen und zu neu

aufgetretenen atrialen Arrhythmien kam [80, 81]. In der retrospektiven Multicenter-Studie ADHERE (15.230 Patienten) wurde darüber hinaus 2005 für die Therapie mit positiv inotropen Substanzen wie Milrinon eine erhöhte Mortalität bei hospitalisierten Patienten mit akut dekompensierter Herzinsuffizienz gefunden [82].

Hier zeigt sich schon eines der Hauptprobleme bei der klinischen Anwendung von Modulatoren der cAMP-Level: nicht nur das mangelnde Verständnis der Signaltransduktion durch cAMP, sondern auch die unklaren Wirkungen der unterschiedlichen Phosphodiesterasen führen zu einer hohen Rate an möglichen Nebenwirkungen in der Anwendung von PDE-Inhibitoren. Im Herzen konnten verschiedene Phosphodiesterasen nachgewiesen werden, unter anderem die PDE1, 2, 3, 4, 5, 8 und 9 [83]. Hierbei zeichnet sich die PDE3 durch hohe Expressionslevel aus – Hemmung dieser führt somit zu einer ausgeprägten Beeinflussung der cAMP-Level mit ebenfalls genauso vielseitigen Nebenwirkungen, sodass die Hemmung anderer Phosphodiesterasen, die kleine Stellschrauben darstellen, wahrscheinlich ein besseres Wirkungs-Nebenwirkungs-Verhältnis haben und somit ein wichtiges Thema aktueller Forschung darstellen. Zu diesen Stellschrauben gehören unter anderem die beiden analysierten PDEs (PDE2A3 und PDE8A1), weshalb im Folgenden nach allgemeiner Darstellung grundlegender kardialer Signalwege weiter hierauf eingegangen wird.

Die Kontraktion des Herzens ist eine der wichtigsten lebenserhaltenden Funktionen im menschlichen Körper, bei der cAMP eine zentrale Schlüsselrolle spielt. Die cAMP-Wirkung am Herzen sieht wie folgt aus: Durch Sympathikus-Stimulation kommt es über den  $\beta$ -adrenergen/cAMP-Signalweg zur PKA vermittelten Phosphorylierung der L-Typ-Calcium-Kanäle und der Ryanodin-Rezeptoren. Folglich steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche zu einer Kontraktion der Sarkomere in der Systole führt. Durch zusätzliche PKA vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban wird dessen inhibitorischer Effekt auf die SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, auf Deutsch: Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums; eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe) ausgeschaltet. Hierdurch wird durch diesen Transporter in der Diastole  $\text{Ca}^{2+}$  wieder in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Wirkung beendet. [46]

Daneben zeichnet sich die Regulation der Herzaktion durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen cAMP und dessen „Gegenspieler“ cGMP aus. Die gegenseitige Beeinflussung dieser Signalwege wird auch cyclic Nucleotide-Crosstalk genannt. Dieser Crosstalk beschreibt die Verknüpfung des  $\beta$ -adrenergen/cAMP/PKA-Signalwegs mit dem NO/cGMP/PKG-Signalweg, welche beide entgegengesetzte physiologische Bedeutungen haben.  $\beta$ -adrenerge Stimulation wirkt positiv inotrop und lusitrop, während durch NO-Stimulation cGMP negativ ino- und lusitrop am Herzen wirkt [84-89]. [90]

Die PDE2 nimmt in diesem Crosstalk zweifelsohne durch ihre duale Substrat-Spezifität eine Schlüsselrolle ein, es sind jedoch kardioprotektive und kardiotoxische Mechanismen denkbar, welche kontrovers diskutiert werden. Mehel et al. beschreiben 2013 [91] eine Hochregulation der PDE2 auf fast doppelte Level in humanen Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz und argumentieren, dass durch die somit stärkere Hydrolyse von cAMP durch die PDE2 der  $\beta$ -adrenerge/cAMP/PKA-Signalweg abgeschwächt wird. Hierdurch würde eine kardioprotektive Wirkung erzielt, da übermäßige sympathische Stimulation und kardialer Stress reduziert werden. Die Überexpression der PDE2A wird somit als potentielle therapeutische Strategie in der Therapie der Herzinsuffizienz gesehen. Dagegen beschreiben Zaccorato et al. 2015 [92], dass die Überexpression der PDE2 zu kardialer Hypertrophie führe, indem sie einen lokalen cAMP-Pool kontrolliere bzw. hydrolysiere, der jedoch antihypertroph wirke. Hier wird eine Inhibition der PDE2 als potentielles therapeutisches Ziel gesehen. Baliga et al. [93] sehen auch in der Inhibition der PDE2 kardioprotektive Effekte. Hier wird in einem Mausmodell gezeigt, dass Inhibition der PDE2 zur Verstärkung des NO/cGMP/PKG-Signalwegs führt, welcher seine kardioprotektive Wirkung im Funktionserhalt, aber auch strukturellen Erhalt des Herzens zeigt. Diese drei Beispiele, die selbst nur einen kleinen Auszug aus der Diskussion der kardialen Funktion der PDE2 darstellen, verdeutlichen die Dringlichkeit eines genaueren Verständnisses der Funktionsweise dieser Phosphodiesterase.

Weniger kontrovers wird der kardiale Einfluss der PDE8A diskutiert. Die Expression von PDE1-4 in Ventrikelmyozyten ist allgemein bekannt [94], daneben wurde jedoch erstmals 2010 von Patrucco et al. [95] eine Expression von der PDE8A in Ventrikelmyozyten beschrieben. PDE8A knock-out Mäuse zeigen eine Stimulation des  $\beta$ -adrenergen/cAMP/PKA-Signalwegs; es kommt zur stärkeren Aktivierung von L-Typ-

Calcium-Kanälen ( $I_{Ca,L}$ ) und verstärkter sarkoplasmatischer  $Ca^{2+}$ -Freisetzung unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Hierbei handelt es sich um die einzige kardiale Beschreibung von der PDE8A. Es ist wahrscheinlich, dass sie am Herzen eher einen Feinregulator von einzelnen cAMP-Kompartimenten darstellt, was sie als therapeutische Zielstruktur umso attraktiver macht.

### 1.3.2 PDE2A und PDE8A im Fokus aktueller Forschung

Gerade in den letzten Jahren findet sich ein reges Interesse außerhalb des kardialen Themengebiets an den beiden in dieser Arbeit analysierten Phosphodiesterasen, welches hier nur kurz dargestellt werden soll.

Insbesondere die PDE8A, die funktionell noch recht spärlich beschrieben ist, wird aktuell in zahlreichen Gruppen als Zielstruktur für potentielle Medikamente gesehen, welche eine Vielzahl an medizinischen Fachgebieten abdecken. So wird an PDE8A-Inhibitoren im Kontext von B-Raf-Inhibitor-resistenten Melanomen [96], der Therapie von Depressionen [97, 98], Asthma und COPD [99], HIV [100] und vielen weiteren Krankheitsbildern geforscht, sowie auch an einer Verwendung als Immunmodulator der T-Effektorzell-Adhäsion [101].

Ebenfalls finden sich im Fall der PDE2A zahlreiche vielversprechende präklinische Ergebnisse in nicht kardialen Gebieten. Dabei liegt ein Fokus auf neuropharmakologischen Anwendungsgebieten, wie z.B. Inhibition der PDE2A bei Stress-induzierter Depression [102] oder Therapie bei Fragilem-X-Syndrom, der häufigsten monogenen Ursache von geistiger Retardierung [103]. Bereits aus diesen vereinzelt Beispielen erkennt man deutlich die Relevanz der genauen Analyse der hier verwendeten Phosphodiesterasen und deren Verständnis auf molekularer Ebene.

### 1.3.3 Wahl der analysierten Phosphodiesterasen

Die PDE4-Familie gehört zu den am besten erforschten Phosphodiesterasen. In den Experimenten von Lohse et al. 2017 [38] konnte mittels FRET-basierter Messungen eine Ausbildung von signifikanten cAMP-Gradienten durch die PDE4A1 gezeigt werden. Dieses ist Grundlage und Vergleichsparameter für die weiteren in der vorliegenden Arbeit dargestellten Analysen. Diese cAMP-Gradienten können durch die von Lohse et al. [38] verwendeten Methoden zwar dargestellt werden, jedoch bleiben

weitere Einflussgrößen unklar. Einen potentiellen Angriffspunkt stellen hier die kinetischen Eigenschaften der PDEs dar. So wurde mit der PDE2A3 im Vergleich zur PDE4A1 eine Phosphodiesterase ausgewählt, die sich durch eine extrem hohe maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) und damit Hydrolyse-Geschwindigkeit für cAMP auszeichnet und mit der PDE8A1 eine für cAMP hochspezifische PDE mit einer folglich sehr niedrigen Michaelis-Konstante ( $K_m$ ).

	PDE2A3	PDE4A1	PDE8A1
$K_m$ ( $\mu M$ )	30	2,9-10	<b>0,06</b>
$V_{max}$ ( $\mu mol/min/mg$ )	<b>120</b>	0,58	bis zu 6,1 [104]

**Tab. 1 Kinetische Eigenschaften der Phosphodiesterasen 2A3, 4A1 und 8A1 für die Hydrolyse von cAMP.** [69] Angaben für  $V_{max}$  und  $K_m$  der PDE8A1 variieren in der Literatur. Unter anderem findet man zusätzlich  $K_m$ -Angaben bis maximal 0,28  $\mu M$  für die Aminosäuren (AS) 205-820 der PDE8A1 [105] oder Angaben im Bereich von 1,8 - 7  $\mu M$  für die katalytische Domäne der PDE8 [104].

### 1.3.4 PDE2A3

#### 1.3.4.1 Nomenklatur und Vorkommen

Die Familie der Phosphodiesterase 2 umfasst drei Isoenzyme mit verschiedenen Spleißvarianten (PDE2A1, PDE2A2 und PDE2A3). Sie gehört zur Gruppe der Phosphodiesterasen mit dualer Substrat-Spezifität, d.h. sie hydrolysiert sowohl cAMP als auch cGMP ( $K_m$ (cGMP) <  $K_m$ (cAMP)). Darüber hinaus zeichnet sie sich durch eine spezielle regulatorische Eigenschaft aus: die Aktivität der PDE2 steigt durch allosterische Bindung von cGMP. Somit wird die PDE2 seit Erstbeschreibung 1982 ihrer bovinen Form [106], als auch ihrer 1997 isolierten humanen Form [107] als cGMP stimulierte Phosphodiesterase bezeichnet. [107, 108]

	cAMP	cGMP
$K_m$ ( $\mu M$ )	30	10
$V_{max}$ ( $\mu mol/min/mg$ )	120	123

**Tab. 2 Kinetische Eigenschaften der Phosphodiesterase 2A3.** [69]

Die Spleißvariante PDE2A3 ist ein 941 Aminosäuren (AS) langes Enzym mit einer Molekülmasse von 105.715 Da. Die humane PDE2A3 ist vor allem im Gehirn exprimiert, nachfolgend ist sie mit mittleren Expressionsleveln in Herz, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas und mit niedrigen Leveln in Lunge und Plazenta zu finden. [107]

### 1.3.4.2 Struktureller Aufbau der PDE2A3

Eine strukturelle Besonderheit der PDE2A ist das Vorkommen von GAF-Domänen. GAF ist ein Akronym für die drei Familien, in denen diese Domänen zuerst beschrieben wurden:

- Mammalian cGMP-dependent phosphodiesterases
- Anabaena adenyl cyclases
- E.coli FhIA [109]

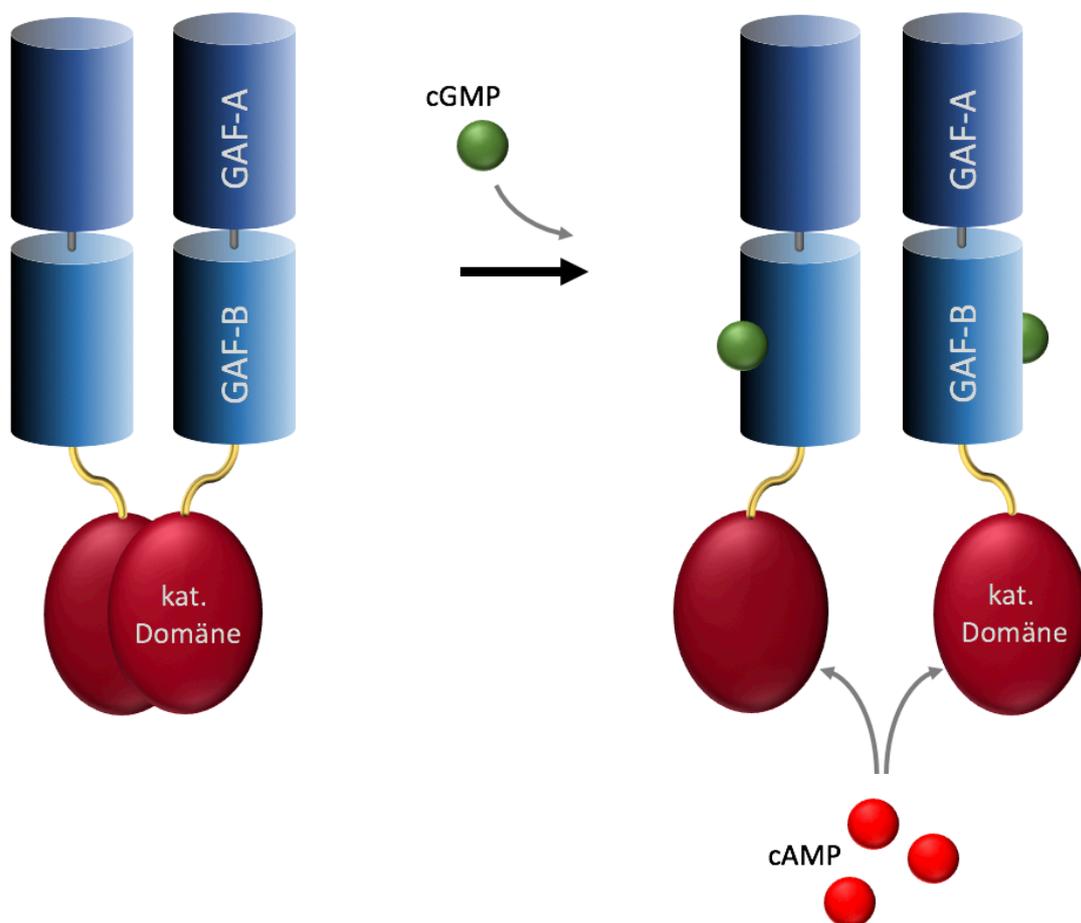
Bei diesen GAF-Domänen handelt es sich um eine der am weitverbreitetsten Domänen verschiedenster Spezies [109, 110]; beim Menschen wurden Untergruppen dieser jedoch nur in den Phosphodiesterasen 2, 5, 6, 10 und 11 gefunden, wo sie jeweils in ein- oder zweifacher Ausführung vorkommen. Die in dieser Arbeit im Detail betrachtete PDE2 besitzt zwei GAF-Domänen, von welchen jedoch nur eine eine cNMP-Bindungsstelle enthält [111]. Strukturell ähneln diese Domänen der PAS-Domäne, einer bei der PDE8 vorkommenden Domäne, die eine ähnliche Faltung zeigt (s.u.) [109]. Sowohl in den Spleißvarianten der PDE2 als auch der PDE5 wurden stimulierende Eigenschaften der GAF-Domänen gefunden, sodass man diese als regulatorische Domänen bezeichnen kann. [112]



**Abb. 4** Schematischer Aufbau der PDE2A3 mit regulatorischen Domänen (GAF-A / GAF-B) und katalytischer Domäne (nicht maßstabsgetreu).

Mithilfe der ersten Kristallstrukturen der PDE2A konnte der Unterschied der Funktion beider vorkommender GAF-Domänen, GAF-A und GAF-B, genauer analysiert werden. Die GAF-A-Domäne dient der Dimerisierung zweier PDE2-Enzyme zu parallelen

Homodimeren. Die GAF-B-Domäne dagegen enthält eine Bindungsstelle für cGMP. cGMP-Bindung initiiert eine Konformationsänderung, es kommt zu einer Drehung der H-Loop, einer Verbindungsschleife zwischen GAF-B- und katalytischer Domäne, sodass das Dimer in einem geöffneten Zustand vorliegt und cAMP leichter an die katalytische Domäne binden kann (Abb. 5). Durch diesen Mechanismus führt cGMP-Bindung zu einer Stimulation der Aktivität der katalytischen Domäne für cAMP-Hydrolyse [111-116]. Der umgekehrte Effekt der Stimulation der cGMP-Hydrolyse durch allosterische cAMP-Bindung wird in der Literatur erwähnt, kann jedoch weder belegt noch verworfen werden; weitere Bearbeitung wäre hier nötig. [69]



**Abb. 5 Schematische Darstellung des PDE2A3-Dimers unter cGMP-Stimulation.** Links: PDE2A3-Dimer ohne cGMP-Bindung an der GAF-B-Domäne. Die beiden katalytischen Domänen sind nach innen rotiert, eine cAMP-Bindung in der Bindungstasche ist erschwert. Rechts: Durch Bindung von cGMP an der GAF-B-Domäne kommt es zu einer Rotation der Linker-Helices. Die H-Loop (gelb) schwingt nach außen, cAMP-Bindung wird erleichtert, da die cAMP-Bindungstasche leichter erreichbar ist. [116]

### **1.3.4.3 Pharmakologische Eigenschaften**

Die Phosphodiesterase 2A stellt die Subfamilie der Phosphodiesterasen mit einer der höchsten Umsatzgeschwindigkeiten für cAMP dar (s.o.) [69]. Daneben hydrolysiert sie ebenfalls cGMP ( $V_{\max} = 123 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ,  $K_m = 10 \mu\text{M}$  [69]) mit nahezu gleicher Umsatzgeschwindigkeit.

Wie jede Subfamilie der Phosphodiesterasen lässt sich die PDE2A durch verschiedene Substanzen spezifisch inhibieren. Einer dieser spezifischen, universellen Inhibitoren ist Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin (EHNA) ( $IC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ ), welcher bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  die hydrolytische Aktivität von cAMP um 76 % und die von cGMP um 87 % reduziert [107, 117]. Dieser Inhibitor ermöglicht somit die Analyse von PDE2-spezifischen Effekten und stellt damit gleichzeitig einen potentiell therapeutisch nutzbaren Wirkstoff dar.

Eine weitere besondere pharmakologische Eigenschaft der PDE2 ist die bereits oben erwähnte cGMP-abhängige Stimulation der hydrolytischen Aktivität von cAMP. Dies ist eine in der Literatur sehr konstant aufgeführte Eigenschaft der PDE2A, jedoch differieren die Angaben über die Stimulationsrate zwischen 1,6-facher bis hin zu 50-facher Stimulation, sodass eine genaue Angabe über das Ausmaß dieser Stimulation unklar bleibt [106, 107, 116, 118-122].

### **1.3.5 PDE8A1**

#### **1.3.5.1 Nomenklatur und Vorkommen**

Die Phosphodiesterasen der Gruppe 8, PDE8A und PDE8B, unterscheiden sich deutlich von den übrigen Phosphodiesterasen. Die PDE8A wurde zuerst in den 1990er Jahren als Protein einer Maus-Spezies beschrieben [123], kurz darauf wurden Teile der humanen PDE8A isoliert und sequenziert. Hier wurde sie erstmals durch die geringere Übereinstimmung zu anderen Phosphodiesterasen charakterisiert (38,5% Aminosäuren-Überschneidungen der katalytischen Domäne mit der der PDE4) [124]. Die PDE8A ist ebenfalls eine vielfältig vorkommende PDE, die in zahlreichen Geweben exprimiert ist, darunter am stärksten im Hoden, gefolgt von Milz und Kolon und in absteigender Reihenfolge in Dünndarm, Ovar, Plazenta, Lymphknoten, Prostata, Pankreas, Niere,  $T_H1$ -Zellen,  $T_H2$ -Zellen, Leukozyten, Lunge, Gehirn, Leber, Thymus, Herz, Knochenmark, Skelettmuskel. [125]

### 1.3.5.2 Struktureller Aufbau der PDE8A1

Bei der PDE8A handelt es sich um ein hydrophiles Protein, welches somit zytosolisch lokalisiert ist. Das 829 Aminosäuren lange Protein zeichnet sich vor allem durch 3 Domänen aus: die N-terminal lokalisierten Receiver- (REC) und Per-Arnt-Sim- (PAS) Domänen und die C-terminal lokalisierte katalytische Domäne (Abb. 6) [123]. Der Name der PAS-Domäne leitet sich von den Proteinen her, in denen diese zuerst gefunden wurden; *Drosophila* Period (**P**er), human **A**rnt, und *Drosophila* Single-minded (**S**im) [126, 127]. Der direkte Einfluss der PAS-Domäne in Phosphodiesterasen bleibt jedoch unklar. Sie ist spezifisch für die PDE8A1 und ist durch Beteiligung an Protein-Wechselwirkungen wahrscheinlich als regulatorische Domäne zu betrachten [123, 125]. Der humanen REC-Domäne werden ebenfalls regulatorische Funktionen zugeschrieben [125, 128]. Da im Vergleich zwischen der gesamten PDE8A und trunkierten Versionen der PDE8A Differenzen in der enzymatischen Aktivität (s.u.) auftreten, spricht dies entgegen anfänglicher Meinungen für einen potentiellen Einfluss der genannten Domänen [104, 105]. [125]



**Abb. 6 Schematischer Aufbau der PDE8A1 mit regulatorischen Domänen (REC, PAS) und katalytischer Domäne (nicht maßstabsgetreu).**

Eine weitere Besonderheit der PDE8A1 findet sich in der Gensequenz. Hervorzuheben ist hierbei die Promotor-Region, die Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren wie ATF-1 [129], E2F und TAF-1 [130] besitzt, was eine potentiell cAMP-abhängige Genexpression nahelegt, wie sie auch bei der PDE1 und PDE4 zu beobachten ist [131]. [125]

### 1.3.5.3 Pharmakologische Eigenschaften

Die PDE8A gehört zu den cAMP-spezifischen Phosphodiesterasen und ist durch eine hohe Affinität zu diesem Substrat gekennzeichnet:  $K_m(\text{cAMP}) = 55 \text{ nM}$ ,  $K_m(\text{cGMP}) = 124 \text{ }\mu\text{M}$ , was eine ca. 2.000-fach höhere Affinität für cAMP bedeutet [124]. In der Literatur divergieren die Angaben über den  $K_m$ -Wert jedoch. Es sind Werte bis zu  $0,28 \text{ }\mu\text{M}$  für die AS 205-820 und bis zu  $7 \text{ }\mu\text{M}$  für die katalytische Domäne beschrieben, die sich zusätzlich noch je nach gewähltem Puffer unterscheiden [105].

Auch die Geschwindigkeit der cAMP-Hydrolyse ist unzureichend beschrieben; es finden sich Angaben im Bereich von  $V_{\max} = 1,5 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  für eine trunkierte PDE8 (C-terminalen 545 AS) [124] bis hin zu  $4,5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  ( $\text{Mg}^{2+}$  als Cofaktor) und  $6,1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  ( $\text{Mn}^{2+}$  als Cofaktor) für die katalytische Domäne (AS 480-820) [104]. Eine genaue Umsatzgeschwindigkeit der gesamten PDE8A1 ist nicht bekannt. Rybalkin et al. [132] finden sogar eine Umsatzgeschwindigkeit im Bereich von  $V_{\max} = 43 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ , diskutieren die für die PDE8A ermittelten Werte jedoch äußerst kritisch. Im Gegensatz zu der PDE2 findet sich keine Modulation der hydrolytischen Aktivität durch cGMP bei Konzentrationen bis  $100 \mu\text{M}$ . *In vitro* zeigt sich ebenfalls eine Abhängigkeit vom Cofaktor  $\text{Mg}^{2+}$ , jedoch auch von  $\text{Mn}^{2+}$ . Eine weitere spezielle Eigenschaft ist, dass die PDE8 nicht sensitiv gegenüber klassischen PDE-Inhibitoren ist, darunter auch IBMX. Die fehlende Inhibition durch den sonst ubiquitären PDE-Inhibitor IBMX ist nur bei der PDE8A, PDE8B und PDE9 bekannt [133]. Hierfür kann eine signifikant veränderte Umgebung zur cAMP-Bindungsstelle im Vergleich zu den anderen PDEs ursächlich sein. Ein wirksamer unspezifischer Inhibitor ist Dipyrimidol ( $\text{IC}_{50} = 9 \mu\text{M}$ ). Seit 2010 ist jedoch der erste spezifische Inhibitor beschrieben, PF-04957325, mit einem  $\text{IC}_{50}$  von  $0,0007 \mu\text{M}$  für PDE8A [134]. [124]

Die hohe Substratspezifität und -affinität der PDE8A lässt vermuten, dass diese vor allem in solchen Zellen exprimiert ist, die sich durch niedrige basale cAMP-Level auszeichnen. Es ist denkbar, dass sie dort für die Aufrechterhaltung dieser niedrigen Level sorgt, da die Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\max}$  vermutlich zu niedrig ist, um auf schnelle Signaltransduktionen zu reagieren. [124]

## 1.4 Methodische Grundlagen

### 1.4.1 Förster-Resonanz-Energie-Transfer

Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) oder auch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ist ein physikalisches Prinzip, welches vor allem breite Anwendung bei biochemischen Sensoren findet und 1948 von Theodor Förster publiziert wurde [135]. Es beschreibt den teilchenlosen Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren, wobei einer von diesen den Donor-Fluorophor, der andere den Akzeptor-Fluorophor darstellt. Hierfür müssen jedoch mehrere Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Erstens muss eine Überlappung des Emissionsspektrums des Donor-Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Fluorophors gegeben sein. Zweitens müssen sich

beide Fluorophore in einem entsprechenden Radius zueinander befinden, der im Bereich weniger Nanometer (<10 nm) liegt. Der sogenannte Förster-Radius beschreibt den Abstand ( $R_0$ ) der Fluorophore, in dem die Effizienz ( $E$ ) der Übertragung von strahlungsfreier Energie via FRET halbmaximal (50 %) ist.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

Aus der Formel (1) erkennt man, dass die FRET-Effizienz umgekehrt proportional zu der 6. Potenz des Abstands  $r$  zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor ist. Es besteht demnach eine sehr starke Abhängigkeit von der Lokalisation der Fluorophore zueinander. Ferner sollte beachtet werden, dass die Absorptionsspektren beider Fluorophore möglichst verschieden sind, sprich nicht überlappen, da sonst fälschlicherweise der Akzeptor-Fluorophor initial angeregt würde und die Messung somit falsch-positiv ausfällt. [135, 136]

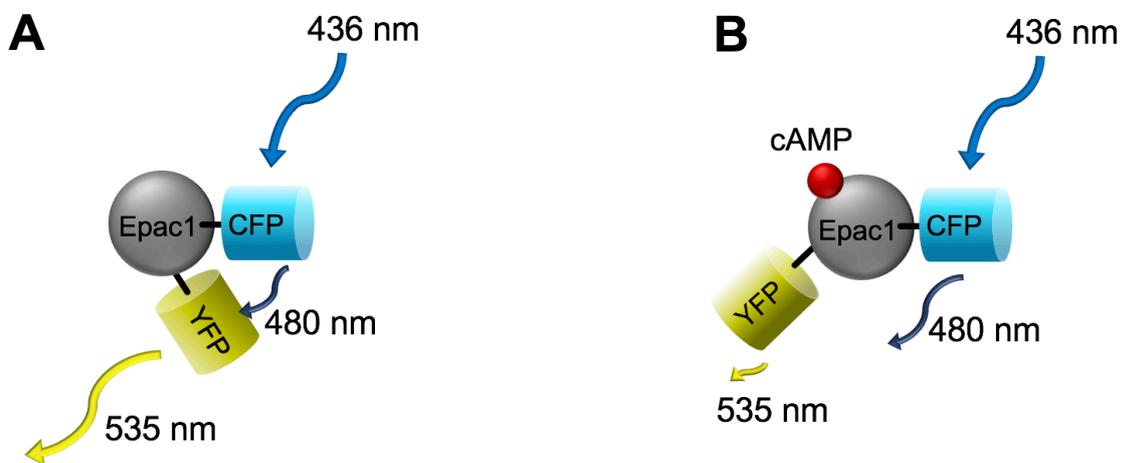
Durch Exzitation des Donor-Fluorophors mit entsprechender Wellenlänge (Exzitationswellenlänge) wird dieser angeregt und somit in einen höheren Energiezustand gebracht. Diese Energie wird nicht durch Photonen auf das Akzeptor-Fluorophor übertragen, sondern Strahlungs- und Teilchen-unabhängig durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Der Donor-Fluorophor erzeugt eine Oszillation im Akzeptor-Fluorophor. Der Akzeptor-Fluorophor tritt infolgedessen in einen höheren Energiezustand ein und gibt diese Energie in Form von Photonen und somit Licht definierter Wellenlänge ab. FRET kann folglich in einem Abfall der Intensität der Emissionswellenlänge des Donor-Fluorophors und einer Zunahme der Emissionswellenlänge des Akzeptor-Fluorophors detektiert werden. Ein etabliertes Fluorophor-Paar, welches die oben genannten Eigenschaften erfüllt, besteht aus dem cyan fluoreszierenden Protein (cyan fluorescence protein = CFP) und dem gelb fluoreszierenden Protein (yellow fluorescence protein = YFP). Diese wurden auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. [135, 136]

Förster-Resonanz-Energie-Transfer eignet sich durch spezifische Kopplung dieser Fluorophore, biochemische Prozesse darzustellen. Durch Kopplung an zwei verschiedene Moleküle kann direkte Interaktion nachgewiesen werden, wenn hierdurch die Fluorophore in einem entsprechenden Radius zusammengebracht

werden. Durch Kopplung beider Fluorophore an dasselbe Molekül, welches eine Strukturänderung durchführen kann und hiermit die Fluorophore in den Förster-Radius bringt oder aus diesem Radius entfernt, kann durch Detektion der beiden Emissionswellenlängen eine Aussage über diese Strukturänderung gemacht werden. Somit kann FRET zum Bau von Sensoren verschiedenster Art genutzt werden. [135, 136]

#### 1.4.2 Monitoring von cAMP-Leveln mittels Epac1-camps-basiertem Sensor

Zur Messung von schnellen cAMP-Konzentrationsänderungen wurde der FRET-basierte Sensor Epac1-camps verwendet, welcher aus einer direkten Fusion von CFP und YFP an die cAMP-Bindungsdomäne von Epac1 besteht. Dieser Sensor zeigt eine homogene zytosolische Verteilung und besitzt eine einzige kurze Bindungsdomäne für cAMP, welche keine katalytische Aktivität oder weitere aktive Domäne enthält, die mit zellulären Prozessen interferieren kann. Daneben bietet Epac1-camps eine hohe örtliche und zeitliche Auflösung, sodass auch schnelle Konzentrationsänderungen von cAMP gemessen werden können. [9]



**Abb. 7 Schematische Darstellung des Epac1-camps-FRET-Sensors.** **A** In Abwesenheit von cAMP stehen YFP und CFP des Sensors Epac1-camps in entsprechend nahem Radius zueinander, sodass durch Exzitation von CFP mit Licht der Wellenlänge 436 nm dieses angeregt wird und über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen Energie an YFP überträgt. Hierdurch wird YFP angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 535 nm. Da Energie von CFP über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen abgegeben wurde, fällt die eigentliche Emission von CFP bei 480 nm gering aus. Dieses ergibt in dem Quotient YFP-Emission ( $\uparrow$ ) / CFP-Emission ( $\downarrow$ ) ein hohes FRET-Signal. **B** Bindet cAMP an Epac1-camps kommt es zur Konformationsänderung. YFP und CFP stehen nun entfernter zueinander, sodass die Energieübertragung von CFP auf YFP durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen geringer ausfällt. Unter Detektion von cAMP kommt es somit zu einem Abfall des FRET-Signals. Sensordarstellung angelehnt an Herget et al. [137]

### 1.4.3 Single-Alpha-Helix-Linker

In der vorliegenden Arbeit wurden Phosphodiesterase und Sensor in einem bestimmten Abstand voneinander getrennt. Als Abstandshalter, der gleichzeitig eine Art „Lineal“ darstellt, wurde ein sogenannter Linker definierter Länge verwendet. Die räumliche Trennung dient dazu, in einem definierten Abstand, hier 30 nm, die Konzentration an cAMP zu messen und im idealen Fall dadurch eine Aussage über den Radius und damit die Größe der cAMP-Domäne zu machen.

Verwendet wurde eine  $\alpha$ -Helix als Linker (engl.: single-alpha-helix, kurz SAH) der Länge 30 nm, welche aus einer alternierenden Sequenz von ca. vier Glutaminsäure- (Abkürzung: E), gefolgt von ca. vier Arginin- (Abkürzung: R) bzw. Lysin- (Abkürzung: K) Resten besteht, weshalb dieser Linker im Folgenden auch als ER/K-Linker bezeichnet wird [138]. Dieser Linker zeichnet sich vor allem durch zwei für das experimentelle Setup wichtige Eigenschaften aus: Erstens gibt es eine genetisch codierte Sequenz für definierte Linker-Längen, welche ein „Einbauen“ des Linkers an erwünschter Stelle mittels Klonierung ermöglicht. Zweitens handelt es sich bei dem Linker um ein stabiles Protein ohne Interaktion mit Sensor oder PDE, es ist stabil unter extremen pH-Werten, Salz-Konzentrationen und Temperaturen. [139, 140]

## 1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

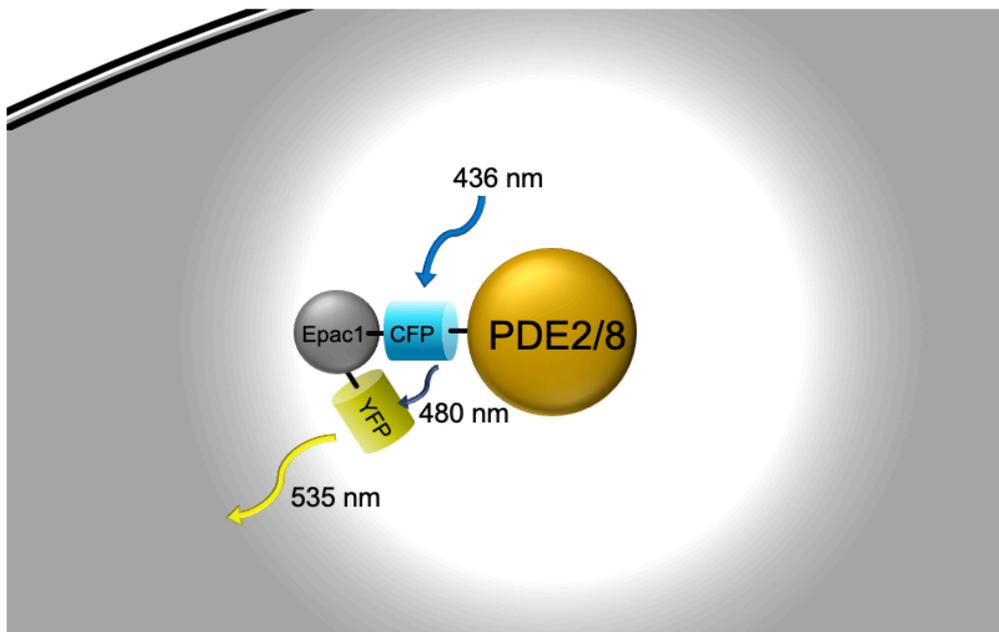
Das Ziel dieser Arbeit ist die weitere Charakterisierung von cAMP-Domänen, wie sie unter anderem schon von Herget et al. 2008 [137], Lohse et al. 2017 [38] und Bock et al. 2019 (unveröffentlicht) mit der Phosphodiesterase 4A1 gezeigt werden konnten. Dementsprechend sollen mit gleicher Methodik cAMP-Domänen, also cAMP-freie bzw. cAMP-arme Bereiche der Zelle, mit anderen PDEs aufgelöst werden. Dazu werden Phosphodiesterasen mit unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften verwendet, in diesem Fall die PDE2A, die sich durch eine extrem hohe Umsatzgeschwindigkeit auszeichnet, und die PDE8A1, die hochspezifisch für cAMP ist. Hiermit soll der direkte Einfluss von den Größen „Umsatzgeschwindigkeit“ bzw. „Substratspezifität“ auf cAMP-Domänen dargestellt und bewertet werden.

Um den Einfluss dieser Größen weiter zu quantifizieren, sollen die Domänen ausgemessen werden, indem ein stabiler Linker definierter Größe verwendet wird, welcher als „Lineal“ zwischen Sensor und Enzym fungiert, um in dieser Entfernung von der Phosphodiesterase die cAMP-Level der Zelle zu bestimmen (Abb. 9).

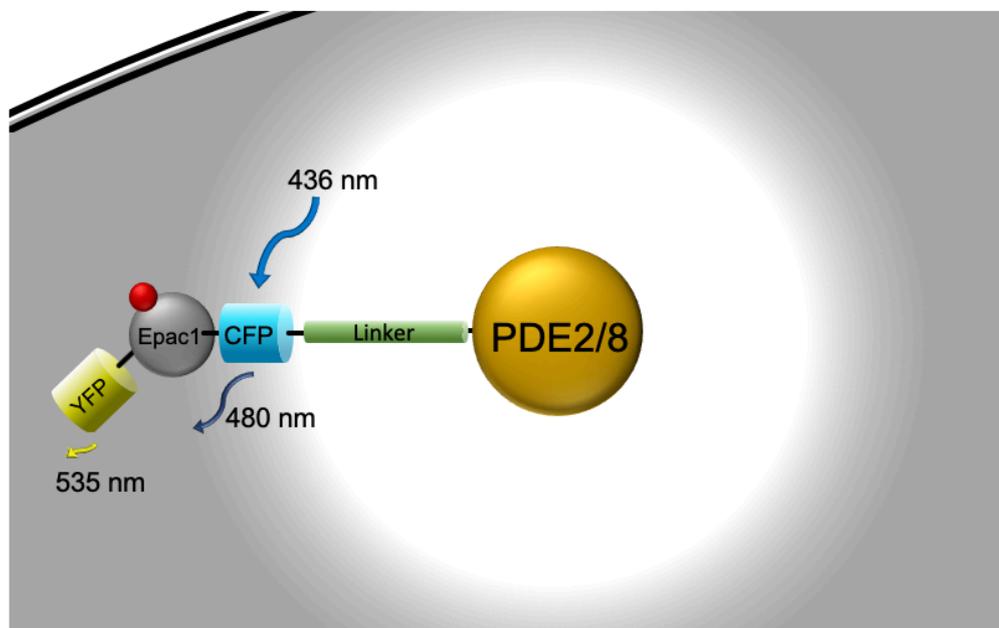
Zusammengefasst sind die Zielsetzungen und Fragestellungen des Projekts folgende:

- Identifizierung von kinetischen Einflussfaktoren auf das Vorhandensein und die Größe von cAMP-Domänen:
  - Besitzt die Umsatzgeschwindigkeit und/oder die Substratspezifität einen Einfluss auf cAMP-Domänen? Welcher Einfluss überwiegt?
  - Unterscheidet sich die Größe der Domänen im Bezug auf diese Eigenschaften?
  - Sind die Gradienten statisch oder dynamisch, sprich können sie durch regulatorische Faktoren beeinflusst werden?
  - Bedingt cAMP-hydrolytische Aktivität immer die Ausbildung von cAMP-Gradienten?

Diese grundlegenden Überlegungen und Bearbeitungen dienen langfristig einerseits dem besseren Verständnis des Aufbaus von Signalwegen und der Signal-Kompartimentierung der Zelle, andererseits aber auch dem weiteren Verständnis der spezifischen Funktion einzelner Phosphodiesterasen in diesen komplexen Signalwegen. Letzteres ist klinisch als absolut relevant zu bewerten, zumal Phosphodiesterasen, wie bereits dargestellt, als therapeutisches Target verwendet werden, mangelndes Wissen über die PDEs selber, aber auch über ihre Signalwege jedoch in einigen Fällen bereits zu erheblichen Nebenwirkungen führten. Sie stellen nichtsdestotrotz einen interessanten und vielversprechenden Angriffspunkt für Arzneimittel dar aufgrund zum Teil spezifischer Organexpression und Relevanz in der Pathophysiologie einer Vielzahl von Krankheitsbildern.



**Abb. 8** Vermessung der cAMP-Nanodomänen I: direkte Fusion der PDE2A3 bzw. PDE8A1 mit dem Sensor Epac1-camps. Versuchsaufbau analog zu Epac1-camps-PDE4A1 [38]. Darstellung eines Ausschnitts aus der Zelle (grau: hohe cAMP-Konzentration, weiß: niedrige cAMP-Konzentration). Durch Anregung des Epac1-camps-Sensors kommt es im cAMP-freien/armen Raum zu einem hohen FRET-Signal. Das zugrundeliegende Prinzip ist, in der direkten Umgebung der Phosphodiesterase zu messen, um einen möglichen cAMP-freien/armen Raum um diese herum zu detektieren.



**Abb. 9** Vermessung der cAMP-Nanodomänen II: Prinzip des Linkers. Epac1-camps und PDE2A3 bzw. PDE8A1 werden mithilfe eines Linkers in einem definierten Abstand (hier 30 nm) getrennt. Falls die entsprechende von der Phosphodiesterase ausgebildete Nanodomäne einen geringeren Radius als die verwendeten 30 nm hat, würde man eine Detektion des Sensors von cAMP erwarten. Legende analog zu Abb. 8.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien:

#### 2.1.1 Bakterienstamm

B1 *E. coli* XL1-Blue Stratagene (San Diego, CA, USA)

#### 2.1.2 Plasmid-Vektoren

P1 pcDNA3.1 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

#### 2.1.3 cDNA

D1 PDE2A3 (NM\_002599) Origene (Rockville, MD, USA)

D2 PDE8A1 (NM\_002605) Origene (Rockville, MD, USA)

D3 Epac1-camps-PDE4A1 Herget et al. [137]

D4 Epac1-camps-SAH30-PDE4A1 Dr. A. Bock (Universität Würzburg  
(unveröffentlicht))

D5 pBluescript sk(+) Dr. U. Zabel (Universität Würzburg)

#### 2.1.4 Zyklische Nukleotide

N1 cAMP Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

N2 cGMP Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

#### 2.1.5 Chemikalien

C1 1 kB Ladder New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

C2 Agar AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

C3 Agarose = PeqGOLD  
Universalagarose Peqlab (Erlangen, Deutschland)

C4 Ampicillin Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

C5 Benzamidin Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

C6 BES (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-  
aminoethansulfonsäure) AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

C7 BSA New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

C8 CaCl<sub>2</sub> Merck (Darmstadt, Deutschland)

C9 DMSO Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

C10	dNTPs	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
C11	EDTA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
C12	EHNA	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
C13	Ethanol 100%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
C14	Ethanol 70%	Chemsolute®, Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
C15	Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
C16	Glykogen	Roche (Basel, Schweiz)
C17	H <sub>2</sub> O steril (Ampuwa)	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
C18	HCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
C19	IBMX	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
C20	Isopropanol 100%	Chemsolute®, Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
C21	KCl	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
C22	Ladepuffer Gel Loading Dye, Purple (6X), no SDS	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
C23	MgCl <sub>2</sub>	Chemsolute®, Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
C24	MnCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
C25	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
C26	NaCl	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
C27	NaOH	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
C28	PEG 3000	Merck (Darmstadt, Deutschland)
C29	PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
C30	Potassiumacetat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
C31	SDS (w/v)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
C32	TAE	EMD Millipore Corporation (Burlington, MA, USA)
C33	Tris	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
C34	Trypsin-Inhibitor from Soybean	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

C35	Trypton	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
C36	Yeast	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

### 2.1.6 Enzyme und Kits

E1	Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
E2	Antarctic Phosphatase Buffer	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
E3	Ascl	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
E4	BamHI	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
E5	Gel Extraktions Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
E6	HindIII	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
E7	KAPA HiFi PCR Kit	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
E8	Not-HF	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
E9	Pfu Polymerase	Promega (Madison, WI, USA)
E10	Pfu Polymerase Buffer	Promega (Madison, WI, USA)
E11	Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
E12	RNAse A	Qiagen (Hilden, Deutschland)
E13	Restriction Buffer 1, 4	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
E14	T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
E15	T4-DNA-Ligase Buffer	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

### 2.1.7 Zellkultur

Z1	DMEM, 4,5% Glucose	PAN biotec (Aidenbach, Deutschland)
Z2	DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco® by life technologies (Carlsbad, CA, USA)
Z3	FCS = Fetal Calf Serum	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Z4	HEK-TsA-Zellen	ATCC (Manassas, VA, USA)
Z5	L-Glutamin	PAN biotec (Aidenbach, Deutschland)
Z6	Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Z7	Pen Strep	PAN biotec (Aidenbach, Deutschland)
Z8	Trypsin/EDTA	PAN biotec (Aidenbach, Deutschland)

### 2.1.8 Weitere Materialien

M1	Corning™ Falcon™ 15mL konische Zentrifugen Gefäße	Falcon® A Corning Brand (Corning, NY, USA)
M2	Corning™ Falcon™ 50mL konische Zentrifugen Gefäße	Falcon® A Corning Brand (Corning, NY, USA)
M3	Nalgene™ Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
M4	Petrischale 92x16mm unsteril	SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland)
M5	Pipetten: eppendorf research plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
M6	PP-Mikroreaktionsgefäß Eppendorf safe lock tubes 0,2 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
M7	PP-Mikroreaktionsgefäß Eppendorf safe lock tubes 1,5 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
M8	PP-Mikroreaktionsgefäß Eppendorf safe lock tubes 2 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
M9	Pipettenspitzen: SurPhob Safe Seal	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
M10	Rotilabo®-Gummiwischer	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
M11	Spin-Säule Ambion® Spin Column	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
M12	TC-Schale 100, Standard	SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland)
M13	TC-Schale 150, Standard	SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland)

### 2.2 Geräte

G1	Biometra T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
G2	Climo-Shaker ISF-1-V	Adolf Kühner (Birsfelden, Schweiz)
G3	CO <sub>2</sub> Inkubator HERAcell® 240	Heraeus (Hanau, Deutschland)
G4	Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
G5	eppendorf centrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
G6	eppendorf centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
G7	Gel-Dokumentationssystem E.A.S.Y® B-445-F	Herolab (Wiesloch, Deutschland)
G8	Gelkammer Biometra Compact	Biometra (Göttingen, Deutschland)

G9	Kühlschrank -20 °C LIEBHERR comfort	Liebherr (Bulle, Schweiz)
G10	Kühlschrank -80 °C HERA freeze	Heraeus (Hanau, Deutschland)
G11	Kühlschrank 6 °C LIEBHERR profi line	Liebherr (Bulle, Schweiz)
G12	Laminar-Flow Sicherheitswerkbank: Typ UVF 6.12S	BDK Luft- & Reinraumtechnik (Sonnenbühl, Deutschland)
G13	Luminescence Spectrophotometer LS50B	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
G14	Magnetrührer Heizrührer IKA- Combimag RCH	IKA®-Werke (Staufen, Deutschland)
G15	Mikrobiologischer Brutschrank Kelvitron ® t	Heraeus (Hanau, Deutschland)
G16	Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
G17	Mikrowelle Panasonic NN-E201WM	Panasonic (Kadoma, Osaka, Japan)
G18	Nanodrop® 2000/2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
G19	QIAvac 24 Plus	Qiagen (Hilden, Deutschland)
G20	Rotilabo®-mini-centrifuge	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
G21	Rotor Ultrazentrifuge TLA 120.2	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
G22	Spektrophotometer: UV-Visible UV- 1601	Shimadzu (Kyoto, Kyoto, Japan)
G23	ThermoMixer® 5436	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
G24	ULTRA-TURRAX® T8	IKA®-Werke (Staufen, Deutschland)
G25	Ultrazentrifuge Optima TLX ultracentrifuge CTX94A01	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
G26	UV-Transluminator TFX 35M	Biometra (Göttingen, Deutschland)
G27	Vortex VF2	IKA®-Werke (Staufen, Deutschland)
G28	Wasseraufbereitungssystem GenPure™ UV/UF xCAD	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
G29	Zentrifuge ROTANTA 96R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
G30	Zentrifuge ROTINA 48	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Allgemeines

Viele der hier dargestellten Methoden sind sehr etablierte Methoden der Zellkultur und Klonierung und anderweitig detailliert beschrieben, sodass in dieser Arbeit nur auf das Wesentliche der Methoden eingegangen wird.

Das bei den einzelnen Methoden verwendete  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  wurde mit dem Wasseraufbereitungssystem GenPure™ UV/UF xCAD<sup>(G28)</sup> aufbereitet, als  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  bei der Ligation wurde Ampuwa<sup>(C17)</sup> verwendet.

### 2.3.2 Zellkultur

Für sämtliche in dieser Arbeit benutzten Zellkulturmethoden wurden HEK-TsA-Zellen<sup>(Z4)</sup> verwendet. Hierbei handelt es sich um transformierte humane Nierenzellen, welche ein temperatur-sensitives Antigen exprimieren („Human Embryotic Kidney Cells“ = HEK; „Temperature-sensible Antigen“ = TsA). Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus und stellt für die hier dargestellten Experimente und Methoden eine etablierte Zelllinie dar.

Das Passagieren und Transfizieren der Zellen erfolgte stets unter aseptischen Bedingungen an der Laminar-Flow Sicherheitswerkbank<sup>(G12)</sup>; die Inkubation erfolgte im  $\text{CO}_2$ -Inkubator<sup>(G3)</sup> stets bei 37 °C und 7 %  $\text{CO}_2$ .

Zur Kultivierung der HEK-TsA Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/L Glucose<sup>(Z1)</sup> verwendet, welchem 10 % fötales Kälberserum<sup>(Z3)</sup> („Fetal Calf Serum“ = FCS), 100 U/mL Penicillin<sup>(Z7)</sup>, 100 µg/mL Streptomycin<sup>(Z7)</sup> und 2 mM L-Glutamin<sup>(Z5)</sup> hinzugefügt wurden. Im Folgenden wird dieses als „Medium“ bezeichnet.

#### 2.3.2.1 Auftauen von HEK-TsA-Zellen

Ein Aliquot der im flüssigen Stickstofftank gelagerten HEK-TsA-Zellen<sup>(Z4)</sup> wurde langsam auf Eis aufgetaut und zunächst in 10 mL Medium in eine TC-Schale (100 mm Durchmesser)<sup>(M12)</sup> überführt und für 20 min inkubiert. Nach Kontrolle des Anwachsens der Zellen mittels Lichtmikroskop<sup>(G16)</sup> wurden randständig 10 mL Medium vorsichtig mit der Glaspipette abgezogen, ohne dabei die Zellen von der Oberfläche zu lösen.

Anschließend wurden weitere 10 mL Medium hinzugegeben und für 12 h inkubiert. Danach folgte eine erneute Kontrolle des Wachstumsverhaltens mittels Lichtmikroskop<sup>(G16)</sup> und normales Passagieren der HEK-TsA-Zellen je nach Konfluenz.

### **2.3.2.2 Passagieren der HEK-TsA-Zellen in Kultur**

HEK-TsA Zellen wurden regelmäßig alle 2 - 4 Tage passagiert, sobald eine Konfluenz von 80-90 % erreicht wurde. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, kurz DPBS)<sup>(Z2)</sup> wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA<sup>(Z8)</sup> versetzt, welches zum Abkugeln und Ablösen der Zellen führt. Die überschüssige Lösung wurde sofort abgezogen und so lange inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen von der Platte<sup>(M12/13)</sup> lösten. Die Zellsuspension wurde mit frischem Medium versehen, auf neue Platten je nach Wachstumsverhalten aufgeteilt und mit genügend Medium (20 mL Endvolumen bei 150 mm Platte<sup>(M13)</sup>, 10 mL bei 100 mm Platte<sup>(M12)</sup>) aufgefüllt. Ein vorsichtiges Schwenken der Platte ermöglichte eine gleichmäßige Zellverteilung. Die passagierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

### **2.3.2.3 Einfrieren von HEK-TsA-Zelllinien**

HEK-TsA-Zellen<sup>(Z4)</sup>, die sowohl in Kultur ein ausgeprägtes und regelmäßiges Wachstumsverhalten wie auch eine hohe Transfektionsrate zeigten, wurden in niedriger Passage eingefroren, um als Vorrat zu dienen, sobald eine Zelllinie zu alt wurde (ca. Passage 25-30). Die entsprechenden Zellen wurden analog zu dem Passagieren trypsiniert, von der Platte gelöst und in frisches Medium gegeben. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugen-Gefäß<sup>(M1)</sup> überführt und die Zellen in der Tischzentrifuge<sup>(G30)</sup> abzentrifugiert (3 min, 800 rpm, Raumtemperatur (RT)). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet einer 100 mm Platte wurde in 1 mL Einfriermedium (DMEM mit 4,5 g/L Glucose<sup>(Z1)</sup>, 10% FCS<sup>(Z3)</sup> und 10% DMSO<sup>(G9)</sup>) resuspendiert. Die Zellen in Einfriermedium wurden in Kryoröhrchen<sup>(M3)</sup> in Mr.Frosty<sup>TM</sup><sup>(Z6)</sup> über Nacht bei -80 °C<sup>(G10)</sup> inkubiert, um am Folgetag in den flüssigen Stickstofftank umgelagert zu werden.

### **2.3.2.4 Transfektion von HEK-TsA-Zellen**

HEK-TsA-Zellen<sup>(Z4)</sup> wurden nach der Ca<sup>2+</sup>-Phosphat-Methode transfiziert. Hierbei bilden sich Calciumphosphat-Komplexe, welche kondensierte DNA enthalten und nicht

löslich sind; mittels Endozytose werden sie in die Zellen aufgenommen und von diesen exprimiert [141]. Hierfür wurden HEK-TsA<sup>(Z4)</sup> in 50-60 %iger Dichte auf 100 mm TC-Platten<sup>(M12)</sup> ausgesät. Nach 8 h Inkubation wurde 10 µg der zu transfizierenden DNA, 10 µg pcDNA3<sup>(P1)</sup>, 50 µL 2,5 M CaCl<sub>2</sub><sup>(C8)</sup> (steril filtriert) und 450 µL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (steril filtriert) hinzugegeben, mittels Vortex<sup>(G27)</sup> vermischt und 500 µL 2xBBS (50 mM BES<sup>(C6)</sup>, 280 mM NaCl<sup>(C26)</sup>, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><sup>(C25)</sup> x 2 H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, pH 6,95 bei 20 °C) hinzugefügt. Nach 20 min Inkubationszeit bei RT wurde die Lösung langsam auf die Zellen getropft und 48 h inkubiert. Die Transfektionsrate wurde entweder fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert oder im einfachen Lichtmikroskop anhand folgender für eine gute Transfektion sprechende Kriterien kontrolliert: Sichtbarkeit der Kristalle, leichte Abrundung der Zellen.

### 2.3.3 Zytosolpräparation

Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem DPBS<sup>(Z2)</sup> gewaschen und der flüssige Überstand abgenommen. Pro 100 mm TC-Platte<sup>(M12)</sup> wurden 300 µL Lysepuffer (10 mM MgCl<sub>2</sub><sup>(C23)</sup> und 10 mM Tris-HCl<sup>(C33, C18)</sup>, pH 7,4, 10 mM PMSF<sup>(C29)</sup> und 10 mM Proteinaseinhibitor (Stocklösung 100x bestehend aus: 2 mg/mL Trypsin-Inhibitor from Soybean<sup>(C34)</sup>, 6 mg/mL Benzamidin<sup>(C5)</sup> in 50 mM Tris-HCl<sup>(C33, C18)</sup> pH 7,4)) verwendet und die Zellen mit einem autoklavierten Zellschaber (Glasstab + Gummiwischer<sup>(M10)</sup>) gelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß<sup>(M7/8)</sup> überführt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra-Turrax<sup>(G24)</sup>) für zwei Runden á 15 s lysiert. Die Kerne und Zell-Debris wurden in der Tischzentrifuge<sup>(G5)</sup> abzentrifugiert (5 min, 1.000 g, 4 °C) und der Überstand erneut in der Ultrazentrifuge<sup>(G21, G25)</sup> (30 min, 100.000 g, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand hiervon wurde abgenommen und als fertige zytosolische Fraktion zeitnah gemessen. Während der Messungen folgte eine Lagerung des übrigen Zytosols im Dunkeln bei 6 °C. Die Zytosolpräparation erfolgte an jedem Messtag erneut. Jede separat transfizierte Zellplatte wurde während der gesamten Präparation separat als solche behandelt, auch wenn die transfizierte DNA dieselbe war.

### 2.3.4 Spektrofluorometer-FRET-Messung *in vitro*

Als Puffer diente bei den Spektrofluorometer Messungen der sogenannte „10/10-Puffer“ (10 mM MgCl<sub>2</sub><sup>(C23)</sup> und 10 mM Tris-HCl<sup>(C33, C18)</sup>, pH 7,4). Vor jeder Messung wurde die Menge an Zytosol durch Verdünnung (Gesamtvolumen 600 µL) auf die

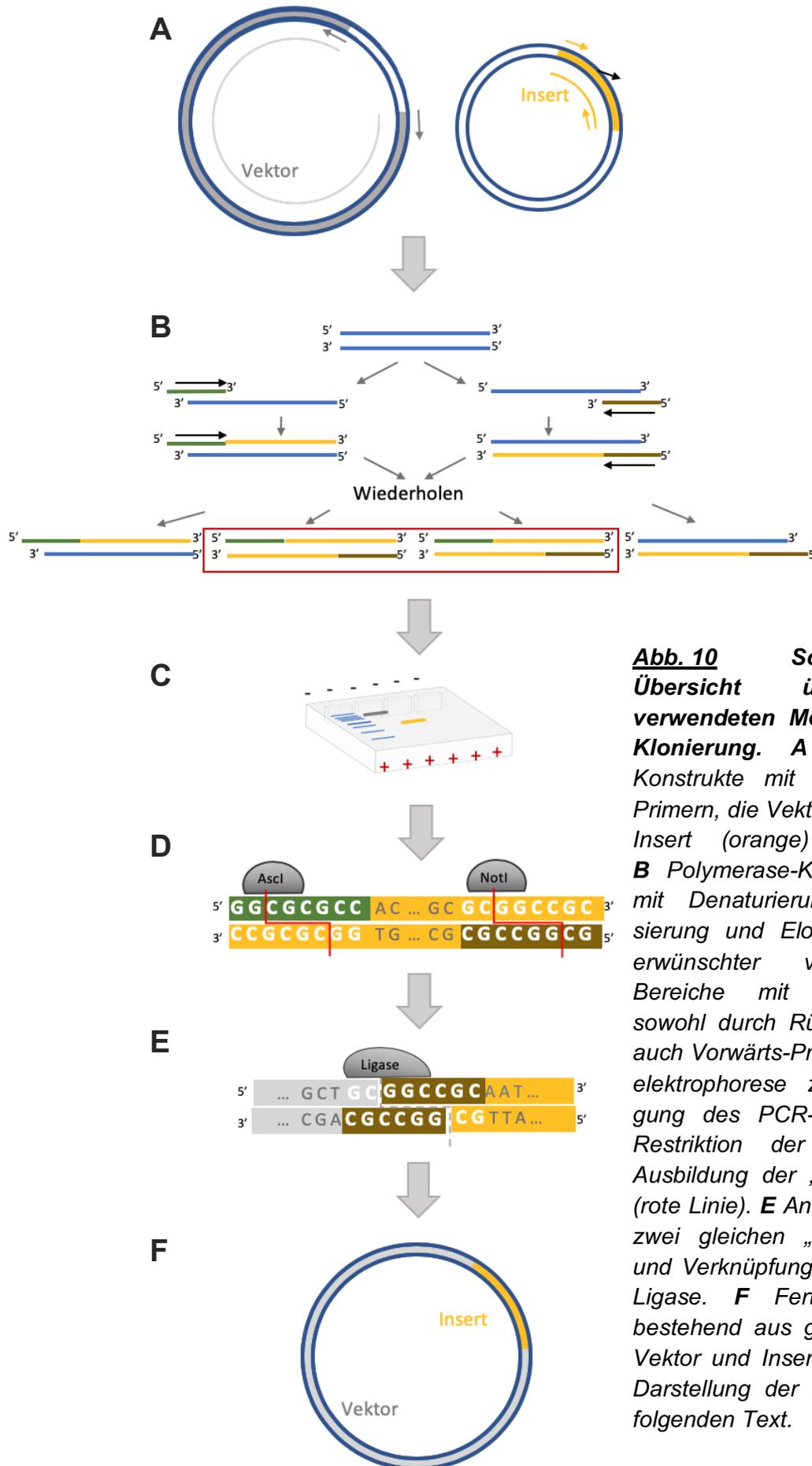
gleiche YFP Emissions-Intensität (400 arbitrary units (a.u.)) eingestellt, damit bei jeder Messung das gleiche Expressionslevel aller transfizierten Konstrukte vorausgesetzt ist. Dieses stellte den Messstandard dar und ermöglichte eine Vergleichbarkeit der erhobenen Daten.

Um Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) zu erstellen, wurden Fluoreszenz-Emissions-Spektren mit dem Spektrofluorometer<sup>(G13)</sup> aufgenommen. Dafür wurde die entsprechende Probe bei 436 nm angeregt und Emissions-Spektren zwischen 460 und 550 nm gemessen. Nach der basalen Messung erfolgte eine Zugabe von aufsteigenden cAMP<sup>(N1)</sup>-Konzentrationen, nach welcher jeweils sofort ein Spektrum aufgenommen wurde.

Zur ratiometrischen FRET-Messung mittel Spektrofluorometer<sup>(G13)</sup> wurde mit 436 nm angeregt und die Emission bei 480 nm (CFP) und 525 nm (YFP) zeitabhängig aufgenommen und direkt aus beiden Werten der Quotient YFP/CFP gebildet (hier im Weiteren als Ratio bezeichnet). Die Spaltbreite betrug jeweils 10 nm. Stimuliert wurde nach Plateaubildung in allen Kanälen mit 6 µL entsprechender cAMP<sup>(N1)</sup>-, cGMP<sup>(N2)</sup>, bzw. Inhibitor-Konzentrationen. Jede ratiometrische Änderung wurde anhand der aufgezeichneten CFP- und YFP-Kurven auf echtes FRET geprüft, um keine Artefakte zu missdeuten.

Jede separate Zytosolpräparation wurde auch bei reinen Aufnahmen von Spektren ratiometrisch auf Funktionsfähigkeit der überexprimierten Konstrukte durch Stimulation mit cAMP und Beurteilung des transienten FRET-Signals getestet.

### 2.3.5 Methoden der Klonierung



**Abb. 10** Schematische Übersicht über die verwendeten Methoden zur Klonierung. **A** Ausgangskonstrukte mit verwendeten Primern, die Vektor (grau) und Insert (orange) definieren. **B** Polymerase-Kettenreaktion mit Denaturierung, Hybridisierung und Elongation (rot: erwünschter vervielfältigter Bereiche mit Begrenzung sowohl durch Rückwärts- als auch Vorwärts-Primer). **C** Gel-elektrophorese zur Aufreinigung des PCR-Produkts. **D** Restriktion der DNA und Ausbildung der „sticky ends“ (rote Linie). **E** Anlagerung von zwei gleichen „sticky ends“ und Verknüpfung durch DNA-Ligase. **F** Fertiger Vektor bestehend aus gewünschtem Vektor und Insert. Detaillierte Darstellung der Prozesse im folgenden Text.

### 2.3.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Amplifikation der DNA bzw. zur spezifischen Vervielfältigung der Sequenz des gewünschten Inserts oder Vektors und zur Einfügung von Restriktionsstellen wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR (Polymerase Chain Reaction), verwendet. Zur Vervielfältigung von Insert und Vektor wurden spezifische Primer verwendet, die neben der komplementären Sequenz zum 5'- und 3'- Ende des Inserts / Vektors auch die erforderlichen Restriktionsstellen enthalten. Für Insert und Vektor ergibt sich demnach ein Primer-Paar bestehend aus einem Primer, der „vorwärts“ (durch fwd gekennzeichnet) läuft und einem der auf dem komplementären Strang „rückwärts“ (durch rev gekennzeichnet) läuft und damit die gewünschte Sequenz terminiert (Abb. 10A, Pfeile = Primer). Die eingefügten Restriktionsstellen dienen zum Ausschneiden der gewünschten Sequenz und zum gezielten Zusammenfügen von Insert und Vektor. Dafür werden diese so gewählt, dass an der zusammenzufügenden Stelle von Vektor und Insert beide dieselbe Restriktionsstellen aufweisen. Diese bilden im Verdau der DNA kleine komplementäre einzelsträngige DNA-Abschnitten aus, die sogenannten „sticky ends“ (klebrige Enden), welche durch Ligation zusammengeführt werden. Zusätzlich wurden repetitive, nicht kodierende Adenosin-Basen an die Primer angehängt, um eine Bindung der Restriktionsenzyme in diesem Bereich zu verbessern. Es ergaben sich folgende Primer:

#### **PDE4A1 Ascl-Site**

**P1:** *PDE4A1 Ascl insert fwd:*

5' AAAAAAAGGCGCGCCATGCCCTTGGTGGATTTC 3'

**P2:** *PDE4A1 NotI insert rev [137]*

#### **PDE2A3:**

**P3:** *PDE2A3 Ascl insert fwd:*

5' AAAAAAAGGCGCGCCGGGCAGGCATGCGGCCAC 3'

**P4:** *PDE2A3 NotI insert rev:*

5' AAAAAAGCGGCCGCTCACTCAGCATCAAGGCT 3'

#### **PDE2A3 katalytische Domäne (AS 578-941) [116]**

**P5:** *PDE2katD Ascl insert fwd:*

5' AAAAAAAGGCGCGCCTCCGACGATGAGTATAACCAACTT 3'

**P4:** *PDE2katD NotI insert rev (= PDE2A3 NotI insert rev):*

5' AAAAAAGCGGCCGCTCACTCAGCATCAAGGCT 3'

**PDE8A1:**

**P6:** *PDE8A1 Ascl insert fwd:*

5' AAAAAAAGGCGCGCCGGCTGTGCCCCGAGCATC 3'

**P7:** *PDE8A1 NotI insert rev:*

5' AAAAAAGCGGCCGCCTATTCAGGAGGTGGTTCG 3'

**PDE8A1 katalytische Domäne (AS 480-829) [104]**

**P8:** *PDE8katD Ascl insert fwd:*

5' AAAAAAAGGCGCGCCTCCCTTGATGATGTCCCACCACGG 3'

**P7:** *PDE8katD NotI insert rev (= PDE8A1 NotI insert rev):*

5' AAAAAAGCGGCCGCCTATTCAGGAGGTGGTTCG 3'

Zur Vervielfältigung wurden 10 µL Plasmid-DNA ( $c = 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) mit 2 µL dNTPs (10 mM)<sup>(C10)</sup>, 2,5 µL Vorwärts-Primer (20 pmol/µL), 2,5 µL Rückwärts-Primer (20 pmol/µL), 10 µL Pfu-Polymerase-Puffer<sup>(E10)</sup> und 72 µL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf Eis pipettiert und mit dem Vortex-Schüttler<sup>(G27)</sup> vermischt. Danach wurde 1 µL Pfu-Polymerase<sup>(E9)</sup> hinzugegeben und das Mikroreaktionsgefäß<sup>(M6)</sup> in den Thermocycler<sup>(G1)</sup> gegeben mit folgenden Einstellungen:

	Temperatur	Zeit	
<i>Initiierung</i>	94 °C	3 min	} 30x Wiederholung
<i>Denaturierung</i>	94 °C	30 s	
<i>Hybridisierung</i>	55 °C	1 min	
<i>Elongation</i>	72 °C	4 min	
<i>Finale Elongation</i>	72 °C	4 min	
<i>Abkühlen</i>	4 °C	∞	

**Tab. 3 PCR-Bedingungen**

**2.3.5.2 Aufreinigung des PCR-Produkts**

Die vervielfältigte DNA wurde auf einem 1 %igen Agarose-Gel mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Das Funktionsprinzip hiervon ist wie folgt: In einem

Agarose-Gel bildet sich ein Netzwerk aus Agarose-Polymeren, an welches Spannung angelegt wird. Die negativ geladene DNA wandert durch dieses Netzwerk zum Pluspol. Je größer jedoch die DNA ist, desto schwieriger ist es, die Zwischenräume zu überwinden; es wird eine geringere Strecke zurückgelegt. Demnach wird die DNA größenabhängig aufgetrennt. Mit der Konzentration an Agarose kann dieses „Netzwerk“ vergrößert und verkleinert werden, was je nach Fragment-Größe ein Aufreinigen erleichtert. Für ein 1 %iges Agarose-Gel wurde 150 mL TAE-Puffer<sup>(C32)</sup> mit 1,5 g Agarose<sup>(C3)</sup> in der Mikrowelle<sup>(G17)</sup> aufgekocht. Nach 15-minütigem Abkühlen wurde 7,5 µL Ethidiumbromid<sup>(C15)</sup> hinzugegeben und das Gel unter Verwendung entsprechender Gel-Kämme in die Gelkammer<sup>(G8)</sup> gegossen, wo es bei Raumtemperatur aushärtete. Ethidiumbromid dient hierbei zur Darstellung der DNA, da es in die DNA interkaliert, dessen Fluoreszenzintensität zunimmt und im UV-Licht sichtbar wird. Der TAE-Puffer<sup>(C32)</sup> diente ebenfalls als Laufpuffer der Gelelektrophorese. Das PCR-Produkt wurde zur Beschwerung mit Ladepuffer<sup>(C22)</sup> (Loading Dye) in die entsprechenden Geltaschen gefüllt. Zur Einschätzung der Größen wurde eine separate Tasche mit 1 kb DNA-Ladder<sup>(C1)</sup> (= Leiter) beladen, welches ein Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Größe ist und als „Lineal“ dient. Das fertig beladene Gel wurde 30 min bei 120 V und 400 mA in der Gelkammer<sup>(G8, G4)</sup> laufen gelassen. Die erwarteten Banden wurden mittels UV-Transluminator<sup>(G26)</sup> und Skalierung durch eine 1 kb DNA-Ladder<sup>(C1)</sup> visualisiert und aus dem Gel mittels Skalpell ausgeschnitten. Zur DNA-Isolierung aus der Gel-Bande wurde diese in eine Spin-Säule<sup>(M11)</sup> gegeben und zentrifugiert (5.000 g, 10 min, RT)<sup>(G5)</sup>. Bei zu geringer DNA-Ausbeute mit diesem Verfahren wurde alternativ das Qiagen Gel Extraktions Kit<sup>(E5)</sup> nach Protokoll des Herstellers verwendet.

### **2.3.5.3 DNA-Präzipitierung**

Für die weitere Verwendung des PCR-Produkts wurde die DNA präzipitiert. Hierfür wurde die entsprechende DNA mit dem dreifachen Volumen Ethanol<sup>(C14)</sup> und 1 µL Glykogen<sup>(C16)</sup> (ausreichend bis zu 500 µL Endvolumen) versetzt und bei -20 °C für mindestens 30 min inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 16.000 g, RT) und Verwerfen des Überstands wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol<sup>(C14)</sup> gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 16.000 g, RT), der Überstand verworfen und trocken gelassen.

### 2.3.5.4 PCR Peqlab

Um den DNA-Gewinn der PCR effektiver zu gestalten, wurde zur Vervielfältigung der DNA der PDE2A3 und der PDE8A1 ein PCR-Kit von Peqlab<sup>(E4)</sup> benutzt. Dafür wurden zu 10 µL der DNA (10 ng/µL), 62 µL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, 20 µL 5xGC Puffer, 3 µL dNTPs (10 mM) und 1,5 µL der entsprechenden Primer (20 µM) (s.o.) auf Eis hinzugegeben und zum Schluss unmittelbar vor Start des PCR-Programms mit 2 µL KAPA hifi vorsichtig gemischt. Die PCR Bedingungen gestalteten sich wie folgt:

	Temperatur	Zeit	
<i>Initiierung</i>	95 °C	3 min	} 30x Wiederholung
<i>Denaturierung</i>	98 °C	20 s	
<i>Hybridisierung</i>	65 °C	15 s	
<i>Elongation</i>	72 °C	2 min	
<i>Finale Elongation</i>	72 °C	2 min	
<i>Abkühlen</i>	4 °C	∞	

**Tab. 4 PCR-Bedingungen Peqlab Protokoll**

Zur Steigerung des Klonierungserfolgs wurde die DNA zusätzlich mittels Antarctic Phosphatase<sup>(E1, E2)</sup> nach Hersteller-Protokoll dephosphoryliert.

### 2.3.5.5 Restriktion der DNA

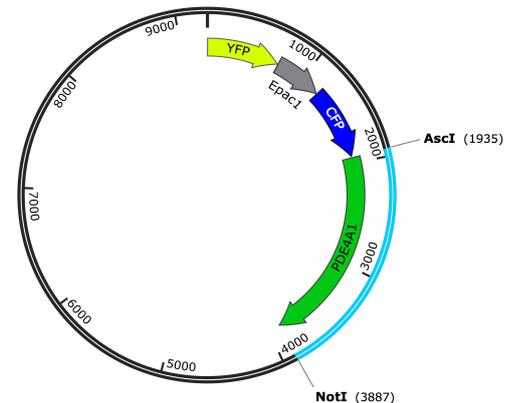
Um die mit den richtigen Restriktionsstellen versehene DNA in das gewünschte Insert bzw. Vektor zu schneiden, wurden 5 µL der entsprechenden DNA mit 2,5 µL der jeweiligen Restriktionsenzyme und mit 10 µL des entsprechenden Restriktionspuffers<sup>(E13)</sup> (10x) und bei Bedarf 10 µL 10xBSA<sup>(C7)</sup> (Abb. 11) vermischt und auf 100 µL mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 2 h bei 37 °C in dem ThermoMixer<sup>®(G23)</sup> inkubiert. Um dabei die zu den Restriktionsenzymen passenden Restriktionspuffer zu finden, wurde der Double Digest Finder des NEBcloner<sup>®</sup> von New England Biolabs verwendet [142].

### 2.3.5.6 Klonierungsstrategien

#### A Epac1-camps-PDE4A1 Ascl-Site

	VEKTOR	INSERT
Vorlage	Epac1-camps-SAH30-PDE4A1	Epac1-camps-PDE4A1
Primer		P1 P2
Restriktions-enzyme		Ascl <sup>(E3)</sup> Not-HF <sup>(E8)</sup>
NEB-Restriktions-puffer		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
Fragment	Vektor aus Epac1-camps mit pcDNA-Rückgrat, fehlende SAH30-PDE4A1	PDE4A1
Größe	7304 bp	1952 bp
Größe Konstrukt		9256 bp

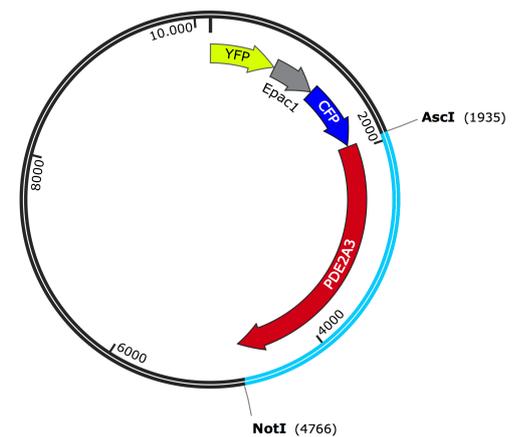
#### B



#### C Epac1-camps-PDE2A3

	VEKTOR	INSERT
Vorlage	Epac1-camps-PDE4A1 Ascl site	PDE2A3
Primer		P3 P4
Restriktions-enzyme		Ascl <sup>(E3)</sup> Not-HF <sup>(E8)</sup>
NEB-Restriktions-puffer		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
Fragment	Vektor aus Epac1-camps mit pcDNA-Rückgrat, fehlende PDE4A1	PDE2A3
Größe	7304 bp	2831 bp
Größe Konstrukt		10135

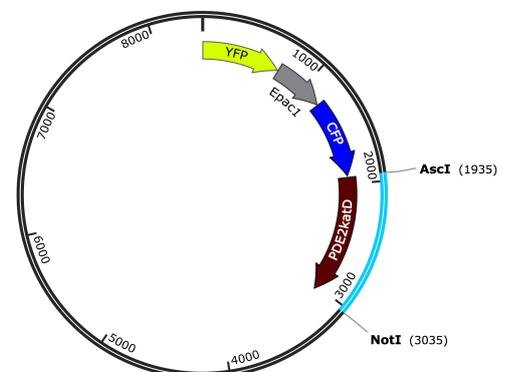
#### D



#### E Epac1-camps-PDE2katD

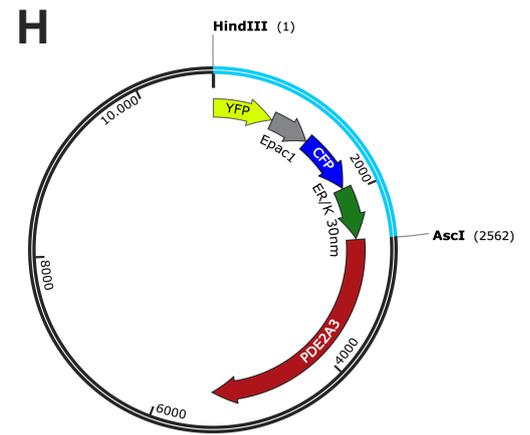
	VEKTOR	INSERT
Vorlage	Epac1-camps-PDE2A3	PDE2A3
Primer		P5 P4
Restriktions-enzyme		Ascl <sup>(E3)</sup> Not-HF <sup>(E8)</sup>
NEB-Restriktions-puffer		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
Fragment	Vektor aus Epac1-camps mit pcDNA-Rückgrat, fehlende PDE2A3	Katalytische Domäne der PDE2
Größe	7304 bp	1103 bp
Größe Konstrukt		8407 bp

#### F



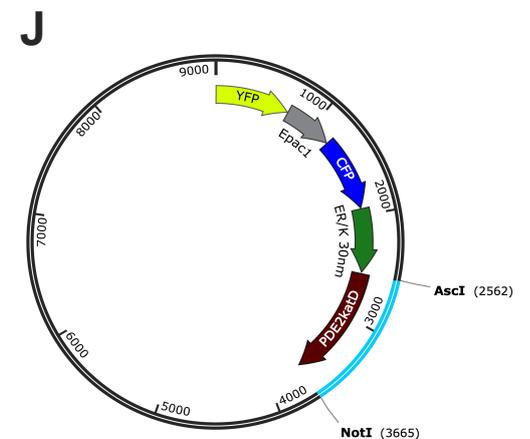
### G Epac1-camps-SAH30-PDE2A3

	VEKTOR	INSERT
<i>Vorlage</i>	Epac1-camps-PDE2A3	Epac1-camps-SAH30-PDE8A1
<i>Restriktions-enzyme</i>		Ascl <sup>(E3)</sup> HindIII <sup>(E6)</sup>
<i>NEB-Restriktions-puffer</i>		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
<i>Fragment</i>	Vektor aus PDE2 mit pcDNA-Rückgrat, fehlendes Epac1-camps	Epac1-camps-SAH30
<i>Größe</i>	8201 bp	2561 bp
<i>Größe Konstrukt</i>		10762 bp



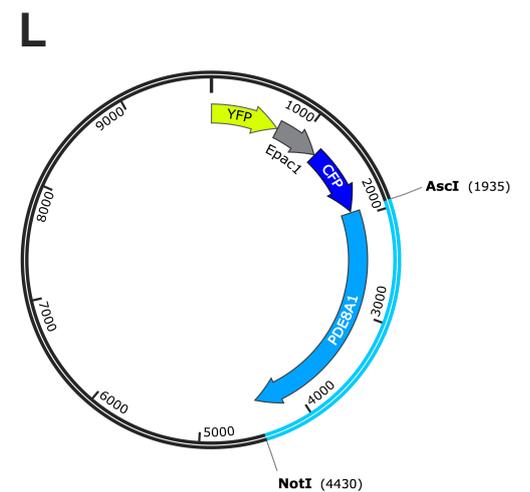
### I Epac1-camps-SAH30-PDE2katD

	VEKTOR	INSERT
<i>Vorlage</i>	Epac1-camps-SAH30-PDE2A3	Epac1-camps-PDE2katD
<i>Restriktions-enzyme</i>		Ascl <sup>(E3)</sup> Not-HF <sup>(E8)</sup>
<i>NEB-Restriktions-puffer</i>		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
<i>Fragment</i>	Vektor aus Epac1-camps-SAH30 mit pcDNA-Rückgrat, fehlende PDE2A3	Katalytische Domäne der PDE2
<i>Größe</i>	7931 bp	1103 bp
<i>Größe Konstrukt</i>		9034 bp



### K Epac1-camps-PDE8A1

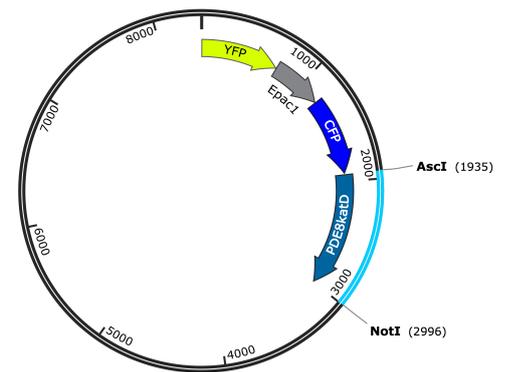
	VEKTOR	INSERT
<i>Vorlage</i>	Epac1-camps-PDE4A1 AscI-Site	PDE8A1
<i>Primer</i>		P6 P7
<i>Restriktions-enzyme</i>		Ascl <sup>(E3)</sup> Not-HF <sup>(E8)</sup>
<i>NEB-Restriktions-puffer</i>		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
<i>Fragment</i>	Vektor aus Epac1-camps mit pcDNA-Rückgrat, fehlende PDE4A1	PDE8A1
<i>Größe</i>	7304 bp	2495 bp
<i>Größe Konstrukt</i>		9799bp



### M Epac1-camps-PDE8katD

	VEKTOR	INSERT
Vorlage	Epac1-camps-PDE8A1	PDE8A1
Primer		P8 P7
Restriktions-enzyme		Ascl <sup>(E3)</sup> Not-HF <sup>(E8)</sup>
NEB-Restriktions-puffer		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
Fragment	Vektor aus Epac1-camps mit pcDNA-Rückgrat, fehlende PDE8A1	Katalytische Domäne der PDE8
Größe	7304 bp	1061 bp
Größe Konstrukt	8365bp	

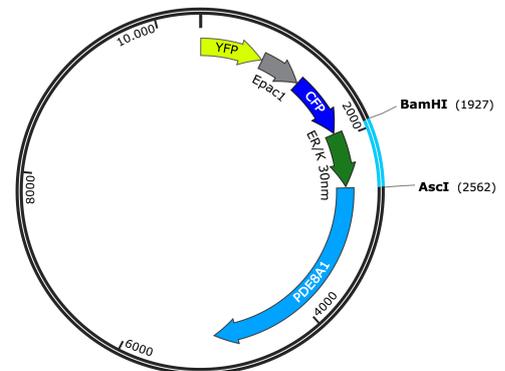
N



### O Epac1-camps-SAH30-PDE8A1

	VEKTOR	INSERT
Vorlage	Epac1-camps-PDE8A1	Epac1-camps-SAH30-PDE4A1
Restriktions-enzyme		Ascl <sup>(E3)</sup> BamHI <sup>(E4)</sup>
NEB-Restriktions-puffer		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
Fragment	Zwischen Epac1-camps und PDE aufgeschnittener Vektor	SAH30-Linker
Größe	9791 bp	635 bp
Größe Konstrukt	10426 bp	

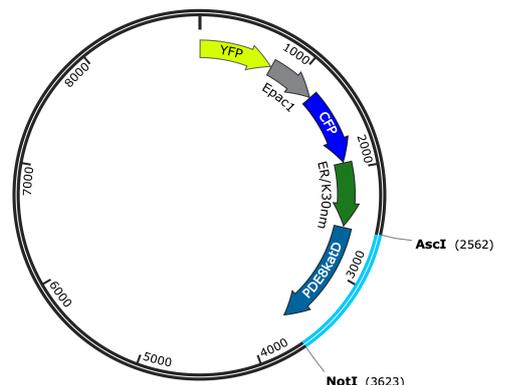
P



### Q Epac1-camps-SAH30-PDE8katD

	VEKTOR	INSERT
Vorlage	Epac1-camps-SAH30-PDE8A1	Epac1-camps-PDE8katD
Restriktions-enzyme		Ascl <sup>(E3)</sup> Not-HF <sup>(E8)</sup>
NEB-Restriktions-puffer		Puffer 4 <sup>(E13)</sup> + BSA <sup>(C7)</sup>
Fragment	Vektor aus Epac1-camps-SAH30 mit pcDNA-Rückgrat, fehlende PDE8	Katalytische Domäne der PDE8
Größe	7931 bp	1061 bp
Größe Konstrukt	8992 bp	

R



**Abb. 11** Klonierungsstrategien **A-B** Epac1-camps-PDE4A1-AscI-Site **C-D** Epac1-camps-PDE2A3 **E-F** Epac1-camps-PDE2katD **G-H** Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 **I-J** Epac1-camps-SAH30-PDE2katD **K-L** Epac1-camps-PDE8A1 **M-N** Epac1-camps-PDE8katD **O-P** Epac1-camps-SAH30-PDE8A1 **Q-R** Epac1-camps-PDE8katD **Linke Seite** (A, C, E, G, I, K, M, O, Q) Tabellarische Darstellung der Klonierungsstrategie. **Rechte Seite** (B, D, F, H, J, L, N, P, R) Vektor-Mappe des entsprechenden Konstrukts (blau: Insert, schwarz: Vektor).

### 2.3.5.7 Ligation

Die Ligation von Vektor und Inserts ist ein sehr empfindlicher Prozess; der Erfolg beruht maßgeblich auf der Wahl der eingesetzten DNA-Stoffmenge und auf dem richtigen Verhältnis dieser Mengen von Vektor zu Insert.

Um die DNA-Konzentration des geschnittenen Vektors bzw. Inserts zu bestimmen, wurde die verdaut und gefällte DNA in 30  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}^{(\text{C}17)}$  gelöst und 5  $\mu\text{L}$  dieser Lösung auf ein Agarosegel gegen 5  $\mu\text{L}$  der 1 kb Ladder<sup>(C1)</sup> aufgetragen und das Gel semiquantitativ ausgewertet. Dazu diente ein Vergleich der Intensität der verdauten DNA mit der 3 kb Bande der 1 kb DNA-Ladder<sup>(C1)</sup>, welche einer Konzentration von ca. 25 ng/ $\mu\text{L}$  entspricht.

Als Orientierung für die Ligation galt ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 femtomolarer Stoffmengen, beispielsweise 2 fmol Vektor und 6 fmol Insert. Zu entsprechenden Vektor- und Insert-Mengen wurden 2  $\mu\text{L}$  Ligase Puffer<sup>(E15)</sup> (10x) und 1  $\mu\text{L}$  T4-DNA-Ligase<sup>(E14)</sup> hinzugefügt, auf 20  $\mu\text{L}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}^{(\text{C}17)}$  aufgefüllt und über Nacht bei 14 °C inkubiert.

Entsprechend der Größe der Fragmente, ihrem Größenverhältnis zueinander, aber auch der Gesamtgröße des ligierten Plasmids kann der Erfolg der Ligation von kleinsten Variationen der eingesetzten Stoffmengen und deren Verhältnis abhängen, sodass pro Ligationsansatz beide Größen variiert wurden. Parallel dazu wurde je eine Negativkontrolle pro verwendeter Vektormenge hergestellt, die genau dieselbe Stoffmenge der Vektor-DNA der Ligationsansätze enthielt, jedoch ohne Insert-DNA. Hiermit konnte ein basales Level an Kolonien (durch den enthaltenen Anteil an nicht geschnittener DNA) von dem eigentlichen Ligationserfolg differenziert werden. Ein typischer Ligationsansatz gestaltete sich somit wie folgt:

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Ligation 1	Ligation 2	Ligation 3
Vektor	2 fmol	1 fmol	2 fmol	1 fmol	1 fmol
Insert	-	-	6 fmol	6 fmol	12 fmol
T4-DNA-Ligase-Puffer <sup>(E15)</sup>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
T4-DNA-Ligase <sup>(E14)</sup> (10x)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> <sup>(C17)</sup>	je auf 20 µL Endvolumen aufgefüllt				
Verhältnis			1:3	1:6	1:12
Eingesetzte DNA-Stoff- menge (gesamt)			8 fmol	7 fmol	13 fmol

**Tab. 5 Beispielhafter Ligationsansatz**

Konstrukt	Stoffmenge (fmol)		Stoffmengen- Verhältnis
	VEKTOR	INSERT	
<i>Epac1-camps-PDE4A1Ascl-Site</i>	3,73	9,31	≈ 1 : 2,5
<i>Epac1-camps-PDE2A3</i>	3,73	7,23	≈ 1 : 1,9
<i>Epac1-camps-SAH30-PDE2A3</i>	1,11	3,55	≈ 1 : 3,2
<i>Epac1-camps-PDE2katD</i>	3,73	8,24	≈ 1 : 2,2
<i>Epac1-camps-SAH30-PDE2katD</i>	3,44	16,48	≈ 1 : 4,8
<i>Epac1-camps-PDE8A1</i>	2,07	7,29	≈ 1 : 3,5
<i>Epac1-camps-SAH30-PDE8A1</i>	0,39	8,35	≈ 1 : 21,4
<i>Epac1-camps-PDE8katD</i>	3,73	8,57	≈ 1 : 2,3
<i>Epac1-camps-SAH30-PDE8katD</i>	3,43	17,14	≈ 1 : 5

**Tab. 6 Erfolgreiche Ligationsansätze aller in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte**

### 2.3.5.8 Transformation kompetenter *E. coli*

Die kompetenten *E. coli* wurden mittels KCM-Methode transformiert. Dazu wurden 100 µL kompetente *E. coli* XL1-Blue<sup>(B1)</sup> auf Eis aufgetaut. 1 µL der zu transformierenden DNA bzw. der komplette Ligationsansatz (20 µL) wurde zu 20 µL KCM (100 mM KCl<sup>(C21)</sup>, 30 mM CaCl<sub>2</sub><sup>(C8)</sup> und 50 mM MgCl<sub>2</sub><sup>(C23)</sup>) gegeben, auf 100 µL mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgefüllt und vorsichtig mit den 100 µL *E. coli*<sup>(B1)</sup> gemischt. Dieses Gemisch wurde 20 min auf Eis inkubiert, im Anschluss 10 min bei RT. 1 mL LB-Medium (bestehend aus 5 g/L NaCl<sup>(C26)</sup>, 10 g/L Yeast<sup>(C36)</sup>, 16 g/L Trypton<sup>(C35)</sup>,

autoklaviert) wurde hinzugegeben und 50 min bei 37 °C und 300 rpm im ThermoMixer®<sup>(G23)</sup> inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 5.000 rpm, RT) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µL LB-Medium resuspendiert und die komplette Menge im Fall einer Transfektion des Ligationsansatz auf selektive Agarplatten ausgestrichen. Handelte es sich um eine Retransformation präparierter DNA (c = 1 mg/mL), wurde nur ein Bruchteil (20 – 30 µL) der Suspension ausplattiert. Selektive Agarplatten filtern *E. coli* nach vorhandener Antibiotikaresistenz heraus. Das in allen Konstrukten enthaltene pcDNA3-Rückgrat besitzt eine Ampicillin-Resistenz, weshalb dieses Antibiotikum in den Platten verwendet wurde. Zur Herstellung der Platten wurde LB-Medium mit 12 g/L Agar<sup>(C2)</sup> autoklaviert und nach vorsichtigem Erwärmen in der Mikrowelle<sup>(G17)</sup> und Antibiotika-Zugabe in Petrischalen<sup>(M4)</sup> gegossen und auskühlen gelassen. Nach dem Ausstreichen wurden die Agar-Platten über Nacht bei 37 °C im mikrobiologischen Brutschrank<sup>(G15)</sup> inkubiert.

#### **2.3.5.9 Beurteilung des Ligationserfolgs**

Um den Ligationserfolg zu beurteilen, wurde von Agarplatten, die im Vergleich zur Kontrollplatte eine höhere Koloniedichte aufwiesen, mehrere Kolonien verwendet, um die DNA zu isolieren. Es wurden 5 mL selektives Medium (LB-Medium plus 100 µg/mL Ampicillin<sup>(C4)</sup>) mit je einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Climo-Shaker<sup>(G2)</sup> inkubiert. Aus den bewachsenen Flüssigkulturen wurde die DNA mithilfe der Mini-DNA-Präparation (s.u.) isoliert.

#### **2.3.5.10 Mini-DNA-Präparation**

Um zur Überprüfung des Ligationserfolgs die DNA der *E. coli*-Schüttelkulturen schnell in kleiner Menge zu präparieren, wurden nach Anleitung des Qiagen Midi Kits<sup>(E11)</sup> die dort verwendeten Puffer P1 - P3 (s. Tab. 7) hergestellt und folgendermaßen die DNA isoliert: 1,5 mL der über Nacht angesetzten Schüttelkultur wurde zentrifugiert (5 min, 5.000 rpm, RT), um die *E. coli* zu ernten. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in der im Mikroreaktionsgefäß<sup>(M7/8)</sup> zurück gebliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Dazu wurden zuerst 300 µL Puffer P1 (s.u.) und anschließend 300 µL Puffer P2 (s.u.) hinzugegeben und 2 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 300 µL Puffer P3 hinzugefügt und dieses zentrifugiert (15 min, 14.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß<sup>(M7/8)</sup> überführt und erneut zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm, 4 °C). 700 µL des Überstands wurden mit 500 µL

100 %igen Isopropanol<sup>(C20)</sup> versetzt, zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 600 µL 70 %igem Ethanol<sup>(C14)</sup> gewaschen, zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm, RT), daraufhin der Überstand erneut komplett verworfen und das Pellet für einige Minuten bei RT getrocknet. Abschließend wurde es in 30 µL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> resuspendiert.

<b>Puffer P1</b> (Resuspendierungspuffer)	<b>Puffer P2</b> (Lysepuffer)	<b>Puffer P3</b> (Neutralisierungspuffer)
50 mM Tris-HCl <sup>(C33, C18)</sup> , pH 8,0 10 mM EDTA <sup>(C11)</sup> 100 µg/mL RNase A <sup>(E12)</sup> Lagerung bei 4°C	200 mM NaOH <sup>(C27)</sup> 1 % SDS (w/v) <sup>(C31)</sup> Lagerung bei RT	3 M Kaliumacetat <sup>(C30)</sup> pH 5,5 Lagerung bei RT

**Tab. 7 Pufferzusammensetzung für Mini-DNA-Präparation** (Analog zu Puffer des QIAGEN Plasmid Midi Kit<sup>(E11)</sup>, siehe Hersteller Protokoll)

### 2.3.5.11 Kontroll-Restriktion

Zur Kontrolle wurde zu 2 µL dieser isolierten DNA, 0,5 µL der zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme und 2 µL des entsprechenden Restriktionspuffers (s.o.) hinzugegeben und auf 20 µL mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C im ThermoMixer®<sup>(G23)</sup> wurden die verdauten DNA-Präparationen auf ein 1 %iges Agarose-Gel gegeben und über die Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei erfolgreicher Klonierung sind Banden in entsprechender Größe von Vektor und Insert zu erwarten. Nach semiquantitativer Auswertung wurden die entsprechenden DNA-Präparationen, die diese Eigenschaft erfüllten, sequenziert (extern, Eurofins, Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg).

### 2.3.5.12 Re-Transformation

Im Falle einer übereinstimmenden Sequenz und somit erfolgreicher Klonierung eines Konstruktes, wurde ausgehend von der Mini-Präparation (s.o.) eine größere DNA-Menge präpariert. Es wurde analog des Protokolls „Transformation kompetenter *E. coli*“ die entsprechende DNA der Mini-Präparation transformiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 100 mL des selektiven LB-Ampicillin-Mediums wurde mit einer Kolonie von der bewachsenen Agar-Platte beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in dem Climo-Shaker<sup>(G2)</sup> inkubiert. Die DNA wurde mittels Qiagen Midi Kit<sup>(E11)</sup> anhand

des Hersteller-Protokolls extrahiert und mithilfe des Nanodrop®<sup>(G18)</sup> auf eine Konzentration von  $c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  eingestellt.

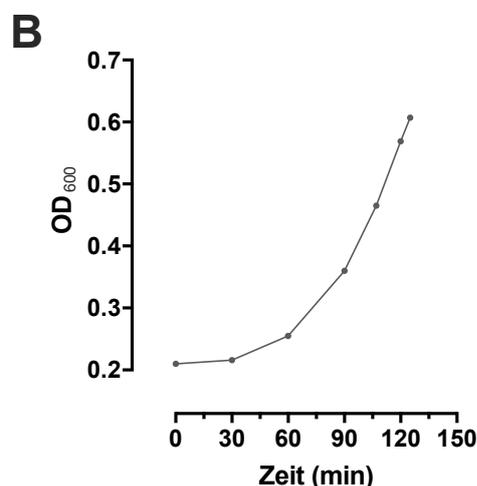
### 2.3.5.13 Herstellung kompetenter *E. coli*

Kompetenz beschreibt die Eigenschaft von Bakterien, fremde DNA aufzunehmen und zu exprimieren. Es gibt eine Handvoll Bakterien, die diese Eigenschaft von Natur aus besitzen, darunter *Neisseria gonorrhoe* oder *Haemophilus influenza*, welche ein Gen der sogenannten „com“-Genfamilien exprimieren, das diese Eigenschaften ermöglicht [143]. Dieses Gen fehlt jedoch dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*), weshalb die Kompetenz chemisch herbeigefügt werden muss.

Hierfür wurden initial *E. coli* XL1-blue<sup>(B1)</sup> auf LB-Platten (s.o.) ohne Antibiotika-Zusatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch Beimpfen von 50 mL LB-Medium mit einer einzelnen Kolonie dieser LB-Platte wurde die Vorkultur hergestellt, welche bei 37 °C und 180 rpm über Nacht im Climo-Shaker<sup>(G2)</sup> inkubiert wurde. 4,5 mL dieser Vorkultur wurde in 250 mL LB-Medium überführt, ebenfalls bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und die optische Dichte (OD, optic density) in regelmäßigen Intervallen per Spektrophotometer<sup>(G22)</sup> bei 600 nm gemessen, solange bis die OD<sub>600</sub> 0,5 - 0,6 betrug. Sofort wurden die *E. coli* abzentrifugiert (10 min, 3.500 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 25 mL TSB-Puffer (10 % PEG 3000<sup>(C28)</sup>, 5 % DMSO<sup>(C9)</sup>, 20 mM MgCl<sub>2</sub><sup>(C23)</sup> in LB-Medium, steril filtriert) resuspendiert. Aus dieser Stammlösung wurden Aliquote á 450  $\mu\text{L}$  hergestellt und auf Eis für mindestens 90 min inkubiert, welche daraufhin im flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert wurden.

**A**

Zeit (min)	OD <sub>600</sub>
0	0,210
30	0,216
60	0,255
60	0,360
107	0,465
120	0,569
125	0,607



**Abb. 12** *Spektrophotometrische Messung der optischen Dichte zur Herstellung kompetenter E. coli. A* Gemessene Werte der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. **B** Darstellung der Wachstumskurve aus den gemessenen Werten.

Zur Evaluation der Güte der kompetenten *E. coli* wurde pcDNA3<sup>(P1)</sup> verschiedener DNA-Mengen (1 pg, 5 pg, 10 pg) gegen eine Negativkontrolle transfiziert und anhand der Koloniedichte auf das Wachstumsverhalten geschlossen.

## 2.3.6 Software

### 2.3.6.1 Datenauswertung der FRET-Messungen

Die Auswertung der FRET-Messungen erfolgte durch Import der ermittelten Daten in Excel, wo zur Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus den aufgenommenen Spektren der höchste Wert zwischen 470 und 490 nm zur Ermittlung des Peaks der CFP-Intensität und der höchste Wert zwischen 515 und 535 nm zur Ermittlung des Peaks der YFP-Intensität bestimmt wurde und der Quotient aus CFP und YFP gebildet wurde:

$$\text{Ratio (CFP/FRET)} = \frac{\text{CFP}}{\text{YFP}} \quad (2)$$

Diese Daten dienen zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven in der GraphPad Prism 6.0 Software (GraphPad Software, San Diego, USA). Hierfür wurden sie mit einer drei-Parameter logarithmischen Funktion angepasst und normiert (unteres Plateau, kein cAMP = 0 %; oberes Plateau, cAMP-Sättigung = 100 %).

Die Daten der ratiometrischen Messungen wurden mittels Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) importiert und weiter in GraphPad Prism 6.0 analysiert. Alle dargestellten Kurven wurden exponentiell 2. Ordnung geglättet mit Mittelung von 4 benachbarten Werten.

### 2.3.6.2 Virtuelle Klonierung

Zur Planung der Klonierungen wurde PlasmaDNA [144] verwendet und jedes Konstrukt zuvor virtuell kloniert. Die Darstellung der in dieser Arbeit gezeigten Vektorkarten (Abb. 11) erfolgte mit SnapGene® Viewer 4.2.5 (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA).

### 2.3.6.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mithilfe der GraphPad Prism 6.0 Software (GraphPad Software, San Diego, USA). Gauss'sche Normalverteilung wurde in jeder Datenreihe mithilfe des D'Agostino-Pearson Test evaluiert, bevor Signifikanz ermittelt wurde. Wenn zwei verschiedene Populationen verglichen wurden, wurde ein Student's t-Test angewendet; wenn mehr als zwei Populationen verglichen wurden, wurde eine parametrische einfaktorische Varianzanalyse („one-way ANOVA“) mit Tukey Test verwendet, um multiple Vergleiche aufzustellen. Das Konfidenzintervall wurde bei allen Tests als 95% definiert. Signifikanz wurde wie folgt beurteilt:

Abkürzung	Signifikanzniveau
ns (nicht signifikant)	$P > 0,05$
*	$P \leq 0,05$
**	$P \leq 0,01$
***	$P \leq 0,001$
****	$P \leq 0,0001$

**Tab. 8 Legende der Signifikanzniveaus**

Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte sind angegeben in Mittelwert  $\pm$  SEM („standard error of the mean“, Standardfehler des Mittelwerts).

## 3 Ergebnisse

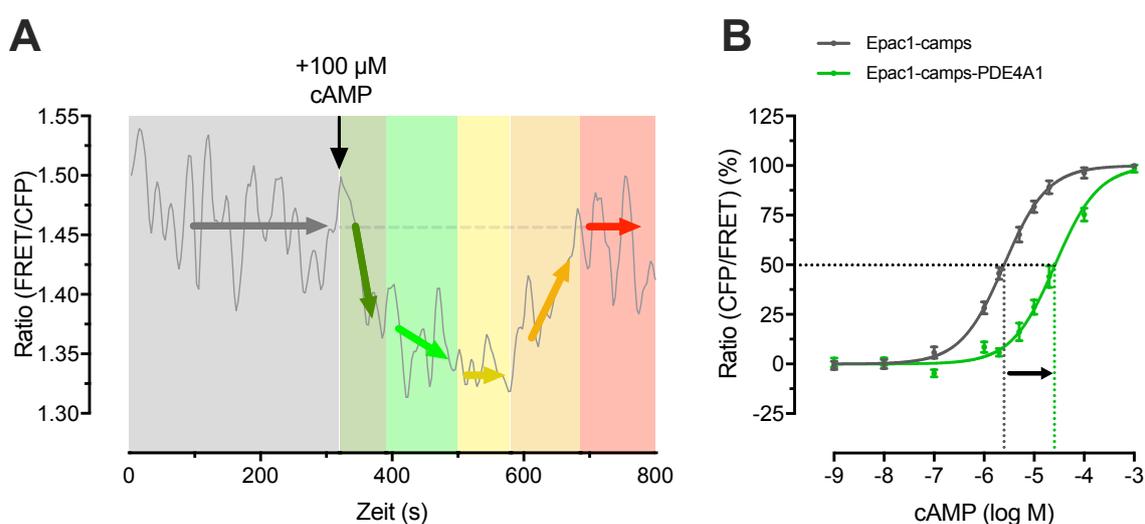
### 3.1 Grundlagen

Alle in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse stammen von spektrofluorometrischen *in vitro* Messungen der zytosolischen Fraktion transient transfizierter HEK-TsA-Zellen. Vereinfacht wird im Folgenden jedoch nur von dem gemessenen überexprimierten Konstrukt gesprochen.

#### 3.1.1 Transientes FRET-Signal und Affinitätsänderung bei Epac1-camps-PDE4A1

Für die PDE4A1 konnten Bock et al. (unveröffentlicht) bereits zeigen, dass nach Stimulation der PDE in direkter Fusion zu dem Sensor Epac1-camps mit cAMP (100  $\mu$ M) ein sogenanntes transientes FRET-Signal auftritt. Dieses ist charakterisiert durch einen schnellen Abfall der FRET-Ratio (FRET/CFP) (entspricht dem Quotient YFP/CFP) direkt nach Stimulation und einen nachfolgenden Anstieg auf nahezu basale Werte. Durch Bindung von cAMP kommt es zu einer Konformationsänderung des Sensors, wie unter 1.5.2. beschrieben, und zu einer folglich geringeren FRET-Ratio (Abb. 7) – der Sensor registriert cAMP. Da jedoch die Phosphodiesterase cAMP degradiert und es somit schafft, einen Raum niedriger cAMP-Konzentration zu erzeugen, erkennt der Sensor über die Zeit immer weniger cAMP, sodass die FRET-Ratio wieder auf basale Werte zurückgeht (Abb. 13A). Demnach entspricht die Dauer des transienten FRET-Signals der Dauer der cAMP-Hydrolyse durch die überexprimierte PDE. Außerdem ist das transiente FRET-Signal somit ein indirekter Nachweis von cAMP-Gradienten, da die hydrolytische Aktivität der Phosphodiesterase es schafft, dass der Sensor weniger cAMP als hinzugefügt registriert. Da jedoch dies allein noch nicht beweist, dass die verwendete Phosphodiesterase ursächlich für die cAMP-Hydrolyse ist, muss noch eine Kontrolle erfolgen. Hierfür wird die PDE durch einen Inhibitor in ihrer Funktion gehemmt und es wird derselbe Versuchsaufbau verwendet. Folgt auf die Inhibition kein Rückgang des Signals, ist bewiesen, dass dieser durch die hydrolytische Aktivität der PDE verursacht wird. Inhibition der PDE4 durch den unspezifischen Inhibitor IBMX (100  $\mu$ M) führt genau zu diesem Ausbleiben des FRET-Ratio-Anstiegs, wodurch dieser der Aktivität von Phosphodiesterasen zugeordnet werden kann. Eine spezifischere Aussage ist in diesem Fall nicht möglich, da IBMX fast alle PDEs unspezifisch inhibiert. Für eine exaktere Aussage wird ein spezifischer Inhibitor benötigt.

Der direkte Nachweis der cAMP-Gradienten stellt eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Fusionskonstrukts im Gegensatz zum Sensor dar, ebenfalls durch Bock et al. (unveröffentlicht) für Epac1-camps-PDE4A1 gezeigt. Diese Rechtsverschiebung ist eine Verlagerung des  $\log EC_{50}$ -Werts zu höheren cAMP-Konzentrationen. Es werden also höhere Konzentrationen an cAMP benötigt, um dieselbe Wirkung zu erzielen, da die fusionierte Phosphodiesterase eben dieses cAMP abbaut. Dieses entspricht einem apparenten Affinitätsverlust des Sensors zu cAMP, sprich dem Nachweis einer Domäne mit niedriger cAMP-Konzentration in direkter Umgebung des Sensors (Abb. 13B).



**Abb. 13 Grundlagen – transientes FRET-Signal und Affinitätsverschiebung bei Epac1-camps-PDE4A1.** **A** Transientes FRET-Signal von Epac1-camps-PDE4A1 (Abb. 14). Grau: Plateau des FRET-Signals. Dunkelgrün: Nach Stimulation mit 100  $\mu$ M cAMP schneller Abfall – der Sensor registriert cAMP. Hellgrün: Der Abfall wird flacher - der Sensor wird gesättigt. Gelb: Plateau – Sensor komplett gesättigt bzw. gleichzeitiger cAMP-Abbau, welcher noch nicht ausreichend für einen Anstieg der Kurve ist. Orange: Anstieg der Kurve – Hydrolyse von cAMP durch PDE4A1 überwiegt; je mehr cAMP abgebaut wird, desto weniger cAMP wird durch den Sensor registriert. Rot: Kurve im Plateau – System regeneriert; PDE4A1 hat so viel cAMP abgebaut, dass der Sensor wieder nahezu basale Level (gestrichelte Linie) anzeigt. **B** Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei der direkten Fusion von Sensor und PDE4A1 im Gegensatz zum Sensor allein. Um das System zur Hälfte zu sättigen (50 % Ratio), wird bei Epac1-camps  $10^{-5.6}$  M cAMP benötigt, bei Epac1-camps-PDE4A1 jedoch ca. 10x mehr ( $10^{-4.6}$  M cAMP).

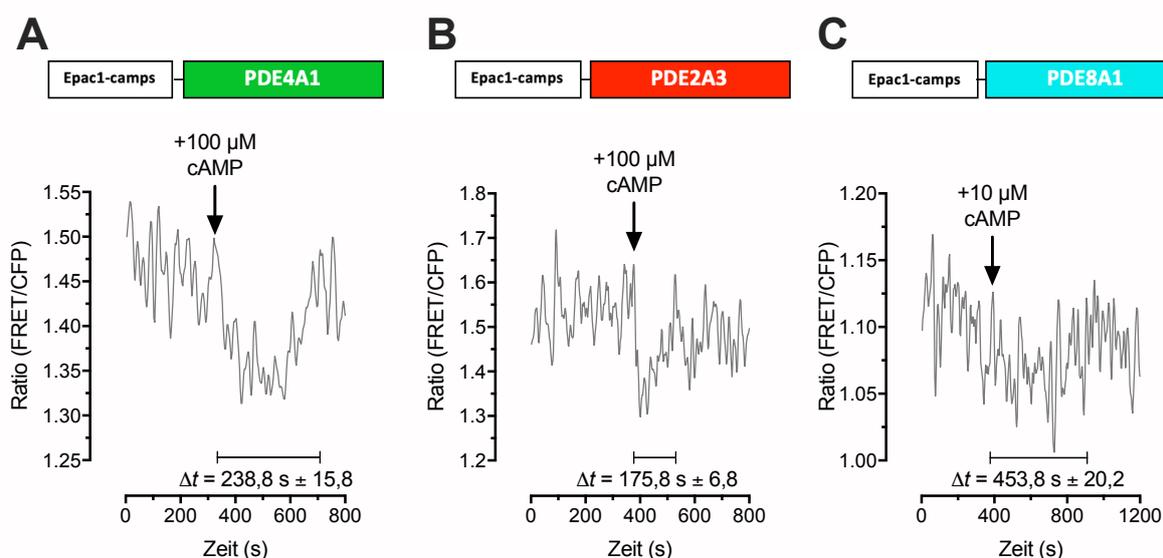
### 3.1.2 Charakterisierung des transienten FRET-Signals von Epac1-camps-PDE2A3/8A1

Jede präparierte zytosolische Fraktion wurde in ratiometrischen Messungen auf die Funktionsfähigkeit der überexprimierten Phosphodiesterase und des Sensors

getestet. Diese erhobenen Daten dienen der Charakterisierung des transienten FRET-Signals und somit der Geschwindigkeit der cAMP-Hydrolyse der entsprechenden Phosphodiesterasen.

*In vitro* zeigen PDE2A3 und PDE8A1 genau wie die PDE4A1 ein jeweils charakteristisches Verhalten in ratiometrischen Messungen. Auf Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  cAMP der direkten Fusion von PDE2A3 zu Epac1-camps zeigt sich ein transientes FRET-Signal von  $175,8 \text{ s} \pm 6,8$  Dauer. Morphologisch ähnelt das Signal dem von Epac1-camps-PDE4A1 mit Ausnahme der Dauer; es ist ebenfalls durch einen schnellen Abfall der FRET-Ratio und einem folgenden schnellen Anstieg gekennzeichnet. Ein klares Plateau, wie bei Epac1-camps-PDE4A1 zu finden, bildet sich jedoch nicht aus. Ebenfalls analog zu Epac1-camps-PDE4A1 lässt sich das Epac1-camps-PDE2A3 überexprimierende Zytosol wiederholt mit 100  $\mu\text{M}$  cAMP stimulieren ohne Veränderung des transienten FRET-Signals (s. Anhang, Abb. 31). Das System ist somit nach cAMP-Hydrolyse wieder regeneriert.

Im Kontrast dazu steht das transiente FRET-Signal der PDE8A1. Unter Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  cAMP ist das System gesättigt, nach anfänglichem Abfall der FRET-Ratio ergibt sich keine weitere Änderung. Bei Stimulation jedoch mit nur einem Zehntel der cAMP-Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) kann ein ähnlich konfiguriertes, wenn auch viel langsamer abfallendes und ansteigendes transientes FRET-Signal detektiert werden, mit einer konstanten Dauer von  $453,8 \text{ s} \pm 20,2$ . Auch hier wird nach Stimulation nahezu die basale FRET-Ratio erreicht, womit das System regeneriert ist und mehrfache Stimulation ermöglicht (s. Anhang, Abb. 32)



**Abb. 14** Vergleich der Dauer des transienten FRET-Signals von PDE4A1, PDE2A3, PDE8A1. **A** Nach Stimulation von Epac1-camps-PDE4A1 mit 100  $\mu\text{M}$  cAMP zeigt sich ein schneller Abfall der FRET-Ratio (FRET/CFP), gefolgt von einer Plateauphase und einem schnellen Anstieg auf nahezu basale Werte. Dauer des Signals: 238,8 s  $\pm$  15,8 ( $n = 17$ ) **B** Transientes FRET-Signal nach Stimulation von Epac1-camps-PDE2A3. Ebenfalls schneller Abfall und Anstieg der Ratio nach Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  cAMP; Plateauphase fehlt. Deutlich kürzeres Signal von 175,8 s  $\pm$  6,8 ( $n = 19$ ). **C** Stimulation von Epac1-camps-PDE8A1 mit 10  $\mu\text{M}$  cAMP ergibt bereits ein deutlich verlängertes transientes FRET-Signal von 453,8 s  $\pm$  20,2 ( $n = 30$ ), welches durch einen langsamen Abfall und ebenfalls langsamen Anstieg der Ratio gekennzeichnet ist.

Mathematisch lässt sich in wenigen Schritten abschätzen, ob diese transienten FRET-Signale Änderungen der globalen oder der lokalen cAMP-Level ausdrücken. In der folgenden Berechnung wird mit der Hypothese gearbeitet, dass das zur Stimulation hinzugegebene cAMP durch die überexprimierte PDE komplett abgebaut wird, da in der Messung nach der transienten FRET-Änderung wieder das basale Ratio erreicht wird (Abb. 13-14). Die Berechnung wird mit der PDE4A1 durchgeführt, da für diese in der Literatur die zuverlässigsten kinetischen Parameter beschrieben sind, die als Vergleichswert dienen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Menge an aufgereinigtem Epac1-camps bestimmt, die benötigt wird, um in dem Reaktionsvolumen von 600  $\mu\text{L}$  eine YFP-Intensität von 400 a.u. zu erreichen. Da diese YFP-Intensität Maß für das Expressionslevel des überexprimierten Konstrukt ist und da jede Messung mit diesem gleichen Expressionslevel durchgeführt wurde, kann die ermittelte Stoffmenge  $n$  für Epac1-camps mit der Stoffmenge des entsprechenden Fusionskonstrukts gleichgesetzt werden.

Aus

$$n = \frac{m}{M} \quad (3)$$

mit der experimentell ermittelten Masse  $m = 2,56 \times 10^{-6} \text{ g}$  von Epac1-camps und dessen molarer Masse  $M = 70 \text{ kDa} = 7 \times 10^4 \text{ g/mol}$  ergibt sich für die Stoffmenge von Epac1-camps:

$$n = \frac{2,56 \times 10^{-6} \text{ g}}{7 \times 10^4 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 3,7 \times 10^{-11} \text{ mol}$$

Aus der hinzugefügten Konzentration von cAMP und der Dauer des transienten FRET-Signals kann man eine angenäherte hierfür benötigte Umsatzgeschwindigkeit  $v$  der PDE berechnen (unter der sehr vereinfachten Annahme einer linearen Kinetik).

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} \quad (4)$$

Bei einer Stimulation mit cAMP der Konzentration  $\Delta c = 100 \mu\text{M} = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  und einer Dauer des transienten FRET-Signals der PDE4A1 von  $\Delta t = 238,8 \text{ s}$  (Abb. 14) ergibt sich für diese PDE folgende Parameter:

$$v(\text{PDE4A1}) = \frac{1 \times 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}}}{238,8 \text{ s}} = 4,2 \times 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{L} \times \text{s}}$$

Um hieraus die Wechselzahl  $k_{cat}$  zu bestimmen, benötigt man die Enzymkonzentration  $[E]$ .

$$c(\text{Enzym}) = [E] = \frac{n}{V} \quad (5)$$

In dem Reaktionsvolumen von  $V = 600 \mu\text{L} = 6 \times 10^{-4} \text{ L}$ , ergibt sich für Epac1-camps-PDE4A1 eine Enzymkonzentration  $[E]$  von

$$[E] = \frac{3,7 \times 10^{-11} \text{ mol}}{6 \times 10^{-4} \text{ L}} = 6,2 \times 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Die Wechselzahl berechnet sich aus der maximalen Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  und der Enzymkonzentration zum Zeitpunkt 0 der Reaktion  $[E]_0$ .

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0} \quad (6)$$

In diesem Fall wird zur Abschätzung die vereinfachte Umsatzgeschwindigkeit  $v$  anstatt  $V_{max}$  verwendet und die zuvor berechnete Enzymkonzentration  $[E]$ . Hieraus ergibt sich

$$k_{cat} = \frac{4,2 \times 10^{-7} \frac{mol}{L \times s}}{6,2 \times 10^{-8} \frac{mol}{L}} = 6,8 s^{-1}$$

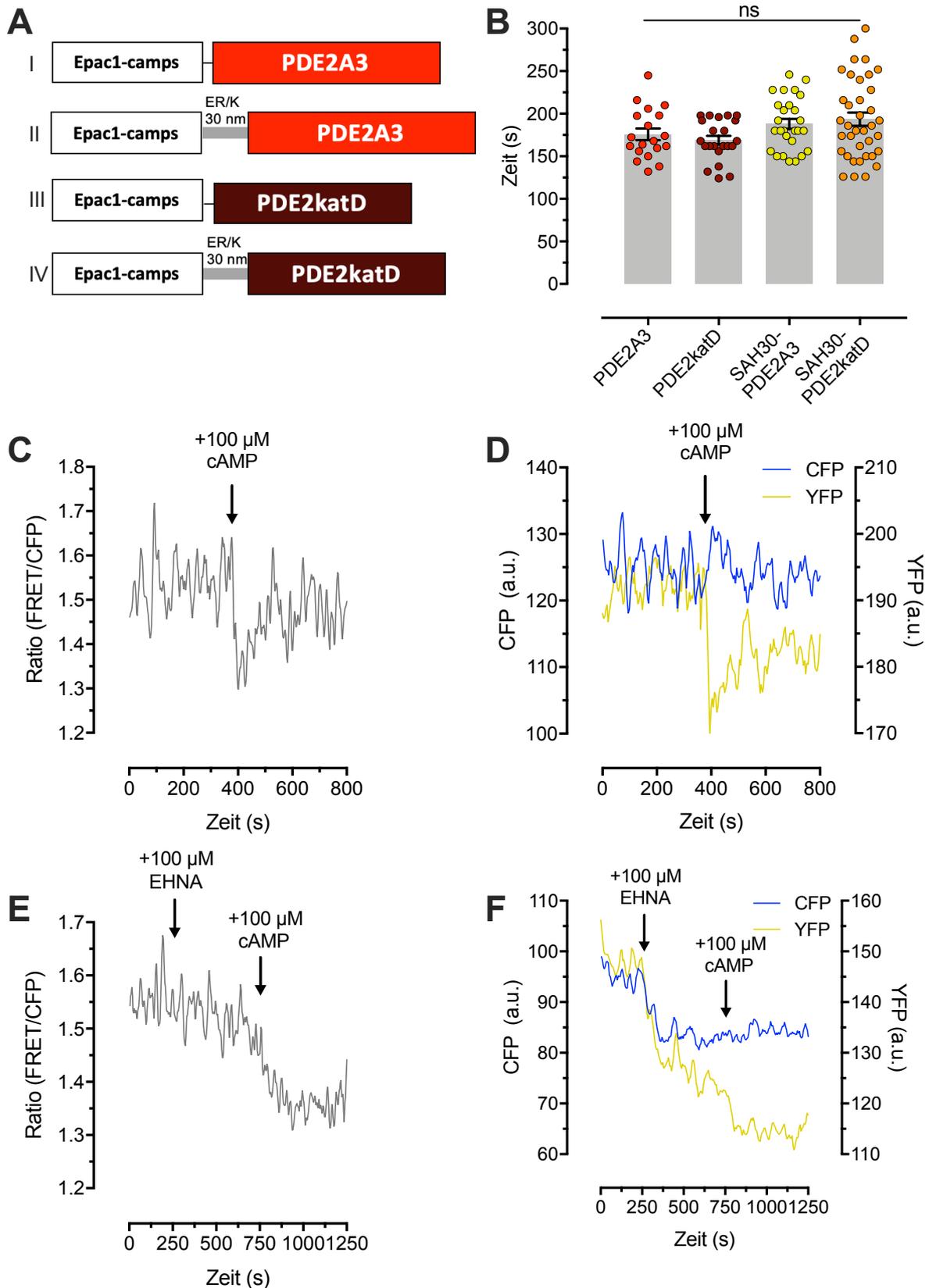
In der Literatur ist für die PDE4A eine  $k_{cat}$  von  $6,7 s^{-1}$  [145] beschrieben, was in dem gleichen Bereich liegt, wie der hier ermittelte Wert. Diese stark vereinfachte Betrachtung legt demnach nahe, dass die PDE in dem ratiometrischen Versuchsaufbau das gesamte hinzugegebene cAMP hydrolysiert, wie der Rückgang auf basale Werte vermuten lässt. Somit spiegelt das transiente FRET-Signal die Hydrolyse der globalen cAMP-Level und nicht der lokalen cAMP-Level in den cAMP-Domänen wider.

## 3.2 Charakterisierung der Phosphodiesterase 2A3

### 3.2.1 Ratiometrisches Verhalten der PDE2A3 *in vitro*

Ausgehend von den ersten ratiometrischen Daten von Epac1-camps-PDE2A3 wurden zur breiteren Charakterisierung weitere Konstrukte kloniert und analysiert (Abb. 15A). Durch Verwendung der katalytischen Domäne wurde der Einfluss regulatorischer Untereinheiten exkludiert, durch Verwendung des ER/K 30 nm Linkers wurden die cAMP-Level in einem 30 nm Radius um die PDE analysiert.

Die Dauer des transienten FRET-Signals unterscheidet sich bei allen vier Konstrukten nicht signifikant, unabhängig von Linker und regulatorischen Untereinheiten. Auch die Morphologie ist unverändert (Abb. 15C-D: Epac1-camps-PDE2A3; für weitere Konstrukte s. Anhang, Abb. 31).



**Abb. 15 Ratiometrische Charakterisierung von PDE2A3.** **A** Schema der verwendeten Konstrukte: (I) direkte Fusion von Epac1-camps mit PDE2A3 (Epac1-camps-PDE2A3), (II) Trennung von Epac1-camps und PDE2A3 durch 30 nm ER/K-Linker (Epac1-camps-SAH30-PDE2A3), (III) direkte Fusion von Epac1-camps mit der katalytischen Domäne der PDE2 (AS 578-941) (Epac1-camps-PDE2katD) (IV) Trennung von Epac1-camps

und der katalytischen Domäne der PDE2 durch 30 nm ER/K-Linker (Epac1-camps-SAH30-PDE2katD). **B** Einfaktorielle Varianzanalyse der Dauer des transienten FRET-Signals von (I) Epac1-camps-PDE2A3 ( $175,8 \text{ s} \pm 6,8$ ,  $n = 19$ ) (II) Epac1-camps-PDE2katD ( $168,9 \text{ s} \pm 5,1$ ,  $n = 22$ ) (III) Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 ( $188,0 \text{ s} \pm 5,9$ ,  $n = 27$ ) (IV) Epac1-camps-SAH30-PDE2katD ( $193,5 \text{ s} \pm 7,8$ ,  $n = 37$ ). Keine signifikanten Unterschiede. **C** Ratiometrische Messung von Epac1-camps-PDE2A3 unter Stimulation mit  $100 \mu\text{M}$  cAMP, Darstellung des transienten FRET-Signals. **D** Darstellung des CFP- und YFP-Kanals der Messung in C. Nach Stimulation mit  $100 \mu\text{M}$  cAMP zeigt sich ein Anstieg im CFP-Kanal und ein Abfall im YFP-Kanal. **E** Ratiometrische Messung von Epac1-camps-PDE2A3. Nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  EHNA zeigt sich ein Abfall in der FRET-Ratio mit Plateaubildung für  $> 400 \text{ s}$ . **F** Darstellung des CFP- und YFP-Kanals der Messung in E.

### 3.2.2 Reproduzierbarkeit des transienten FRET-Signals

Bei allen Konstrukten der PDE2A3 ließ sich das charakteristische transiente FRET-Signal im gleichen System mehrmals reproduzieren. Die Signallänge nach wiederholter Stimulation blieb unverändert (s. Anhang, Abb. 31).

### 3.2.3 Inhibition der PDE2A3 durch EHNA

Mittels Einsatzes des spezifischen Inhibitors der PDE2A3 konnte das transiente FRET-Signal eindeutig auf die PDE2A3 zurückgeführt werden und ein etwaiges Artefakt oder Einfluss weiterer in der zytosolischen Fraktion vorhandener Phosphodiesterasen auf die transiente FRET-Änderung ausgeschlossen werden.

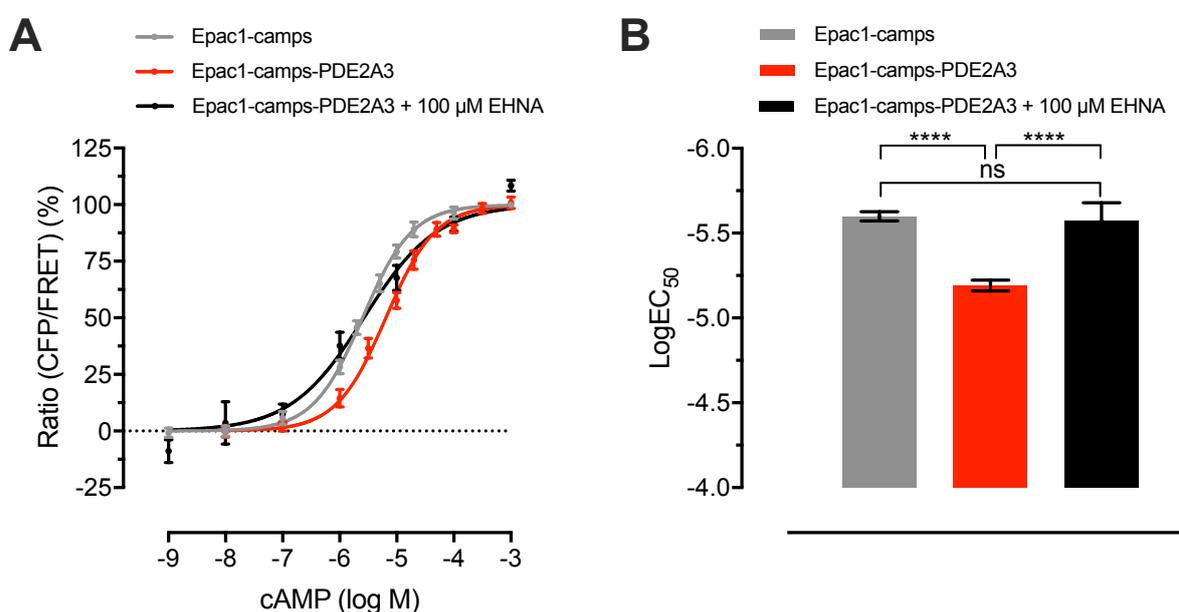
Dafür wurde die entsprechende zytosolische Fraktion 5 min mit  $100 \mu\text{M}$  EHNA inkubiert und daraufhin mit  $100 \mu\text{M}$  cAMP stimuliert. Nach cAMP-Stimulation zeigt sich nach einem schnellen Abfall der Ratio ein deutliches  $> 400 \text{ s}$  andauerndes Plateau (Abb. 15E). Auch in den zugrundeliegenden CFP- und YFP-Kanälen findet sich kein Rückgang der einzelnen Signale (Abb. 15F) (weitere Konstrukte s. Anhang, Abb. 34). Selbiges ließ sich nach vorheriger Stimulation mit  $100 \mu\text{M}$  cAMP zur Feststellung der Funktionsfähigkeit des Konstrukts reproduzieren (s. Anhang, Abb. 33).

### 3.2.4 Konzentrations-Wirkungs-Kurven der PDE2A3

Analog zu Epac1-camps-PDE4A1 wurden mittels Stimulation der PDE2-basierten Konstrukte (Abb. 15A) Spektren nach Stimulation mit aufsteigenden cAMP-Konzentrationen aufgenommen, KWK erstellt und der jeweilige  $\text{EC}_{50}$ -Wert ermittelt. Trotz der signifikant schnelleren Hydrolyse von cAMP in den ratiometrischen Messungen zuvor, zeigt Epac1-camps-PDE2A3 nur eine leichte Rechtsverschiebung

der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (s. Abb. 16A). Dennoch handelt es sich um einen signifikanten ( $P < 0,0001$ ) Affinitätsverlust zu cAMP im Vergleich zu Epac1-camps. Dieser ( $\text{LogEC}_{50} = -5,19 \pm 0,03$ ) fällt jedoch deutlich geringer aus als der von Epac1-camps-PDE4A1 ( $\text{LogEC}_{50} = -4,58 \pm 0,04$ ).

Nach Inhibition mit  $100 \mu\text{M}$  EHNA (Inkubationszeit 30 min) zeigt sich eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve auf basale, mit Epac1-camps übereinstimmende Werte; für die Rechtsverschiebung ist dementsprechend allein die Funktion der PDE2A3 ursächlich, der Sensor bleibt in der Funktion unverändert (Abb. 16B).



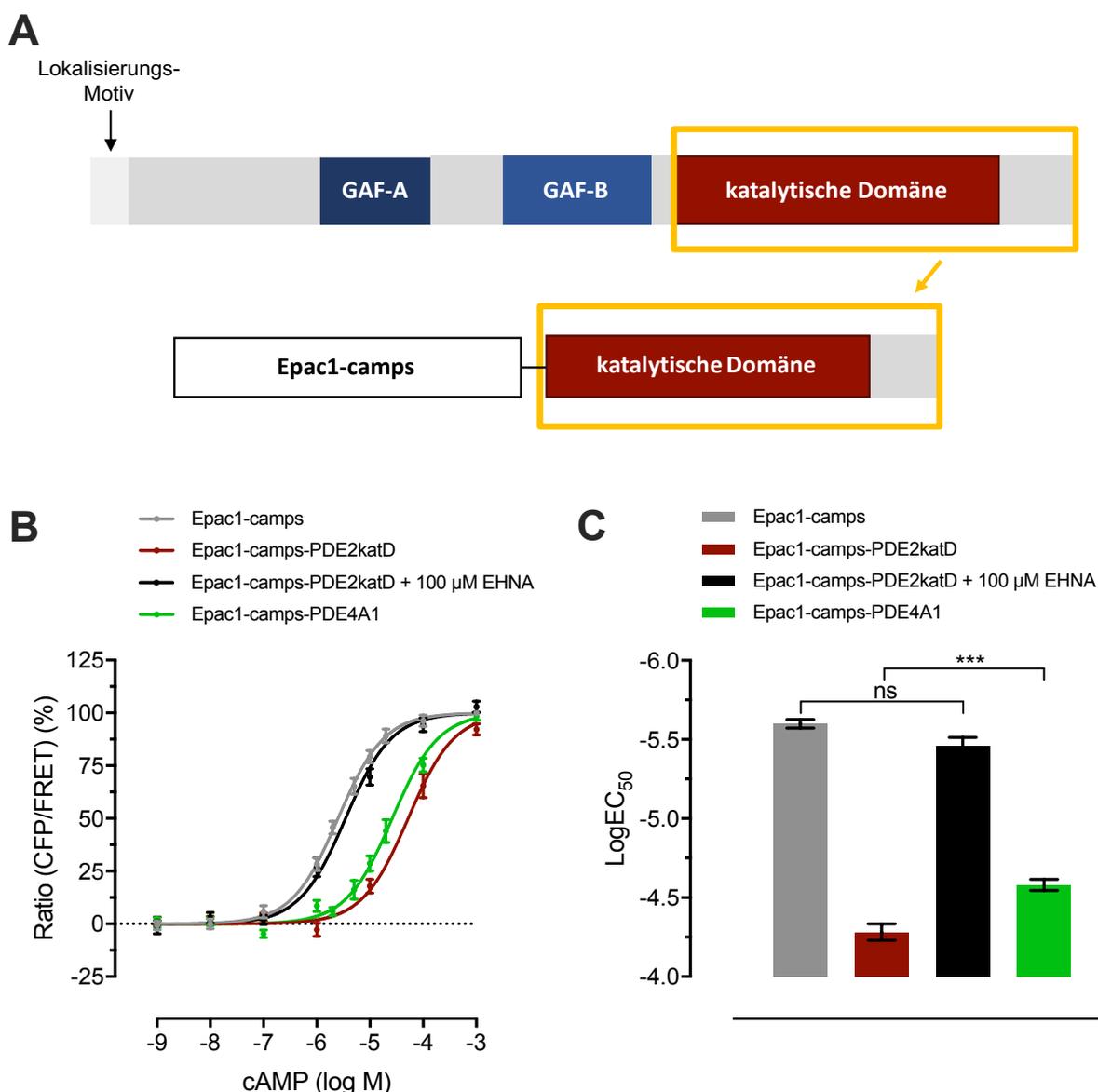
**Abb. 16 Geringer Affinitätsverlust von Epac1-camps-PDE2A3 zu cAMP.** **A** Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Epac1-camps-PDE2A3 (rot,  $n = 14$ ) zu Epac1-camps (grau,  $n = 11$ ). Einfluss der Inhibition mit  $100 \mu\text{M}$  EHNA auf Epac1-camps-PDE2A3 (schwarz,  $n = 8$ ), Inkubationszeit 30 min. **B** Einfaktorielle Varianzanalyse von A.  $\text{LogEC}_{50}$  von Epac1-camps und Epac1-camps-PDE2A3 +  $100 \mu\text{M}$  EHNA nicht signifikant verschieden ( $P = 0,9545$ ). Epac1-camps-PDE2A3 unterscheidet sich signifikant von Epac1-camps und Epac1-camps-PDE2A3 +  $100 \mu\text{M}$  EHNA ( $P < 0,0001$ ).

### 3.2.5 Einfluss der regulatorischen Untereinheiten der PDE2A3

Da aufgrund der schnellen Hydrolyse von cAMP durch die PDE2A3 eine stärkere Gradienten-Bildung erwartet wurde, wurden im nächsten Schritt die regulatorischen Bereiche (GAF-A- und GAF-B-Domäne, Abb. 17A) der PDE2A3 ausgeschaltet, indem die direkte Fusion aus der katalytischen Domäne (PDE2katD) und Sensor betrachtet wurde. Hiermit wurden eventuelle hemmende regulatorische Einflüsse, beispielsweise

eine geschlossene Konformation durch zu geringe cGMP-Level (Abb. 5) oder Ähnliches, als Ursache ausgeschlossen.

Wie zuvor von der PDE2A3 erwartet, zeigt Epac1-camps-PDE2katD eine deutliche Rechtsverschiebung der KWK, welche sogar signifikant größer ist als die von Epac1-camps-PDE4A1 ( $P = 0,0003$ ). Ebenfalls lässt sie sich mittels Inhibition durch EHNA komplett aufheben (Abb. 17B-C), wodurch auch hier die katalytische Domäne als ursächlich bestätigt wird. Demnach hat die katalytische Domäne ohne jedweden regulatorischen Einfluss die Fähigkeit, stärkere cAMP-Gradienten auszubilden, als die PDE4A1.



**Abb. 17 Vergleich katalytische Domäne der PDE2 mit der gesamten PDE2A3. A** Oben: Schemazeichnung der PDE2A3 mit N-terminalem Lokalisierungsmotiv, den beiden regulatorischen Domänen GAF-A und GAF-B und C-terminaler katalytischer Domäne (nicht maßstabsgetreu). Unten: Klonierung der katalytischen Domäne (AS 578-941) in direkter Fusion an den Epac1-camps-Sensor; hiermit Ausschalten des Einflusses

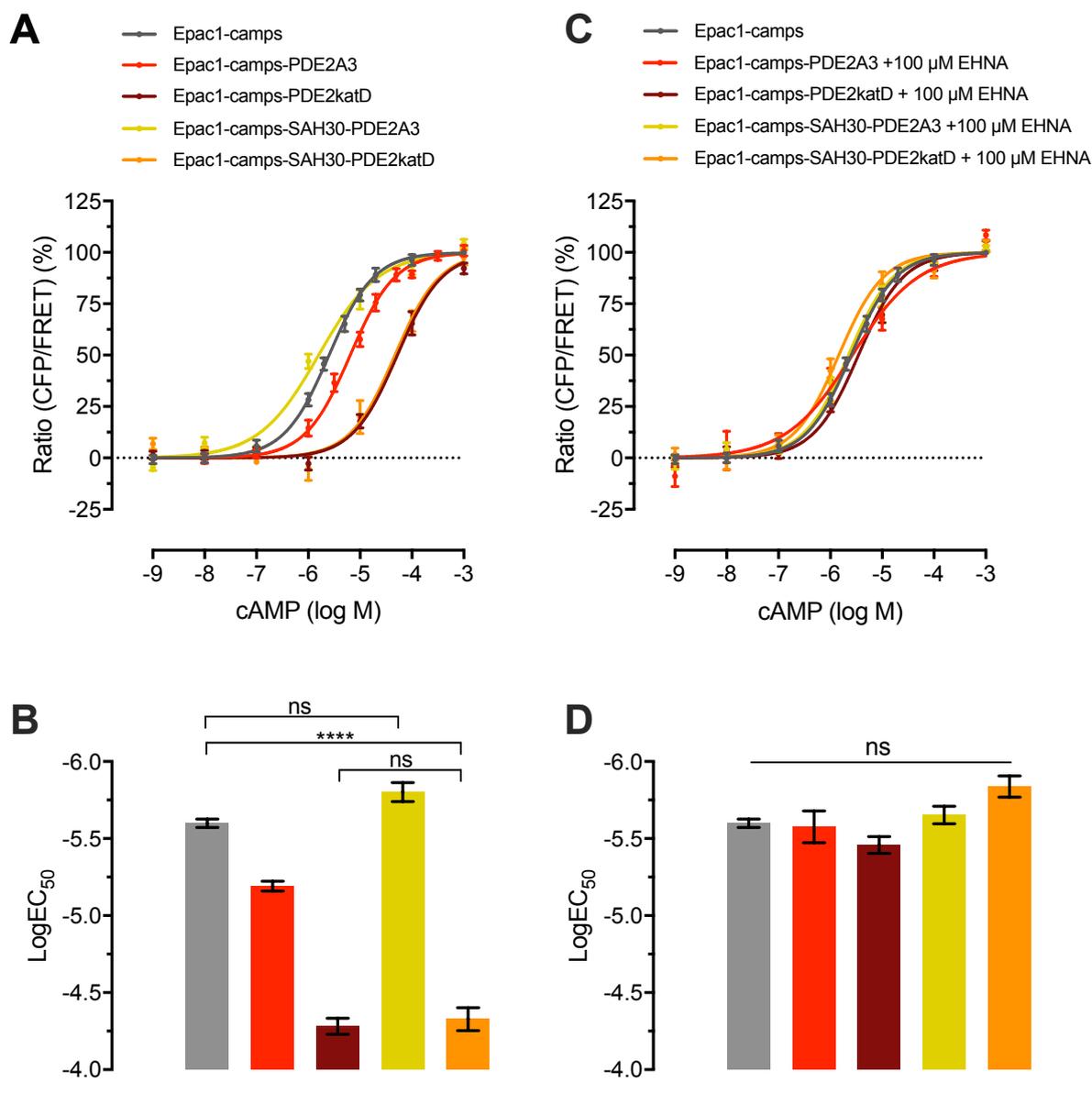
der regulatorischen Untereinheiten. **B** Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven: deutliche Rechtsverschiebung der Kurve von Epac1-camps-PDE2katD (dunkelrot,  $n = 13$ ) in Bezug auf Epac1-camps (grau,  $n = 11$ ). Aufhebung dieses Effekts bei Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  EHNA für 30 min (schwarz, Epac1-camps-PDE2katD +  $100 \mu\text{M}$  EHNA,  $n = 12$ ). **C** Einfaktorielle Varianzanalyse von B.  $\text{LogEC}_{50}$  von Epac1-camps und Epac1-camps-PDE2katD +  $100 \mu\text{M}$  EHNA nicht signifikant verschieden ( $P = 0,1442$ ).  $\text{LogEC}_{50}$  von Epac1-camps-PDE2katD und Epac1-camps-PDE4A1 signifikant verschieden ( $P = 0,0003$ ).

### 3.2.6 Einfluss des 30 nm ER/K-Linkers auf Konzentrations-Wirkungs-Kurven der PDE2A3

Um die Größe der cAMP-Gradienten, die sowohl bei der PDE2A3 als auch der katalytischen Domäne durch die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven ausgedrückt sind, direkt auszumessen, wurden Epac1-camps von der Phosphodiesterase bzw. ihrer katalytischen Domäne durch einen fest definierten (hier 30 nm) Abstand getrennt mit Hilfe des ER/K 30 nm Linkers (Abb. 9) und KWKs für diese Konstrukte analog zur direkten Fusion erstellt.

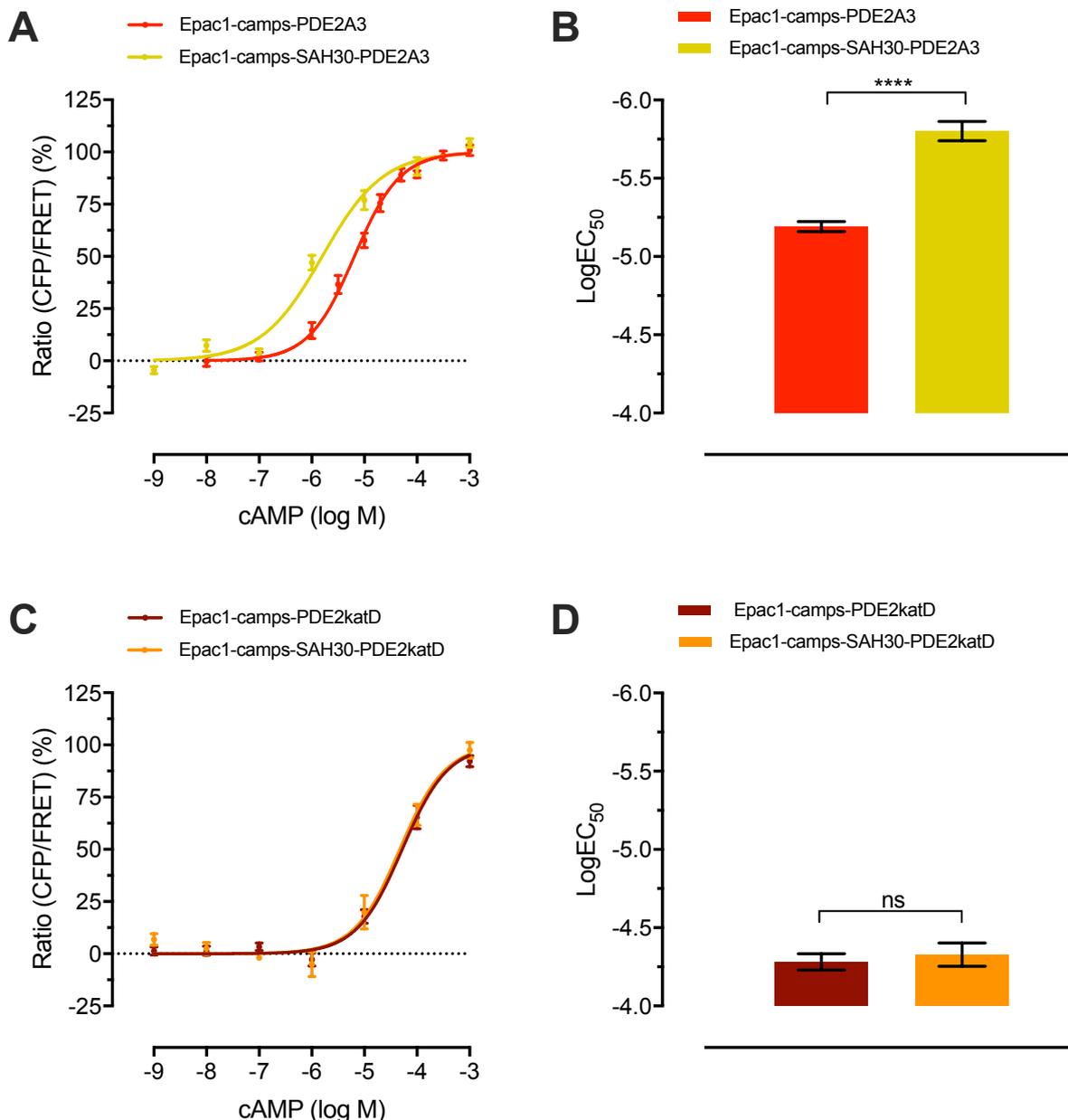
Epac1-camps-SAH30-PDE2katD zeigt eine annähernd deckungsgleiche Kurve im Vergleich zur direkten Fusion (Epac1-camps-PDE2katD). Das gilt jedoch nicht für denselben Versuchsaufbau mit der PDE2A3. Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 zeigt eine signifikante Linksverschiebung im Vergleich zu Epac1-camps-PDE2A3, die nicht signifikant verschieden von Epac1-camps ist (Abb. 18).

Unter Inhibition mit  $100 \mu\text{M}$  EHNA (30 min) verhalten sich jedoch alle Konstrukte ähnlich, alle sind nicht signifikant verschieden zu dem Sensor Epac1-camps. Jegliche Position der KWK ist somit auf die Funktion der PDE zurückzuführen, der Sensor wird bei keinem Konstrukt in seiner Funktion verändert.



**Abb. 18 Einfluss des 30 nm ER/K-Linkers auf Konstrukte der PDE2. A** Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Deutliche Rechtsverschiebung der Kurve bei Epac1-camps-SAH30-PDE2katD (orange,  $n = 10$ ) im Vergleich zu Epac1-camps (grau,  $n = 11$ ), ähnlich der bekannten Verschiebung von Epac1-camps-PDE2katD (dunkelrot,  $n = 13$ ). Dahingegen minimale Verschiebung der KWK bei Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 (gelb,  $n = 19$ ). Bekannte geringe Rechtsverschiebung bei Epac1-camps-PDE2A3 (rot,  $n = 14$ ). **B** Einfaktorielle Varianzanalyse von A. Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 nicht signifikant verschieden von Epac1-camps ( $P = 0,0697$ ). Dahingegen signifikante Rechtsverschiebung von Epac1-camps-PDE2katD und Epac1-camps-SAH30-PDE2katD. Legende siehe A. **C** Vergleich KWK. KWK der mit 100  $\mu\text{M}$  EHNA (30 min) inhibierten Konstrukte nahezu deckungsgleich (Epac1-camps, grau,  $n = 11$ ; Epac1-camps-PDE2A3 + 100  $\mu\text{M}$  EHNA,  $n = 8$ ; Epac1-camps-PDE2katD + 100  $\mu\text{M}$  EHNA,  $n = 12$ ; Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 + 100  $\mu\text{M}$  EHNA,  $n = 10$ ; Epac1-camps-SAH30-PDE2katD + 100  $\mu\text{M}$  EHNA,  $n = 11$ ). **D** Einfaktorielle Varianzanalyse von C. Alle inhibierten Konstrukte sind nicht signifikant verschieden von Epac1-camps. Legende siehe C.

In Abb. 19 sind die Zusammenhänge zwischen der PDE2A3 in direkter Fusion und mit Linker und selbiges für die katalytische Domäne noch einmal übersichtlich dargestellt, um die jeweiligen Verschiebungen der Kurven besser zu differenzieren.



**Abb. 19 Einfluss des Linkers – Vergleich PDE2A3 mit PDE2katD.** **A** Vergleich der direkten Fusion von PDE2A3 und Epac1-camps vs. Trennung dieser mit 30 nm ER/K-Linker; deutliche Rechtsverschiebung bei der direkten Fusion. **B** Statistische Auswertung von A, Student's t-Test. Epac1-camps-PDE2A3 und Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 sind signifikant verschieden ( $P < 0,0001$ ). **C** Vergleich der direkten Fusion von PDE2katD und Epac1-camps mit Trennung dieser durch den 30 nm ER/K-Linker; Kurven sind nahezu deckungsgleich. **D** Statistische Auswertung von C, Student's t-Test. Beide Kurven sind nicht signifikant verschieden ( $P = 0,6125$ ). Daten aus Abb. 18.

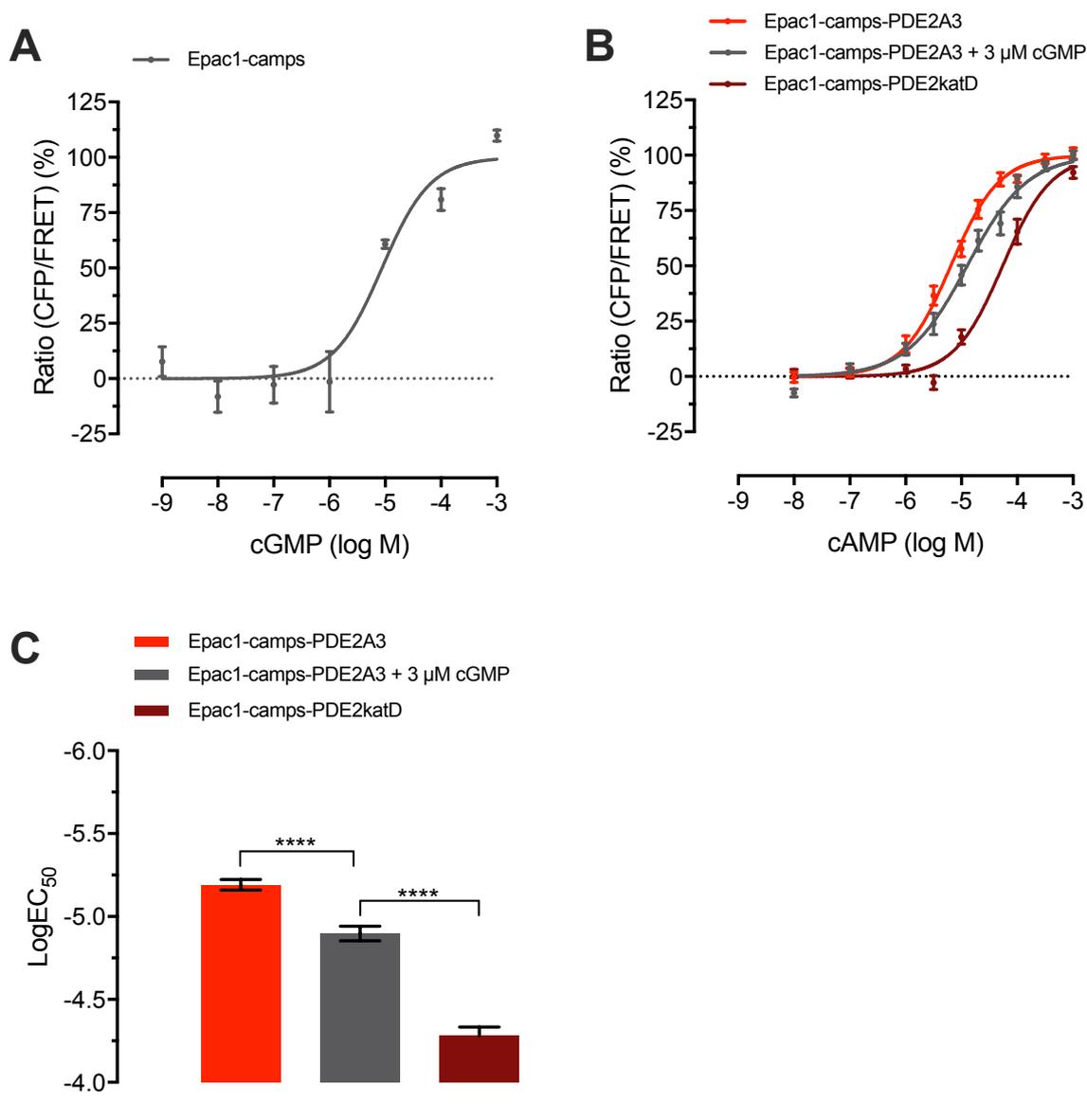
	LogEC <sub>50</sub>	n	LogEC <sub>50</sub> (+100 μM EHNA)	n
<i>Epac1-camps</i>	-5,99 ± 0,03	11	-	-
<i>Epac1-camps-PDE4A1</i>	-4,58 ± 0,04	9	-	-
<i>Epac1-camps-PDE2A3</i>	-5,19 ± 0,03	14	-5,58 ± 0.10	8
<i>Epac1-camps-PDE2katD</i>	-4,28 ± 0,05	13	-5,46 ± 0,06	12
<i>Epac1-camps-SAH30-PDE2A3</i>	-5,80 ± 0,06	19	-5,65 ± 0,06	10
<i>Epac1-camps-SAH30-PDE2katD</i>	-4,33 ± 0,08	10	-5,84 ± 0,07	11

**Tab. 9** LogEC<sub>50</sub>-Werte der PDE2-basierten Konstrukte im Vergleich zu *Epac1-camps* und *Epac1-camps-PDE4A1*. Darstellung der Werte mit und ohne Inhibition mit 100 μM EHNA (30 min).

### 3.2.7 Einfluss von cGMP auf die hydrolytische Aktivität der PDE2A3

Die Phosphodiesterase 2 wird in der Literatur als cGMP-stimulierte cAMP-hydrolysierende Phosphodiesterase beschrieben [106, 107, 118, 146]. Um den Einfluss von cGMP auf die hydrolytische Aktivität der Phosphodiesterase 2 zu testen, wurde *Epac1-camps-PDE2A3* mit cGMP stimuliert. Dafür wurde zuerst *Epac1-camps* mit aufsteigenden Konzentrationen von cGMP stimuliert, Spektren aufgenommen und KWKs erstellt, um die Sensitivität des Sensors gegenüber cGMP zu bestimmen. Daraus wurde eine Konzentration von cGMP gewählt, die sowohl in der Literatur als ausreichend zur Stimulation beschrieben ist (niedriger mikromolarer Bereich, EC<sub>50</sub> = 1,4 μM ± 0,18 [116]) als auch gleichzeitig nicht zu einem falsch positiven FRET-Signal durch Interferenz mit *Epac1-camps* führt (Abb. 20). Auf Basis dieses Experiments wurde eine Konzentration von 3 μM cGMP gewählt und die zytosolische Fraktion von *Epac1-camps-PDE2A3* 10 min vor Aufnahme der Spektren hiermit inkubiert. Die Messung erfolgte in Analogie zur vorherigen Messung von *Epac1-camps-PDE2A3*.

Unter Stimulation mit 3 μM cGMP erkennt man eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu höheren Konzentrationen von cAMP im Vergleich zu der nicht stimulierten PDE2A3, welche jedoch nicht die Werte der katalytischen Domäne alleine erreicht. Nichtsdestotrotz sind die LogEC<sub>50</sub>-Werte signifikant verschieden (P < 0,0001) zu beiden Konstrukten, *Epac1-camps-PDE2A3* und *Epac1-camps-PDE2katD* (Abb. 20B-C).



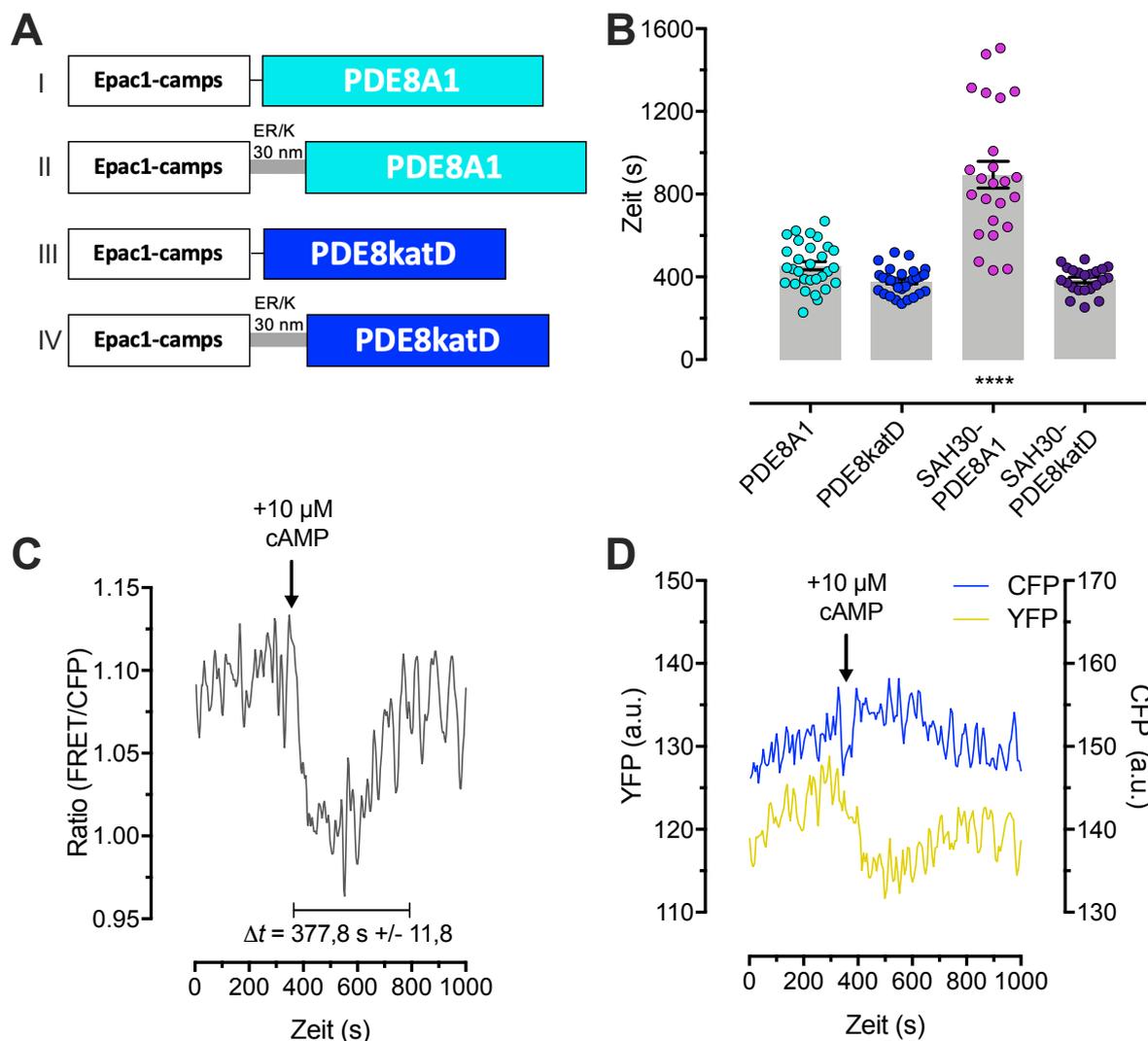
**Abb. 20 Einfluss von cGMP auf die katalytische Aktivität der PDE2A3.** **A** KWK von Epac1-camps unter Stimulation mit cGMP,  $\text{LogEC}_{50} = -5,06 \pm 0,12$ . ( $n = 15$ ) **B** Vergleich der KWK von Epac1-camps-PDE2A3 mit und ohne Stimulation mit  $3 \mu\text{M}$  cGMP (10 min); deutliche Rechtsverschiebung unter Stimulation, jedoch nicht auf Werte der katalytischen Domäne alleine. **C** Einfaktorielle Varianzanalyse von B. Alle drei Kurven sind signifikant verschieden.

### 3.3 Charakterisierung der Phosphodiesterase 8A1

#### 3.3.1 Ratiometrisches Verhalten der PDE8A1 *in vitro*

Analog zur PDE2A3 wurde auch die PDE8A1 primär ratiometrisch betrachtet und im weiteren Verlauf der Einfluss regulatorischer Untereinheiten durch Verwendung der katalytischen Domäne exkludiert und der Einfluss eines definierten Abstands zur PDE durch Verwendung des ER/K 30 nm Linkers analysiert (s. Abb. 21A).

In ratiometrischen Messungen findet sich bei Epac1-camps-PDE8A1, Epac1-camps-PDE8katD und Epac1-camps-SAH30-PDE8katD eine nicht signifikant unterschiedliche Dauer des transienten FRET-Signals (s. Abb. 21B). Dagegen weist unter gleichen Bedingungen Epac1-camps-SAH30-PDE8A1 eine normalverteilte, jedoch viel größere Spanne dieser Signaldauer ( $894,0 \text{ s} \pm 64,5$ ) auf, welche signifikant unterschiedlich zu den drei oben genannten Konstrukten ist ( $P < 0,0001$ ).



**Abb. 21 Ratiometrische Charakterisierung von PDE8A1.** **A** Schema der verwendeten Konstrukte: (I) direkte Fusion von Epac1-camps mit PDE8A1 (Epac1-camps-PDE8A1), (II) Trennung von Epac1-camps und PDE8A1 durch 30 nm ER/K-Linker (Epac1-camps-SAH30-PDE8A1), (III) direkte Fusion von Epac1-camps mit der katalytischen Domäne der PDE8 (AS 480-829) (Epac1-camps-PDE8katD) (IV) Trennung von Epac1-camps und der katalytischen Domäne der PDE8 durch 30 nm ER/K-Linker (Epac1-camps-SAH30-PDE8katD). **B** Einfaktorielle Varianzanalyse der Dauer des transienten FRET-Signals von (I) Epac1-camps-PDE8A1 ( $453,8 \text{ s} \pm 20,2$ ,  $n = 30$ ) (II) Epac1-camps-PDE8katD ( $377,8 \text{ s} \pm 11,8$ ,  $n = 29$ ) (III) Epac1-camps-SAH30-PDE8A1 ( $894,0 \text{ s} \pm 64,5$ ,  $n = 24$ ) (IV) Epac1-camps-SAH30-PDE8 katD ( $384,8 \text{ s} \pm 13,4$ ,  $n = 22$ ). **C** Ratiometrische Messung von Epac1-camps-PDE8katD unter Stimulation mit  $10 \mu\text{M}$  cAMP, Darstellung

*des transienten FRET-Signals. D Darstellung des CFP- und YFP-Kanals Messung von in C. Nach Stimulation mit 10  $\mu$ M cAMP zeigt sich ein Anstieg im CFP-Kanal und ein Abfall im YFP-Kanal.*

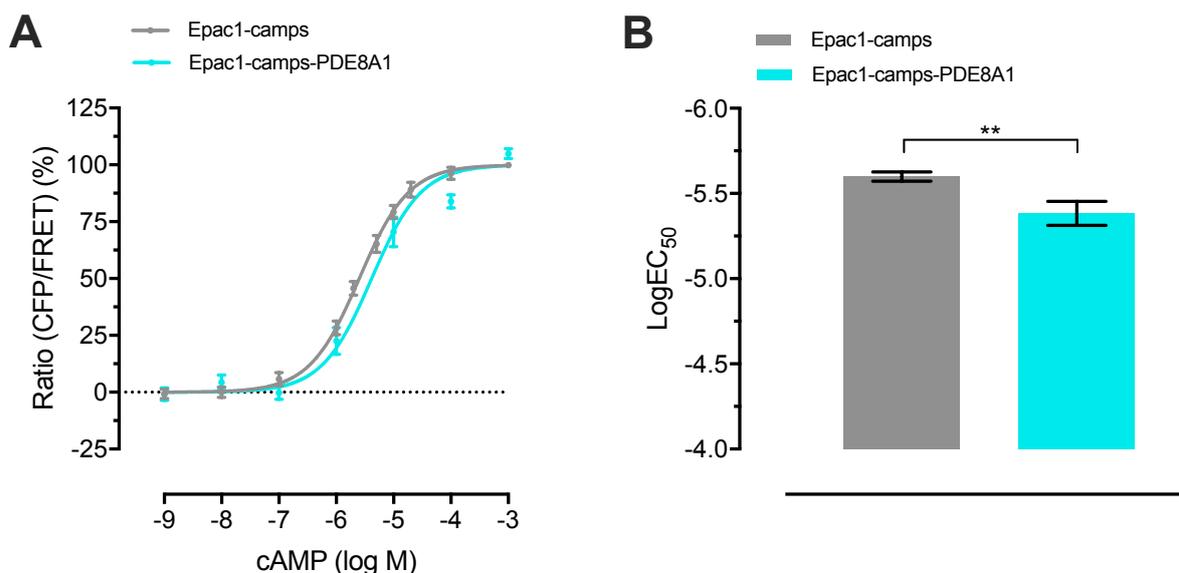
Eine weitere Besonderheit stellt die Konfiguration des transienten FRET-Signals von Epac1-camps-PDE8A1 dar. Hierbei kommt es zu einem langsamen Abfall der FRET-Ratio, wohingegen die anderen Konstrukte durch einen initial schnellen Abfall gekennzeichnet sind (s. Anhang, Abb. 32).

### **3.3.2 Einfluss von Mangan als Cofaktor der PDE8A1**

Zur Optimierung wurden bei Epac1-camps-PDE8A1 verschiedene Messpuffer getestet: der klassische „10/10-Puffer“ (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 10 mM  $MgCl_2$ ), ein Mangan-haltiger Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 4 mM  $MnCl_2$ ) und ein Mangan- und Magnesium-haltiger Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 4 mM  $MnCl_2$  und 10 mM  $MgCl_2$ ). Diese wurden untersucht, da die Abhängigkeit der PDE8A1 vom Cofaktor Mangan ( $Mn^{2+}$ ) und eine dementsprechend höhere molekulare Aktivität (ausgedrückt durch die Wechselzahl  $k_{cat}$ ) beschrieben wurde [105]. Da weder die Aufnahme von Spektren reproduzierbar war, noch bei dem Einsatz sehr hoher Zytosol-Mengen eine Eichung auf YFP der Intensität 400 a.u. bei beiden Mangan-haltigen Puffern möglich war und zusätzlich in ratiometrischen Messungen die Kurven eine erhebliche Schwankung und schlecht differenzierbare Signale aufwiesen, wurden im Hinblick auf die Vergleichbarkeit aller Messungen (gleiche Pufferbedingungen) alle Experimente der PDE8A1 und ihrer katalytischen Domäne mit „10/10-Puffer“ durchgeführt.

### **3.3.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurven der PDE8A1**

Analog zur PDE2A3 wurde zu Beginn die Affinität von Epac1-camps-PDE8A1 zu cAMP analysiert. In der Gegenüberstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von diesem Konstrukt und Sensor findet man eine marginale Rechtsverschiebung der Kurve bei Epac1-camps-PDE8A1, die sich im direkten Vergleich als statistisch signifikant ( $P = 0,0051$ ) darstellt.



**Abb. 22** Vergleich von *Epac1-camps* und *Epac1-camps-PDE8A1*. **A** Marginale Rechtsverschiebung der KWK bei *Epac1-camps-PDE8A1* (cyan,  $n = 11$ ). **B** Statistische Auswertung von **A**; der  $\text{LogEC}_{50}$ -Wert beider Kurven ist signifikant verschieden ( $P = 0,0051$ , Student's  $t$ -Test).

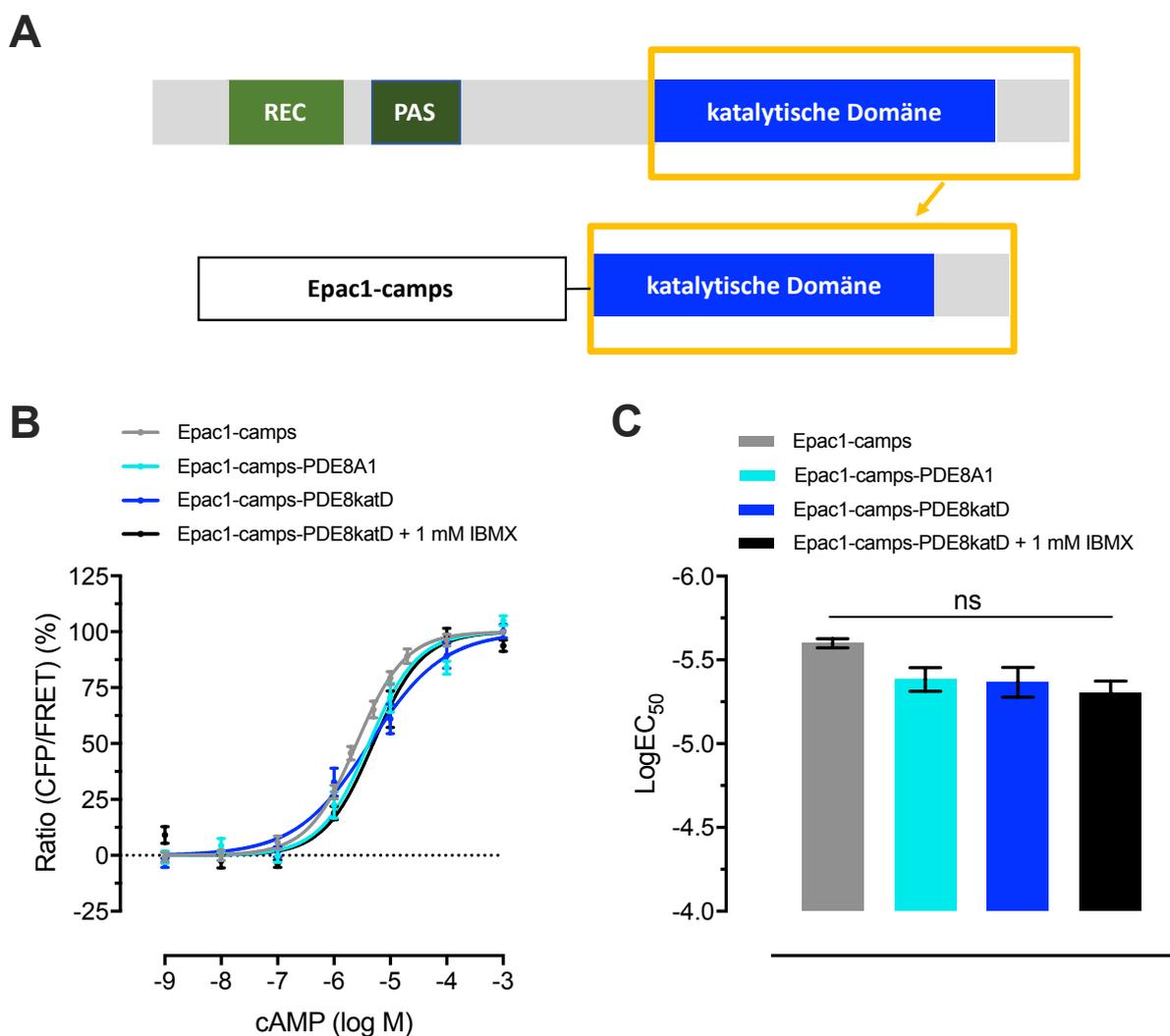
### 3.3.4 Spezifische Inhibition der PDE8A1

Der einzige bisweilen bekannte spezifische Inhibitor der Phosphodiesterase 8A1 ist PF-04957325 [134], welcher zur weiteren Charakterisierung nicht zur Verfügung stand. Eine Inhibition mit Dipyridamol ist ebenfalls beschrieben [123], welche jedoch nicht spezifisch ist. Ebenfalls ist bekannt, dass IBMX bis zu einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  [123, 124, 147] nicht die PDE8 inhibiert, der  $\text{IC}_{50}$  für IBMX liegt bei 698  $\mu\text{M} \pm 29$  [104]. Trotz dieser IBMX-Insensitivität wurde versucht, die PDE8A1 mit hoher Konzentration an IBMX (1 mM) und alternativ Dipyridamol zu hemmen. Diese Inhibitor-Versuche waren jedoch inkonsistent und nicht reproduzierbar und wiesen vor allem in den ratiometrischen Messungen keine erwartete Verlängerung des transienten FRET-Signals auf. Allein bei der Aufnahme der Spektren zweier Konstrukte fanden sich reproduzierbare Ergebnisse, weshalb nur auf diese kurz eingegangen wird.

### 3.3.5 Einfluss der regulatorischen Domänen der PDE8A1

Da die Rechtsverschiebung bei *Epac1-camps-PDE8A1* ebenfalls nur marginal ausgefallen ist, ähnlich der Verschiebung bei *Epac1-camps-PDE2A3*, wurden auch hier die regulatorischen Domänen ausgeschaltet und in direkter Fusion zu *Epac1-camps* gemessen (Abb. 23A). In Abb. 23B erkennt man deutlich, dass auch bei der katalytischen Domäne in direkter Fusion zu *Epac1-camps* höchstens eine marginale

Rechtsverschiebung sichtbar ist, die sich nicht von der Epac1-camps-PDE8A1 unterscheidet. Auch durch Inhibition mit 1mM IBMX ergibt sich kein Unterschied. Betrachtet man die einfaktorielle Varianzanalyse im Gegensatz zum vorher verwendeten t-Test findet man nun keine Signifikanz des reinen Epac1-camps-PDE8A1-Signals im Vergleich zu Epac1-camps (s. Abb. 23C). Dieser Zusammenhang bleibt auch nach Exklusion der Inhibitor-Versuche bestehen. Dementsprechend führt weder die gesamte PDE8A1 noch die katalytische Domäne zu einer Affinitätsveränderung gegenüber cAMP im Vergleich zu dem Sensor Epac1-camps alleine.

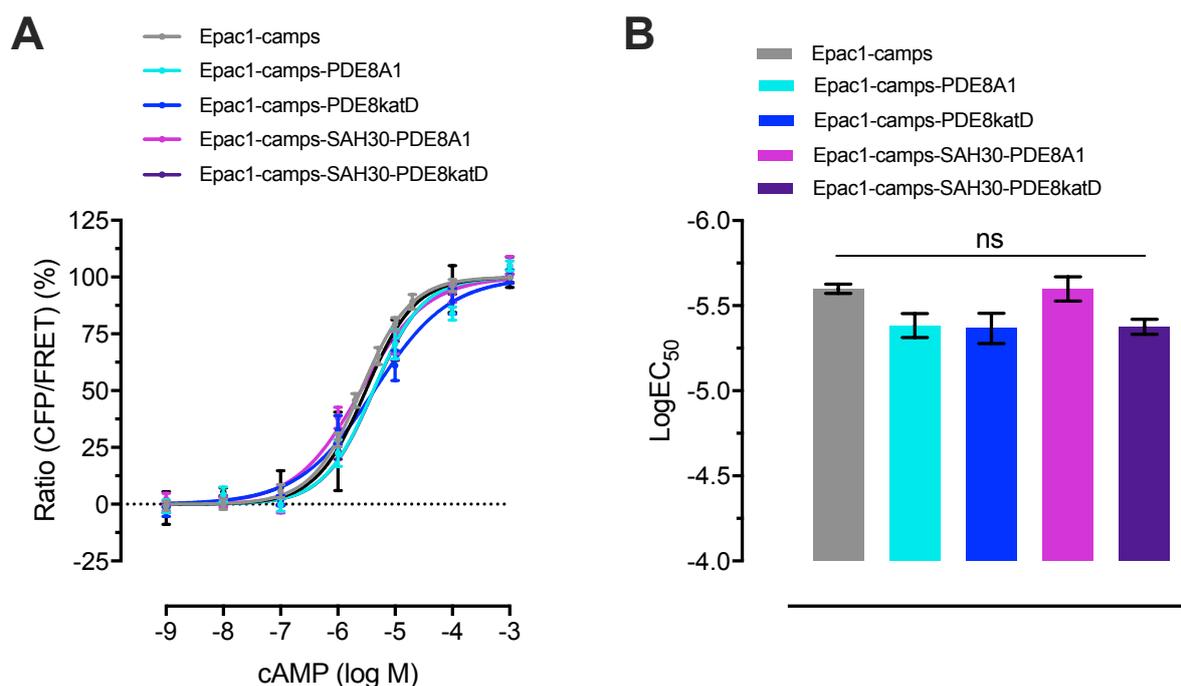


**Abb. 23 Vergleich katalytische Domäne der PDE8 mit der gesamten PDE8A1. A** Oben: Schemazeichnung der PDE8A1 mit N-terminalen regulatorischen Domänen REC, PAS- und katalytischer Domäne (nicht maßstabsgetreu). Unten: Klonierung der katalytischen Domäne (AS 480-829) in direkter Fusion an den Epac1-camps-Sensor; hiermit Ausschalten des Einflusses der regulatorischen Untereinheiten. **B** Direkter Vergleich der KWK von Epac1-camps (grau,  $n = 11$ ), Epac1-camps-PDE8A1 (cyan,  $n = 11$ ) und Epac1-camps-PDE8katD (blau,  $n = 13$ ) und dessen Inhibition (schwarz,

$n = 7$ ). **C** Einfaktorielle Varianzanalyse von **B**. Die  $\text{LogEC}_{50}$ -Werte sind statistisch nicht signifikant verschieden.

### 3.3.6 Einfluss des 30 nm ER/K-Linkers auf Konzentrations-Wirkungs-Kurven der PDE8A1

Analog zu den Experimenten der PDE2A3 wurde bei der PDE8A1 der Einfluss des 30 nm Linkers zwischen Phosphodiesterase und Sensor analysiert. Auch hier zeigt sich keine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, der  $\text{LogEC}_{50}$  ist demnach nicht signifikant verschieden von Epac1-camps, sowohl bei Epac1-camps-SAH30-PDE8A1 als auch bei Epac1-camps-SAH30-PDE8katD (Abb. 24). In Zusammenschau der erhobenen Daten fällt auf, dass alle Konstrukte der PDE8A1 zu keiner Affinitätsveränderung gegenüber cAMP führen, was im starken Kontrast zu den Ergebnissen bei der PDE4A1 und der PDE2A3 steht.



**Abb. 24 Einfluss des 30 nm ER/K-Linkers auf Konstrukte der PDE8.** **A** Direkter Vergleich der KWKs der PDE8A1 und ihrer katalytischen Domäne in direkter Fusion bzw. mit 30 nm ER/K-Linker. Nahezu deckungsgleiche Konzentrations-Wirkungs-Kurven. **B** Einfaktorielle Varianzanalyse von **A**. Kein signifikanter Unterschied der  $\text{LogEC}_{50}$ -Werte der gemessenen Konstrukte in multiplen Vergleichen.

	LogEC <sub>50</sub>	n	LogEC <sub>50</sub> (+1mM IBMX)	n
<i>Epac1-camps</i>	-5,99 ± 0,03	11	-	-
<i>Epac1-camps-PDE8A1</i>	-5,38 ± 0,07	11	-	-
<i>Epac1-camps-PDE8katD</i>	-5,37 ± 0,09	13	-5,30 ± 0,07	7
<i>Epac1-camps-SAH30-PDE8A1</i>	-5,60 ± 0,07	17	-5,51 ± 0,13	3
<i>Epac1-camps-SAH30-PDE8katD</i>	-5,38 ± 0,04	18	-	-

**Tab. 10** LogEC<sub>50</sub>-Werte der PDE8-basierten Konstrukte im Vergleich zu *Epac1-camps* mit und ohne Inhibition mit 1 mM IBMX (30 min).

## 4 Diskussion

cAMP ist ein ubiquitärer zweiter Botenstoff zahlreicher Reaktionswege im menschlichen Körper. Obwohl mittlerweile seit Entdeckung 1958 durch Sutherland et al. [49] über 60 Jahre vergangen sind und große Fortschritte in der cAMP-Forschung gemacht wurden, findet sich in Lehrbüchern immer noch folgende vereinfachte Signalkaskade: Nach Agonisten-Bindung (erster Botenstoff) an GPCR kommt es zur Rezeptoraktivierung, Konformationsänderung desselben und G-Protein-Aktivierung und Dissoziation. Im Falle von  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren stimuliert die  $G_\alpha$ -Untereinheit ihrerseits Adenylatcyclasen, welche aus ATP cAMP synthetisieren (Abb. 1). Dieses steigt daraufhin in der gesamten Zelle an, entwickelt jedoch Stimulus-spezifische Wirkungen [14, 15].

Die Idee von kompartimentierten cAMP-Leveln hat demnach noch nicht Einzug in Lehrbücher gehalten, obwohl die ersten Hinweise hierauf bereits in den späten 70er Jahren gegeben wurden [43, 45]. Mittlerweile ist allgemein anerkannt, dass Phosphodiesterasen durch ihre hydrolytische Aktivität von cAMP einen wichtigen Einflussfaktor in der Kompartimentierung der cAMP-Level darstellen. Dennoch gibt es konträre Meinungen, vor allem gestützt durch mathematische Simulationen, in wie weit sie allein in der Lage sind, solche Kompartimente aufzubauen und aufrechtzuerhalten [38, 62]. Trotz dieser Lücken im Verständnis der Signalkaskade werden im klinischen Alltag PDE-Inhibitoren in einer Vielzahl von Fachgebieten eingesetzt, ohne dass bis jetzt ein allgemeines Verständnis der lokalen Wirkungsweise herrscht. Werden durch Inhibition von Phosphodiesterasen ganze Zellen mit höheren cAMP-Konzentrationen versorgt oder werden nur örtlich begrenzt wenige oder etwa singuläre Signalkaskaden mit höheren cAMP-Leveln stimuliert oder inhibiert?

Nichtsdestotrotz wird an zahlreichen Pharmaka zur Beeinflussung der PDE-Aktivität/cAMP-Spiegel geforscht, vor allem auch mit dem Fokus auf Krankheitsbildern, bei denen dringend neue Therapien benötigt werden, beispielsweise Depression [148-150], Demenz [151-155], kolorektales Karzinom [156], Herzinsuffizienz [32, 91, 157-161] und viele mehr. Immer wieder findet man in der Literaturrecherche dabei mechanistische Erklärungen, die den Begriff der Mikrodomäne von cAMP aufgreifen, jedoch selber keinen direkten Beweis hierfür erbringen. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Fokus auf den direkten Nachweis von cAMP-Domänen und deren

Charakterisierung gelegt, im Zusammenhang mit der hydrolytischen Aktivität zweier, von Grund auf verschiedener Phosphodiesterasen.

Basierend auf einfachen ratiometrischen Stimulationsexperimenten, können in dem gewählten Versuchsaufbau die in der Literatur dargestellten kinetischen Eigenschaften [69] der verwendeten Phosphodiesterasen nachvollzogen werden (schnelle Hydrolyse durch die PDE2A3, hohe Affinität und langsame Hydrolyse durch die PDE8A1, Abb. 14). Zusätzlich kann durch das transiente FRET-Signal in den Fusionskonstrukten mit Epac1-camps eine relevante hydrolytische Aktivität der verwendeten Phosphodiesterasen gezeigt werden. Außerdem wird durch die Verwendung von spezifischen Inhibitoren (im Falle der PDE2A3) sichergestellt, dass die dargestellten FRET-Signale allein auf die Aktivität dieser Phosphodiesterase zurückzuführen sind.

Diese grundlegenden Messungen stellen das Fundament für den eigentlichen Fokus dieser Arbeit dar, die Charakterisierung der cAMP-Domänen. Durch die Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven wird der Einfluss von der PDE2A3 und der PDE8A1 auf cAMP-Domänen, Areale der Zelle mit erniedrigter cAMP-Konzentration, analysiert. Diese erniedrigte cAMP-Konzentration wird durch einen Affinitätsverlust zu cAMP des Epac1-camps-Sensors dargestellt, sichtbar in den Abbildungen durch eine Rechtsverschiebung der Kurve (Abb. 13). Bei der Interpretation der Ergebnisse, können die KWKs direkt miteinander verglichen werden. Unterschiede der Expressionslevel spielen in der Bewertung dieser Ergebnisse keine Rolle, da alle Messungen bei gleicher YFP-Intensität nach direkter Exzitation durchgeführt wurden.

Unter Betrachtung der vereinfachten Berechnung in 3.1.2 sind die transienten FRET-Signale somit vermutlich Ausdruck globaler Eigenschaften der PDEs, nämlich von deren absoluten katalytischen Aktivität, wohingegen die Verschiebungen der KWKs die spezielle Eigenschaft der PDEs widerspiegeln, cAMP-Domänen zu bilden.

### **4.1 Bildung verschiedener cAMP-Gradienten durch die PDE2A3**

In Abb. 16 erkennt man eindeutig die Fähigkeit der PDE2A3 zur Bildung von cAMP-Gradienten, ausgedrückt in der signifikanten Rechtsverschiebung der KWK. Diese ist deutlich geringer ausgeprägt als bei der PDE4A1 (Vergleich  $EC_{50}$ -Werte Tab. 9). Erstaunlicherweise schafft die PDE2A3 es trotz der schnelleren

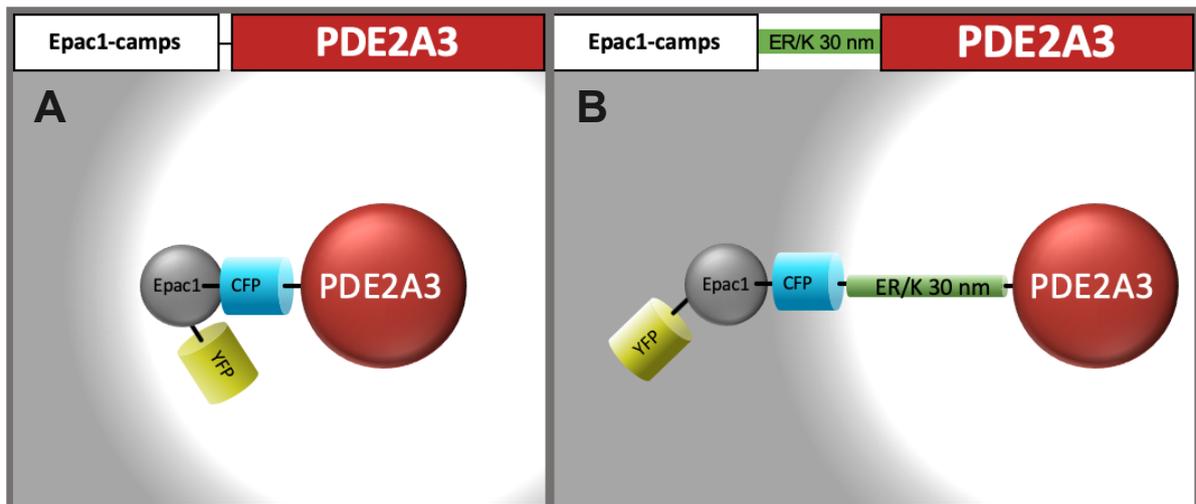
Umsatzgeschwindigkeit nicht, ebenso starke cAMP-Gradienten aufzubauen bzw. aufrecht zu erhalten wie die PDE4. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine herabgesetzte Aktivität der PDE aufgrund eines veränderten Milieus mit fehlenden Cofaktoren sein. Neben einer Bindungsstelle für Magnesium ist eine Bindungsstelle für Zink beschrieben [116, 162], der Einfluss von Zink auf die katalytische Aktivität ist jedoch nicht bekannt und stellt eine denkbare, jedoch eher als zweitrangig zu bewertende Erklärung dar. Eine weitere Möglichkeit dagegen ist der Einfluss von regulatorischen Domänen und zusätzlich der Einfluss von cGMP, worauf sich diese Arbeit fokussiert. Ersteres wurde durch Ausschaltung der regulatorischen GAF-A- und GAF-B-Domänen der PDE2A3 untersucht. In Abb. 17 ist eindeutig zu sehen, dass die katalytische Domäne allein cAMP-Gradienten ausbildet, die noch stärker ausgeprägt sind als die der PDE4A1. Es ergibt sich somit für die PDE2A3 nicht nur die Fähigkeit zur Ausbildung von cAMP-Domänen, vielmehr scheint sie in der Lage zu sein, unterschiedlich starke Gradienten auszubilden, welche im Folgenden weiter diskutiert werden.

## 4.2 Ausmessung der Domänen niedriger cAMP-Konzentration

Um die von der PDE2A3 und ihrer katalytischen Domäne generierten cAMP-Domänen weiter zu charakterisieren, wendet diese Arbeit die von Bock et al. (unveröffentlicht) entwickelte Methode der örtlichen Auflösung von cAMP-Domänen mithilfe der Verwendung von Linkern an. So können hier erstmalig die cAMP-Domänen der PDE2A3 und ihrer katalytischen Domäne in der Größe aufgelöst werden.

### 4.2.1 Die PDE2A3 erzeugt Nanodomänen mit einem Radius < 30 nm

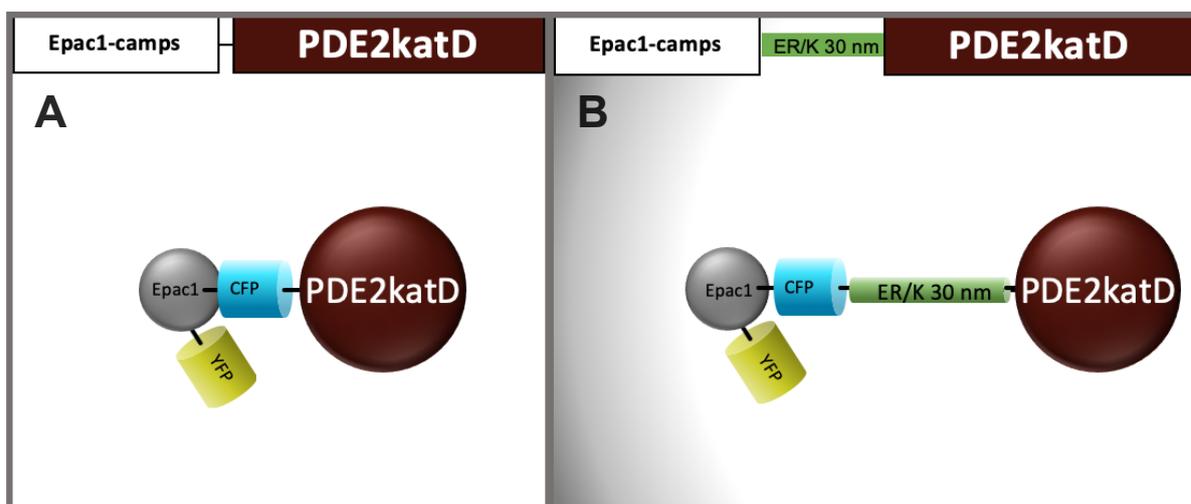
In Abb. 19A-B wird die PDE2A3 in direkter Fusion zum Sensor mit dem entsprechenden Linker-Konstrukt verglichen. Hier erkennt man deutlich, dass durch Einfügen des Linkers die Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach links verschoben wird, die Affinität gegenüber cAMP also steigt - es gibt keinen signifikanten Unterschied zum Sensor alleine, beide registrieren die gleiche cAMP-Menge. Somit muss sich in diesem Fall der Sensor außerhalb des cAMP-Gradienten befinden, womit für die PDE2A3 eine Domäne niedriger cAMP-Konzentration mit einem Radius von weniger als 30 nm dargestellt wird. Somit kann man hier eindeutig von einer Nanodomäne sprechen.



**Abb. 25** Die PDE2A3 erzeugt Nanodomänen mit einem Radius  $< 30$  nm. **A** Die Verschiebung zu höheren cAMP-Konzentrationen in den KWK von Epac1-camps-PDE2A3 ist gleichzusetzen mit der Detektion eines cAMP-Gradienten. Epac1-camps befindet sich somit in einem Bereich geringer cAMP-Konzentration. Die Rechtsverschiebung ist sehr gering, sodass sich der Sensor wahrscheinlich bereits im Randbereich dieses Gradienten befindet. **B** Im Falle des Linker-Konstrukts ergibt sich ein  $\text{LogEC}_{50}$ -Wert, der nicht signifikant verschieden von Epac1-camps ist (Abb. 19), Epac1-camps befindet sich somit außerhalb des Gradienten. Daraus folgt ein Radius dieses Gradienten von kleiner als 30 nm. (grau: hohe cAMP-Konzentration, weiß: niedrige cAMP-Konzentration)

#### 4.2.2 Die katalytische Domäne der PDE2A3 erzeugt Domänen mit einem Radius $> 30$ nm

Eine andere Situation ergibt sich, wenn im selbigen Versuchsaufbau nur die katalytische Domäne der PDE2 verwendet wird. Einfügen des Linkers führt zu keiner Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Abb. 19C-D); dementsprechend misst der Sensor in direkter Fusion und in 30 nm Entfernung dieselbe cAMP Konzentration. Damit ergibt sich eine cAMP-Domäne mit einem Radius größer als 30 nm. Bewusst wird in diesem Fall von einer Domäne gesprochen und nicht von einer *Nanodomäne*, da hier nur die Aussage gemacht werden kann, dass die Domäne einen Radius größer als 30 nm hat, jedoch nicht nach oben weiter eingegrenzt werden kann und dies der bisher in der Literatur aufgetretenen Bezeichnung „Mikrodomäne“ [61, 66, 163, 164] nicht widerspricht.



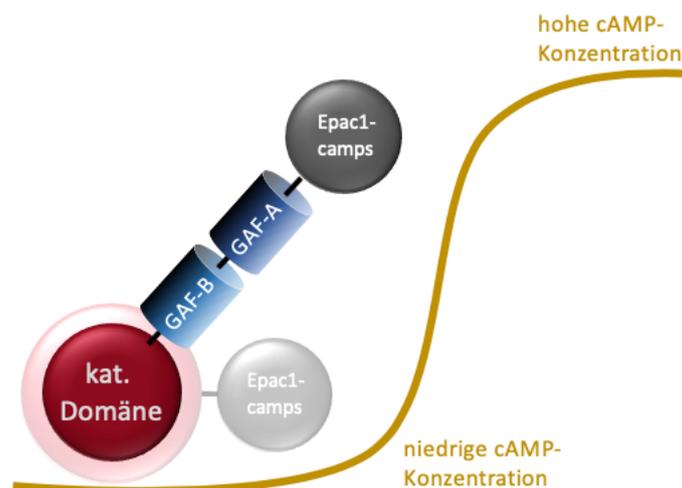
**Abb. 26** *PDE2katD erzeugt Domänen mit einem Radius > 30 nm. A, B* Sowohl direkte Fusion als auch Linker-Konstrukt der PDE2katD zeigen eine deutliche Rechtsverschiebung der KWK zu höheren cAMP-Konzentrationen. D.h. in beiden Fällen befindet sich der Sensor in einem Bereich niedriger cAMP-Konzentration. Die Domäne niedriger cAMP-Konzentration muss einen Radius größer als 30 nm haben. Da es keinen signifikanten Unterschied beider KWK gibt, ist es wahrscheinlich, dass sich der Sensor selbst bei dem Linker-Konstrukt noch nicht an dem Randbereich der Domäne befindet. (grau: hohe cAMP-Konzentration; weiß: niedrige cAMP-Konzentration)

#### 4.2.3 Ursachen der unterschiedlichen Domänen von PDE2katD und PDE2A3

Die grundlegende Idee hinter der Analyse der katalytischen Domäne war das Ausschalten von regulatorischen Domänen, sprich der GAF-A-Domäne, die für die Dimerisierung der PDE2A3 sorgt, und vor allem der GAF-B-Domäne, welche cGMP bindet und hierdurch für eine offene Konformation der katalytischen Domäne für cAMP durch Konformationsänderung sorgt (Abb. 5) [111, 116]. Es sollte ausgeschlossen werden, dass ein eventueller Mangel an cGMP im Zytosol zu einem „blockierten“ Zustand der PDE2 führt. Hieraus ergibt sich die offensichtlichste mögliche Ursache für die Ausbildung einer kleineren Nanodomäne. Das Dimer der PDE2A3 befindet sich in einem „geschlossenen“ Zustand und die im Zytosol herrschenden cGMP-Spiegel sind so niedrig, dass sich die katalytische Domäne nicht genug öffnet, somit weniger cAMP diese erreicht und folglich weniger cAMP hydrolysiert wird. Hier würde man von einer sterischen Barriere im Dimer als Ursache für geringere Gradienten ausgehen.

Eine weitere Ursache beruht auch auf den GAF-Domänen, jedoch nicht auf deren spezieller Funktion. Martinez et al. beschreiben die Dimension des regulatorischen Dimers, sprich GAF-A und GAF-B, als  $105 \times 92 \times 71 \text{ \AA}$  [115]. Darüber hinaus beschreiben Pandit et al. in der Kristall-Struktur der nahezu gesamten PDE2A3 (AS 215-900) GAF-A, GAF-B und katalytische Domäne als linear organisiert [116]. Hieraus

würde sich eine Art „natürlicher Linker“ von ca. 10 nm Länge ( $10 \text{ \AA} = 1 \text{ nm}$ ) ergeben, der die katalytische Domäne und den Sensor in dem Konstrukt Epac1-camps-PDE2A3 voneinander trennt (Abb. 27). Dieses würde die geringere Affinitätsveränderung gegenüber cAMP bei der PDE2A3 erklären. Stellt man sich die Nanodomäne als Gradient abfallender cAMP-Konzentration vor [38] und sieht die PDE bzw. ihre katalytische Domäne im Zentrum dieses Gradienten, würde in der Betrachtung des regulatorischen GAF-A/GAF-B-Komplexes als Linker der Sensor bereits im Bereich steigender cAMP-Konzentration messen, wodurch sowohl Konzentrations-Wirkungskurven als auch die Linker-Experimente verfälscht würden (Abb. 27). Andererseits ist bei der Betrachtung der Linker-Experimente nicht garantiert, dass in diesem Falle in 40 nm Entfernung gemessen würde (30 nm ER/K-Linker + 10 nm natürlicher Linker). Der 30 nm ER/K-Linker ist der längste, stabile Linker seiner Art [139]; gerade deshalb wäre es fragwürdig, ob beide Linker sich addieren würden. Genauso gut ließe sich eine komplexe, nicht stabile Faltung zwischen natürlichem Linker und ER/K-Linker vorstellen, sodass die dargestellte Theorie vor allem für das Linker-Konstrukt unwahrscheinlich wäre. Ohne genaue Strukturanalyse sind solche Aussagen jedoch spekulativ. Im Falle eines tatsächlichen natürlichen Linkers würde man demnach von ähnlicheren Eigenschaften von katalytischer Domäne und kompletter PDE2A3 ausgehen.



**Abb. 27** GAF-A- und GAF-B-Domäne der PDE2A3 als „natürlicher Linker“. Schematische Darstellung des cAMP-Gradienten in Anlehnung an die mathematische Beschreibung von Lohse et al. [38] (Gradient = gelb) mit Epac1-camps-PDE2A3 im Zentrum. Im Hintergrund transparent dargestellt das zunächst in dieser Arbeit dargestellte Setup: die PDE2A3 (durchsichtig rot) befindet sich im Zentrum der Domäne niedriger cAMP-Konzentration, Epac1-camps ist hieran fusioniert. Im Vordergrund eine nicht maßstabsgetreue Illustration der Idee des „natürlichen Linkers“. GAF-A und GAF-

*B trennen die katalytische Domäne von Epac1-camps um ca. 10 nm; dadurch befindet sich der Sensor bereits im Randbereich des Gradienten bei höheren cAMP-Konzentrationen. Die Aussage über einen entsprechenden Radius der Domäne wäre demnach verfälscht.*

Bei der Betrachtung eines natürlichen Linkers fällt das Augenmerk in der Deutung der Ergebnisse ebenfalls auf den verwendeten Linker und es stellt sich die Frage, in wie weit dieser Linker eine stabile Trennung unabhängig von Fusionsproteinen ermöglicht. Der Linker wird von Sivaramakrishnan et al. [139] sowohl als temperaturstabil als auch pH-stabil beschrieben. Jedoch werden auch intermolekulare Wechselwirkungen nicht komplett ausgeschlossen; diese sind jedoch eher als unwahrscheinlich zu bewerten. Nichtsdestotrotz wäre das Design und die Verwendung von längeren, stabilen Linkern absolut interessant, da sich hieraus die Größe der cAMP-Domäne der katalytischen Domäne der PDE2 weiter charakterisieren ließe.

#### **4.2.4 cGMP – Modulator der PDE2A3-induzierten Nanodomänen**

Nachdem eine bis zu 50-fache Stimulation der hydrolytischen Aktivität der PDE2A3 durch cGMP-Bindung beschrieben wurde [118], ist es wahrscheinlich, dass dies auch einen Einfluss auf die cAMP-Gradienten selbst haben könnte. Basierend auf den Daten wurde in dieser Arbeit erstmalig der direkte Einfluss von cGMP auf die Ausprägung der PDE2A3-induzierten Nanodomänen gezeigt. Dieser gestaltet sich graduell (Abb. 20.: graduelle, signifikante Rechtsverschiebung ohne jedoch das Level von PDE2katD zu erreichen), was nahelegt, dass die Nanodomäne der PDE2A3 eine dynamische Domäne ist, die durch cGMP moduliert werden kann.

Eine Aussage über die Größe der entstandenen Domäne kann leider nicht getroffen werden, da auch in diesem Fall ein stabiler Linker, der größer als 30 nm ist, nötig wäre. Darüber hinaus müssten zur maximalen Stimulation höhere cGMP-Konzentrationen getestet werden, was mit dem dargestellten Werkzeug nicht möglich ist. Die KWK von Epac1-camps und cGMP (Abb. 20) zeigt, dass Epac1-camps kein reiner cAMP-Sensor ist, sondern cGMP mit 8,5-fach geringerer Potenz als cAMP misst. Eine höhere cGMP-Konzentration als die gewählte würde somit mit dem Sensor zu stark interagieren und zu falsch-positiven FRET-Signalen führen. In diesem Fall muss ein anderer Sensor gewählt werden, der cAMP-spezifisch ist oder einen höheren  $\text{LogEC}_{50}$  für cGMP besitzt. An dieser Stelle soll jedoch nochmals erwähnt werden, dass eine genauere

Charakterisierung der cGMP-Stimulation essentiell ist, da das in der Literatur dargestellte Ausmaß dieser extrem variiert (1,6-fach [119], 3-fach [107], 4-fach [116, 120], 5-6-fach [106], 30-fach[121], 32-fach [122], bis zu 50-fach [118]).

### **4.3 PDE8A1 – eine Phosphodiesterase ohne cAMP-Gradienten-Bildung?**

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der PDE8A1 ist es unumgänglich, das Prinzip der cAMP-Gradienten-Bildung durch Phosphodiesterasen kritisch zu hinterfragen. In Abb. 22B erkennt man eine signifikante Rechtsverschiebung der KWK, die jedoch nur in der Betrachtung von 2 Populationen im Student's t-Test auftritt. Betrachtet man diese jedoch mit den anderen Konstrukten in einer einfaktoriellen Varianzanalyse, stellt sich dieselbe Verschiebung als nicht mehr signifikant dar (Abb. 23, Abb. 24). Mathematisch betrachtet scheint Letzteres wahrscheinlicher, da eine einfaktorielle Varianzanalyse aufgrund der Betrachtung mehrerer Populationen aussagekräftiger ist und eine geringere Fehlerrate aufweist. Darüber hinaus wurden die Versuche in repetitiver Form durchgeführt mit einer hohen Anzahl unabhängiger Experimente (s. Tab. 10), was für die Glaubwürdigkeit der dargestellten Ergebnisse spricht.

Nichtsdestotrotz kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Einflussfaktoren ursächlich sind. Es wurde bereits dargestellt, dass in der Literatur Mangan als Cofaktor der PDE8A1 zusätzlich zu Magnesium beschrieben wurde. Yan et al. finden für  $Mn^{2+}$  einen  $k_{cat}$  der PDE8A für cAMP von  $4,0 s^{-1}$  und für  $Mg^{2+}$  von  $2,9 s^{-1}$ , sprich eine Stimulation der katalytischen Aktivität [105]. Deshalb wurde Epac1-camps-PDE8A1 zu Beginn in verschiedenen Puffern getestet. Wie bereits dargestellt, wurde neben dem klassischen Messpuffer ein rein Mangan-haltiger, wie auch ein sowohl Mangan- als auch Magnesium-haltiger Puffer getestet unter Beachtung der publizierten Konzentrationen. Hierbei ergaben die letzteren zwei Puffer kein stabiles FRET-Signal in den ratiometrischen Messungen, weshalb kein zusätzliches Mangan für diese Versuche verwendet wurde. Daher kann hier nur eine Aussage über die PDE8A1 in einem eventuell nicht für sie optimalen Puffer gemacht werden und ein tatsächlicher Einfluss auf die Ergebnisse nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die Zusammenschau der Ergebnisse (keine signifikanten Unterschiede der LogEC<sub>50</sub>-Werte in Abb. 23, Abb. 24) spricht demnach am ehesten dafür, dass die PDE8A1 und

ihre katalytische Domäne nicht die Fähigkeit haben, für Epac1-camps detektierbare Nanodomänen auszubilden. Damit erschließt sich eine neue Sichtweise auf Phosphodiesterasen und cAMP-Hydrolyse, da es scheinbar mit der PDE8A1 eine Phosphodiesterase gibt, die einen (mit den hier dargestellten Methoden) nicht messbaren Einfluss auf cAMP-Hydrolyse hat. Diese Aussage schließt die Eigenschaft zur Gradienten-Bildung jedoch nicht aus, da eine Stimulation der PDE8A1 trotzdem denkbar ist, sei es durch Cofaktoren (s.o.) oder bislang unbekannte Stimuli auf die regulatorischen Bereiche. Die experimentellen Erhebungen legen nahe, dass die Ausbildung von cAMP-Gradienten im mikromolaren Bereich keine ubiquitäre Eigenschaft von Phosphodiesterasen ist. Dahingegen ist eine Ausbildung von Gradienten im nanomolaren Bereich jedoch durchaus denkbar, wofür weitere Analysen mit einem sensitiveren Sensor als Epac1-camps nötig wären.

#### 4.4 Analyse von Störfaktoren der *in vitro* Experimente

Nichtsdestotrotz dürfen bei der Zusammenschau aller Ergebnisse weitere Störfaktoren nicht außer Betracht gelassen werden. Konformationsänderungen oder Proteinfaltungen (s. natürlicher Linker bei der PDE2A3) sind dabei unter anderem zu nennen. So fällt bei der Betrachtung der ratiometrischen Messungen der Konstrukte der PDE8A1 (s. Anhang, Abb. 32) auf, dass sich Epac1-camps-PDE8A1 anders verhält als alle anderen Konstrukte. Hier gibt es einen extrem langsamen Abfall der FRET-Ratio, was für den Epac1-camps Sensor untypisch ist und bei keinem der anderen verwendeten Konstrukte detektiert wurde. Ein möglicher Erklärungsansatz in diesem Fall könnte ein sterisches Hindernis durch den N-terminalen Teil der PDE8A1 oder eine Fehlfaltung desselben sein. Sobald der N-Terminus mittels Linker vom Sensor getrennt wird oder die PDE ohne gerade diesen Bereich der regulatorischen Untereinheiten direkt mit Epac1-camps fusioniert wird, kommt es wieder zu dem schnellen Abfall der FRET-Ratio.

Des Weiteren spricht die Verteilung der Dauer des transienten FRET-Signals bei Epac1-camps-SAH30-PDE8A1 (Abb. 21) für einen bislang unbekanntem Einflussfaktor oder eine Instabilität des Konstrukts.

Kritisch müssen auch die zugrunde liegenden, publizierten kinetischen Parameter der PDEs betrachtet werden. Die in der Literatur erhobenen Werte für  $V_{max}$  basieren zum größten Teil auf aufgereinigten Proteinen. Hierdurch werden jedoch zahlreiche

Umweltfaktoren und Wechselwirkungen ausgeschaltet, sodass es fraglich ist, ob die zugrunde gelegten Werte überhaupt der Realität entsprechen, zumal im Falle der PKA bereits Diskrepanzen zwischen *in vivo* und *in vitro* Messungen bekannt sind [165]. Darüber hinaus stammen  $K_m$  und  $V_{max}$ -Werte der PDE2A3 aus den 80er bis 90er Jahren, die der PDE8A1 aus den späten 90ern [69], mit Korrekturen in der 2000ern [104, 105]. Zur genaueren Vergleichbarkeit wäre eine neue Erhebung der Daten unter gleichen Bedingungen nötig.

## 4.5 Bedeutung der gewählten Phosphodiesterasen für die Zelle

### 4.5.1 PDE2A3 – Regulator basaler cAMP-Konzentrationen

Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, charakterisiert sich die PDE2A3 wie folgt:

- die katalytische Domäne bildet cAMP-Domänen, die größer als 30 nm sind
- die komplette PDE2A3 bildet Domänen, die kleiner als 30 nm sind
- die PDE2A3 lässt sich durch cGMP stimulieren; hiermit lassen sich die Gradienten regulieren

Vor dem Hintergrund, dass die PDE2A3 vor allem in den essentiellsten Geweben, wie Herz, Gehirn und Muskulatur, exprimiert ist, scheinen die Eigenschaften darauf hinzuweisen, dass sie eine Rolle als Regulator der basalen cAMP-Level einnimmt. Sie ist durch die schnelle Hydrolyse von cAMP in der Lage auf akute Änderungen der cAMP-Level zu reagieren und könnte so in der Signaltransduktion an sich eine Rolle spielen; die niedrige Affinität zu cAMP ( $K_m = 30 \mu\text{M}$  [69]) macht dieses jedoch sehr unwahrscheinlich. Viel mehr spricht es dafür, dass sie bei „Überladung“ der Zelle mit cAMP diese Level schnell wieder nach unten reguliert. Dieses wird gestützt durch die „Anschaltbarkeit“ der PDE durch cGMP. Es kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PDE2A3 unter basalen Bedingungen kaum in der Lage ist, Gradienten zu bilden, jedoch diese Eigenschaft unter Stimulation von cGMP zunimmt. Die Zelle hat somit die Möglichkeit, den Einfluss dieser PDE mittels cGMP zu regulieren, sodass sie vereinfacht gesagt „An- und Ausgeschaltet“ werden kann.

#### 4.5.2 PDE8A1 – Feinregulator von einzelnen Signalwegen oder cAMP-Bindungsprotein?

Die Interpretation der Daten der PDE8A1 gestaltet sich komplizierter. In dieser Arbeit wurden folgende Eigenschaften gezeigt:

- die PDE8A1 und ihre katalytische Domäne sind nicht in der Lage cAMP-Gradienten zu bilden
- die Hydrolyse von cAMP kann in ratiometrischen Messungen zwar sichtbar gemacht werden, ist jedoch sehr langsam.

Trotz der Nichtdarstellbarkeit von cAMP-Gradienten ist es möglich, dass mit Epac1-camps ein cAMP-Sensor mit zu geringer cAMP-Affinität gewählt wurde, sodass nicht die relevanten Bereiche aufgelöst werden konnten, in denen die PDE8A1 einen Einfluss auf die cAMP-Level hat. Vor dem Hintergrund, dass eine Zelle basale cAMP-Level von ca.  $1 \mu\text{M}$  [165-169] hat, würde der  $K_m$  von  $0,06 \mu\text{M}$  dafür sprechen, dass die PDE8A1 ständig cAMP gebunden hätte, wobei der physiologische Sinn bei sehr geringer  $V_{\max}$  fraglich wäre. Durchaus vorstellbar jedoch wäre eine Rolle als Feinregulator bereits bestehender cAMP-Gradienten, in denen eine geringe cAMP-Konzentration vorherrscht und sie dort zusätzlich einen lokalisierten stärkeren Gradienten ausbildet. Hierbei wäre dann auch die hohe Affinität von Nutzen und würde einen logischen Zusammenhang ergeben. Hierfür müssten analoge Experimente unter moderater bis starker cAMP-Depletion durchgeführt werden, um ein solches Milieu zu imitieren. Somit könnte sie für die Feinregulation von singulären Signalwegen zuständig sein, wozu aktuelle Forschungsergebnisse durchaus passen [96].

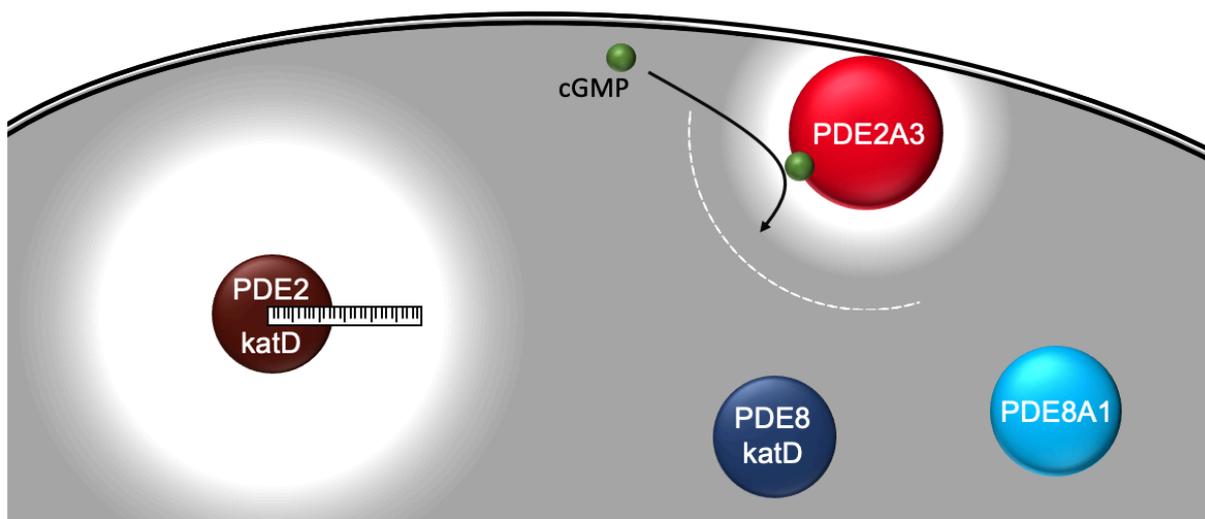
Kritisch betrachtet könnte es sich bei der PDE8A1 gerade vor dem Hintergrund der am meisten abweichenden Struktur der katalytischen Domäne [124] und des Fehlens eines eindeutigen  $V_{\max}$ -Werts (s. Abschnitt 1.3.5.3) [104] [124] um ein reines cAMP-Bindungsprotein ohne katalytische Funktion handeln, was somit auch cAMP lokal in geringem Maße puffern könnte und somit zur Gradienten-Bildung beitragen könnte.

#### 4.6 Der Einfluss der katalytischen Eigenschaften verschiedener Phosphodiesterasen auf cAMP-Nanodomänen

Abschließend wird in dieser Arbeit gezeigt, dass die Rolle von Phosphodiesterasen bei der cAMP-Kompartimentierung vielschichtiger und komplexer ist, als bisher angenommen. Phosphodiesterasen spielen eine essentielle Rolle in der

Aufrechterhaltung von Domänen niedriger cAMP-Konzentrationen, welche nun eindeutig für bestimmte PDEs als Nanodomänen bezeichnet werden können. Bock et al. (unveröffentlicht) zeigen Domänen der PDE4A1 im Bereich von einem Radius kleiner als 10 nm. Die Domäne der Umsatz-starken PDE2A3 bildet dagegen Gradienten mit einem Radius kleiner als 30 nm, ihre katalytische Domäne jedoch welche mit einem Radius größer als 30 nm. Somit scheint eine direkte Korrelation zwischen Umsatzgeschwindigkeit und Größe dieser Domänen gegeben zu sein. Dieses System zeichnet sich dabei durch eine Dynamik aus. Die GAF-Domäne der PDE2A3 lässt sich durch cGMP stimulieren, höchstwahrscheinlich bis auf die maximale Größe, die durch die katalytische Domäne gezeigt wird. Das gesamte System von Phosphodiesterase und dazugehöriger cAMP-Nanodomäne gewinnt aber zusätzlich noch an Komplexität bei der Betrachtung der PDE8A1, bei welcher die Gradienten-Bildung in dem Konzentrationsbereich, der bei den anderen genannten PDEs beschrieben wurde, nicht darstellbar ist oder einem anderen Mechanismus folgt.

Daraus ergeben sich zusammengefasst folgende Erkenntnisse: Die cAMP-Domänen um Phosphodiesterasen sind im Größenbereich von Nanometern angesiedelt und korrelieren direkt mit der Umsatzgeschwindigkeit der PDE. Daneben stellen sie dynamische Bereiche dar, die in ihrer Größe variiert werden können und nicht ubiquitär bei jeder Phosphodiesterase ausgeprägt sind. Eine weitere Analyse der genannten PDEs wie auch eine Charakterisierung der anderen acht PDE-Familien wäre jedoch nötig, um dieses Bild zu vervollständigen.



**Abb. 28** Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit – der Einfluss der katalytischen Eigenschaften verschiedener Phosphodiesterasen auf cAMP-Nanodomänen. Die katalytische Domäne der PDE2 bildet eine Domäne, die größer als 30 nm ist (links), die

*gesamte PDE2A3 bildet jedoch einen kleineren Gradienten aus, der sich durch cGMP stimulieren lässt (oben rechts). Unten rechts im Bild die PDE8A1 und ihre katalytische Domäne, die keinen Gradienten ausbilden.*

## 5 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AC	Adenylatcyclase
AKAP	A-Kinase Anchoring Protein
AMP	Adenosinmonophosphat
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	Destilliertes Wasser
BBS	Borate Buffered Saline (deutsch: "Borat gepufferte Saline")
BES	N,N-bis(2-hydroxyethylethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CFP	Cyan fluorescent protein (cyan fluoreszierendes Protein)
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DMEM	Dumbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin
Epac	Exchange protein directly activated by cAMP
FBS	Fetal Bovine Serum
GAF	Mammalian cGMP-dependent phosphodiesterases, Anabaena adenylyl cyclases, <i>E. coli</i> FhIA
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEK	Human Embryotic Kidney Cells

---

IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
I <sub>Ca,L</sub>	Spannungsabhängige L-Typ-Kanäle (Dihydropyridin-Kanäle)
katD	Katalytische Domäne
kB	Kilo Basen
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ionen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Mn <sup>2+</sup>	Mangan-Ionen
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MRP	Multidrug Resistance-Related Protein
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
PAS	Per-Arnt-Sim
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglycol
PenStrep	Penicillin Streptomycin
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPDC	Popeye Domain Containing Family
PP	Polypropylen
REC-Domäne	Receiver-Domäne
RNAse	Ribonuklease
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodin-Rezeptoren
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V <sub>max</sub>	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
YFP	Yellow fluorescent protein (gelb fluoreszierendes Protein)

## 6 Zusammenfassung

Cyclisches Adenosinmonophosphat ist ein ubiquitärer zweiter Botenstoff zahlreicher Signalwege im menschlichen Körper. Auf eine Vielzahl verschiedenster extrazellulärer Signale folgt jedoch eine Erhöhung desselben intrazellulären Botenstoffs - cAMP. Nichtsdestotrotz schafft es die Zelle, Signalspezifität aufrecht zu erhalten. Ein anerkanntes, wenn auch bisher unverstandenes Modell, um dieses zu ermöglichen, ist das Prinzip der Kompartimentierung. Die Zelle besitzt demnach Areale verschieden hoher cAMP-Konzentrationen, welche lokal begrenzt einzelne Signalkaskaden beeinflussen und somit eine differenzierte Signalübertragung ermöglichen. Eine mögliche Ursache für die Ausbildung solcher Bereiche geringerer cAMP-Konzentrationen (hier als Domänen bezeichnet), ist die hydrolytische Aktivität von Phosphodiesterasen (PDEs), welche als einzige Enzyme die Fähigkeiten besitzen, cAMP zu degradieren.

In dieser Arbeit wird der Einfluss der cAMP-Hydrolyse verschiedener PDEs auf die Größe dieser Domänen evaluiert und mit denen der PDE4A1 verglichen, welche bereits durch unsere Arbeitsgruppe aufgrund ihrer Größe als *Nanodomänen* definiert wurden. Der Fokus wird dabei auf den Einfluss von kinetischen Eigenschaften der Phosphodiesterasen gelegt. So werden eine PDE mit hoher Umsatzgeschwindigkeit (PDE2A3) und eine PDE mit hoher Substrataffinität (PDE8A1) verglichen. Mithilfe sogenannter Linker, Abstandshaltern definierter Länge, werden zusätzlich die *Nanodomänen* ausgemessen, um einen direkten Zusammenhang zwischen Größe und kinetischer Eigenschaft anzugeben. Die Zusammenschau der Ergebnisse zeigt, dass die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Phosphodiesterasen direkt mit der Größe der *Nanodomänen* korreliert.

Durch den unmittelbaren Vergleich der gesamten PDE mit ihrer katalytischen Domäne wird zusätzlich der Einfluss von regulatorischen Domänen evaluiert. Es wird gezeigt, dass diese cAMP-Gradienten modulieren können. Bei der PDE2A3 geschieht die Modulation u.a. durch Stimulation mit cGMP, welche höchstwahrscheinlich dosisabhängig ist und somit graduell verläuft. Hiermit präsentieren sich die Domänen als dynamische Bereiche, d.h. sie können in ihrer Ausprägung reguliert werden. In dieser Arbeit wird die Hypothese bestätigt, dass Phosphodiesterasen eine wichtige Rolle in der Kompartimentierung von cAMP spielen, die Gruppe jedoch inhomogener ist, als bislang angenommen. Die Gradienten-Bildung lässt sich nicht bei jeder

Phosphodiesterase darstellen (PDE8A1). Einige Phosphodiesterasen (PDE2A3) jedoch bilden Kompartimente, die durch externe Stimuli in ihrer Größe reguliert werden können.

Die Arbeit legt den Grundstein zur breiteren Charakterisierung des spezifischen Einflusses weiterer PDEs auf cAMP-Kompartimentierung, welches nicht nur das Verständnis der Kompartimentierungs-Strategien voranbringt, sondern auch essentiell für das Verständnis der Pathophysiologie zahlreicher Krankheitsbilder, aber auch für das Verständnis bereits angewandter aber auch potentiell neuer Medikamente ist.

## 7 Summary

Cyclic AMP is a ubiquitous second messenger, which is involved in a huge variety of signaling pathways. Nevertheless, thinking about signaling specificity, it is unclear how numerous diverse signals are all translated via the same second messenger. However, to ensure downstream specificity there is one accepted model - the compartmentalization of cAMP. Different levels of cAMP therefore lead to signaling islets or areas, which ensure a more diverse downstream signaling. One example, which guarantees areas with lower cAMP concentration, is the local hydrolysis of cAMP due to phosphodiesterases' hydrolytic activity.

In this thesis the ability of different phosphodiesterases to build cAMP gradients is compared to the ability of the PDE4 to build cAMP domains in the scale of nanometers, which was already shown by our group. To discriminate influence factors of the formation of those nanodomains, the focus was set on distinct PDEs' kinetic properties. Therefore, a PDE with a high velocity (PDE2A3) for cAMP hydrolysis is compared to the PDE with the highest known affinity (PDE8A1) to cAMP. Furthermore, with the tools provided by our group, linkers, which are "nanorulers" of distinct size, were used to directly measure the radius of those domains. It is revealed, that the size of the nanodomains directly correlates with the hydrolysis velocity.

Furthermore, by comparison of full length PDE with its catalytic domain, it is shown, that their regulatory domains can modulate the ability of phosphodiesterases to create cAMP gradients. In PDE2A3, modulation of cAMP gradients was observed upon cGMP stimulation, which probably occurs in a concentration-dependent matter. Thus, cAMP domains seem to be dynamic areas, i.e. they can be regulated in their size. It is postulated, that phosphodiesterases are one important force for creating compartments, but the family of PDEs itself is inhomogeneous. Not every PDE can build detectable compartments (PDE8A1), but others can build compartments, which are regulated through external stimuli (PDE2A3).

The thesis builds the foundation for additional characterization of the other PDE families, which would provide further insight in strategies of cAMP compartmentalization. Moreover, the knowledge of distinct functions of PDEs on cAMP compartments is crucial for the understanding of the pathophysiology of several diseases and the understanding of present and future pharmacological therapies.

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b> Funktionsweise von G <sub>s</sub> -gekoppelten GPCR.....	1
<b>Abb. 2</b> Mögliche Strategien der cAMP-Kompartimentierung .....	3
<b>Abb. 3</b> Hydrolyse von cAMP zu 5'AMP.....	5
<b>Abb. 4</b> Schematischer Aufbau der PDE2A3 .....	11
<b>Abb. 5</b> Schematische Darstellung des PDE2A3-Dimers unter cGMP-Stimulation....	12
<b>Abb. 6</b> Schematischer Aufbau der PDE8A1 .....	14
<b>Abb. 7</b> Schematische Darstellung des Epac1-camps-FRET-Sensors. ....	17
<b>Abb. 8</b> Vermessung der cAMP-Nanodomänen I: direkte Fusion von der PDE2A3 bzw. PDE8A1 mit dem Sensor Epac1-camps.....	20
<b>Abb. 9</b> Vermessung der cAMP-Nanodomänen II: Prinzip des Linkers .....	20
<b>Abb. 10</b> Schematische Übersicht über die verwendeten Methoden zur Klonierung.	30
<b>Abb. 11</b> Klonierungsstrategien .....	37
<b>Abb. 12</b> Spektrophotometrische Messung der optischen Dichte zur Herstellung kompetenter E.coli .....	43
<b>Abb. 13</b> Grundlagen – transientes FRET-Signal und Affinitätsverschiebung bei Epac1-camps-PDE4A1 .....	46
<b>Abb. 14</b> Vergleich der Dauer des transienten FRET-Signals von PDE4A1, PDE2A3, PDE8A1 .....	48
<b>Abb. 15</b> Ratiometrische Charakterisierung von PDE2A3.....	51
<b>Abb. 16</b> Geringer Affinitätsverlust von Epac1-camps-PDE2A3 zu cAMP .....	53
<b>Abb. 17</b> Vergleich katalytische Domäne der PDE2 mit der gesamten PDE2A3 .....	54
<b>Abb. 18</b> Einfluss des 30 nm ER/K-Linkers auf Konstrukte der PDE2 .....	56
<b>Abb. 19</b> Einfluss des Linkers – Vergleich PDE2A3 mit PDE2katD .....	57
<b>Abb. 20</b> Einfluss von cGMP auf die katalytische Aktivität der PDE2A3 .....	59
<b>Abb. 21</b> Ratiometrische Charakterisierung von PDE8A1.....	60
<b>Abb. 22</b> Vergleich von Epac1-camps und Epac1-camps-PDE8A1.....	62
<b>Abb. 23</b> Vergleich katalytische Domäne der PDE8 mit der gesamten PDE8A1 .....	63
<b>Abb. 24</b> Einfluss des 30 nm ER/K-Linkers auf Konstrukte der PDE8 .....	64
<b>Abb. 25</b> Die PDE2A3 erzeugt Nanodomänen mit einem Radius < 30 nm .....	69
<b>Abb. 26</b> PDE2katD erzeugt Domänen mit einem Radius > 30 nm .....	70
<b>Abb. 27</b> GAF-A- und GAF-B-Domäne der PDE2A3 als „natürlicher Linker“ .....	71
<b>Abb. 28</b> Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit – der Einfluss der katalytischen Eigenschaften verschiedener Phosphodiesterasen auf cAMP-Nanodomänen.....	77
<b>Abb. 29</b> Darstellung von repräsentativen Spektren der PDE2A3. ....	88

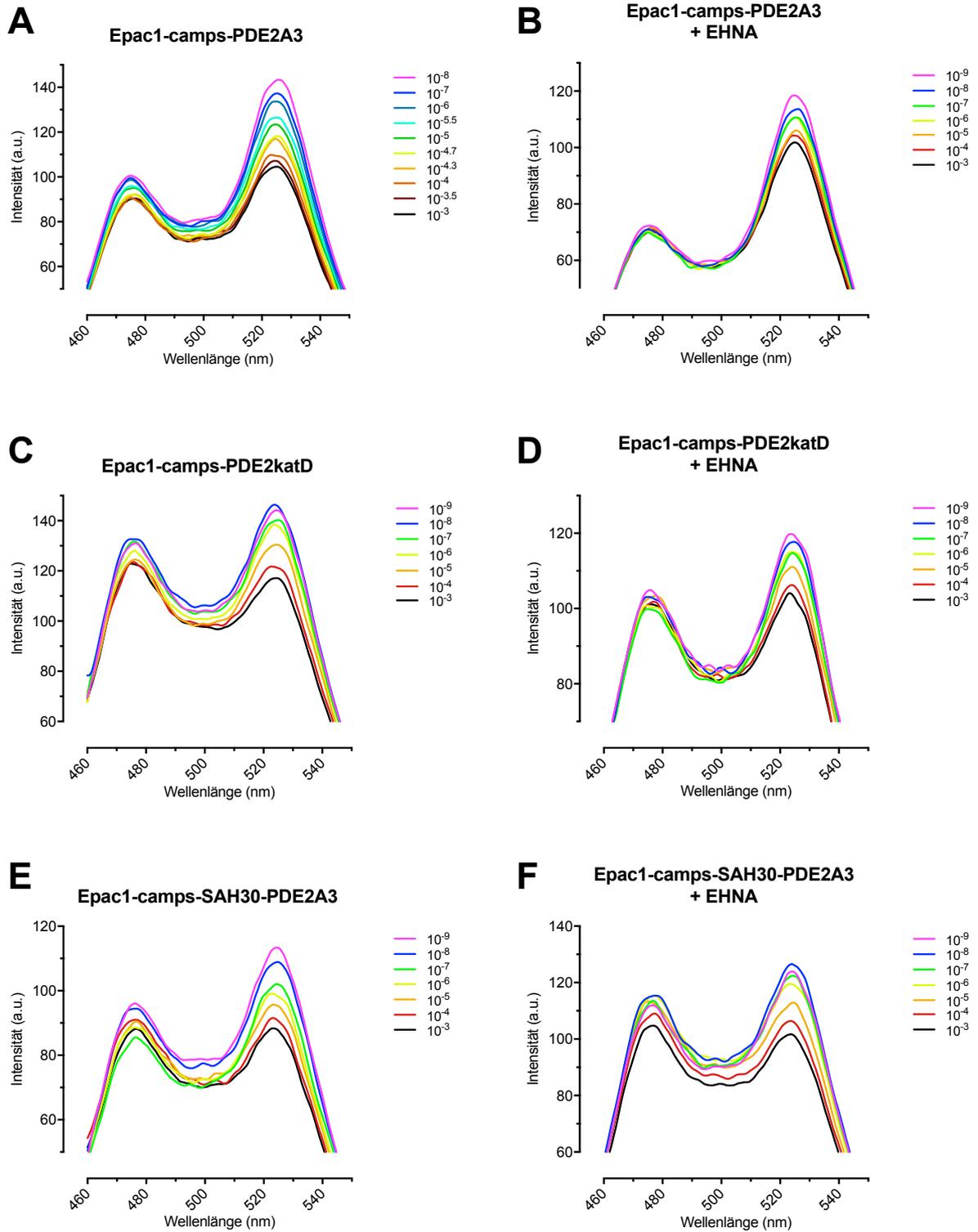
<b>Abb. 30</b> Darstellung von repräsentativen Spektren der PDE8A1 .....	89
<b>Abb. 31</b> Wiederholte Stimulation der PDE2-basierten Konstrukte .....	90
<b>Abb. 32</b> Wiederholte Stimulation der PDE8-basierten Konstrukte .....	91
<b>Abb. 33</b> Spezifische Inhibition der PDE2A3-basierten Konstrukte mit EHNA I .....	92
<b>Abb. 34</b> Spezifische Inhibition der PDE2A3-basierten Konstrukte mit EHNA II. ....	93

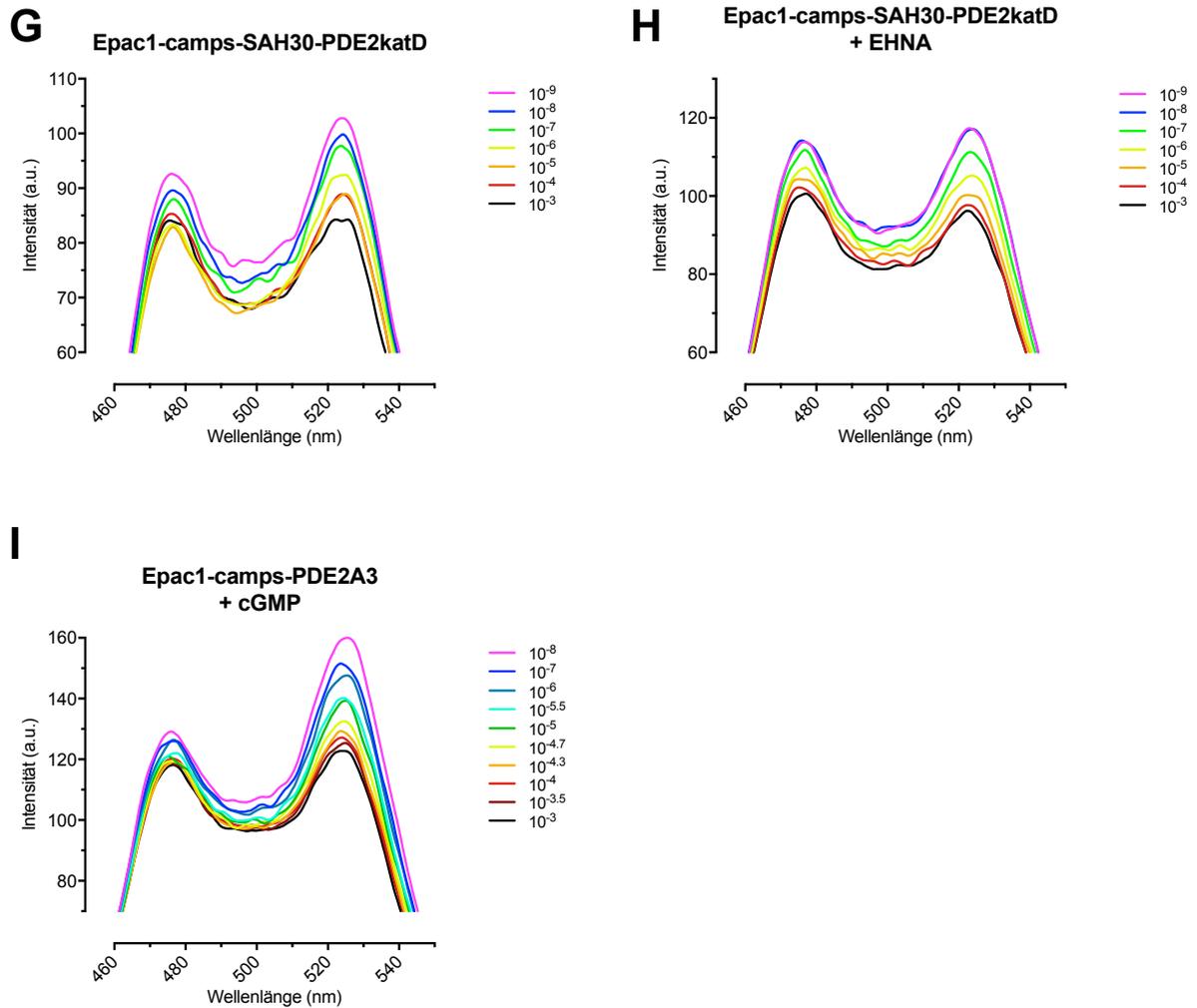
## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b> Kinetische Eigenschaften der Phosphodiesterasen 2A3, 4A1 und 8A1.....	10
<b>Tab. 2</b> Kinetische Eigenschaften der Phosphodiesterase 2A3 .....	10
<b>Tab. 3</b> PCR-Bedingungen.....	32
<b>Tab. 4</b> PCR-Bedingungen peqlab Protokoll .....	34
<b>Tab. 5</b> Beispielhafter Ligationssansatz .....	39
<b>Tab. 6</b> Erfolgreiche Ligationansätze aller in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte	39
<b>Tab. 7</b> Pufferzusammensetzung für Mini-DNA-Präparation.....	41
<b>Tab. 8</b> Legende der Signifikanzniveaus.....	44
<b>Tab. 9</b> LogEC <sub>50</sub> -Werte der PDE2-basierten Konstrukte im Vergleich zu Epac1-camps und Epac1-camps-PDE4A1 .....	58
<b>Tab. 10</b> LogEC <sub>50</sub> -Werte der PDE8-basierten Konstrukte im Vergleich zu Epac1- camps .....	65

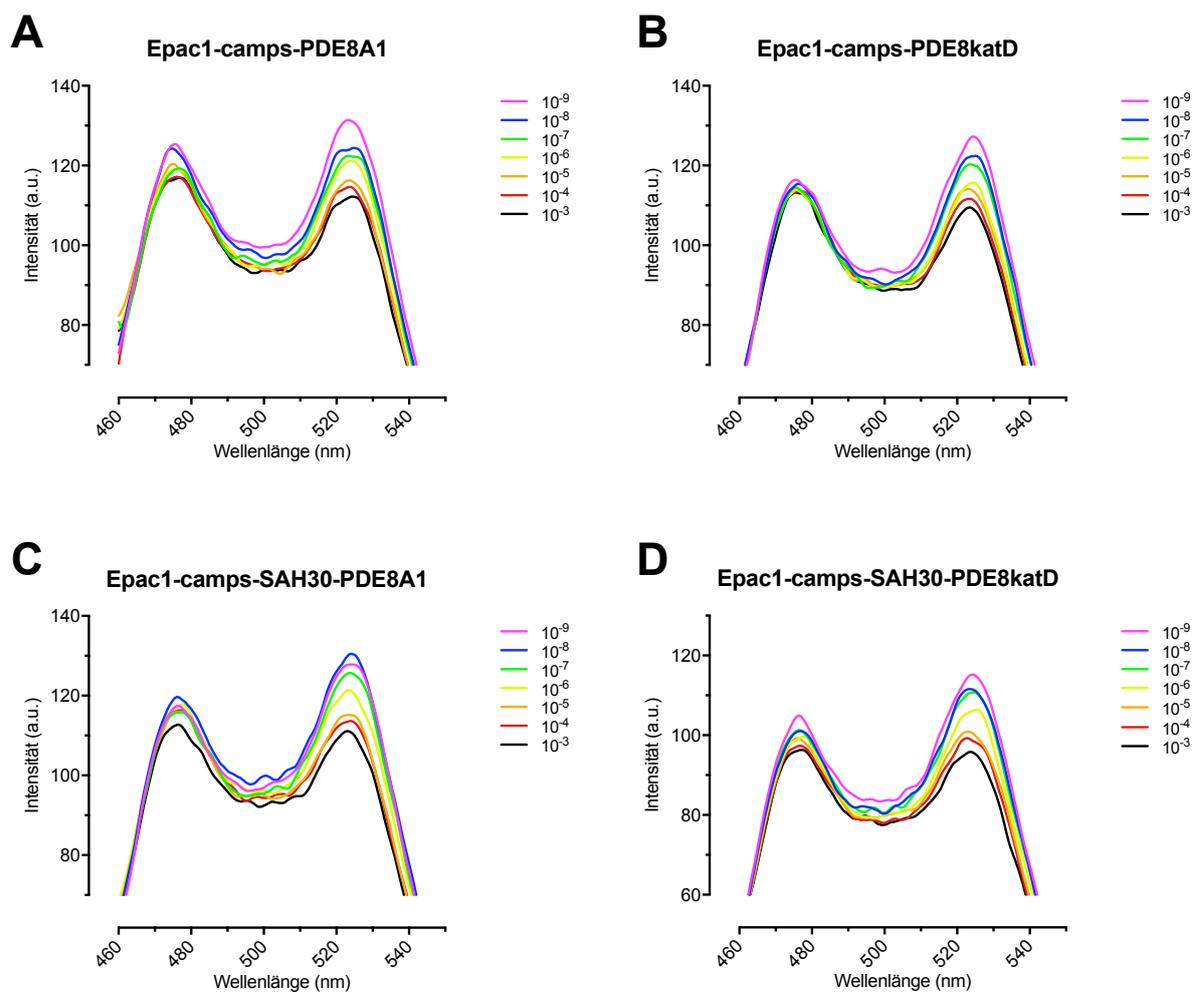
## 10 Anhang

## 10.1 Fluoreszenzspektren



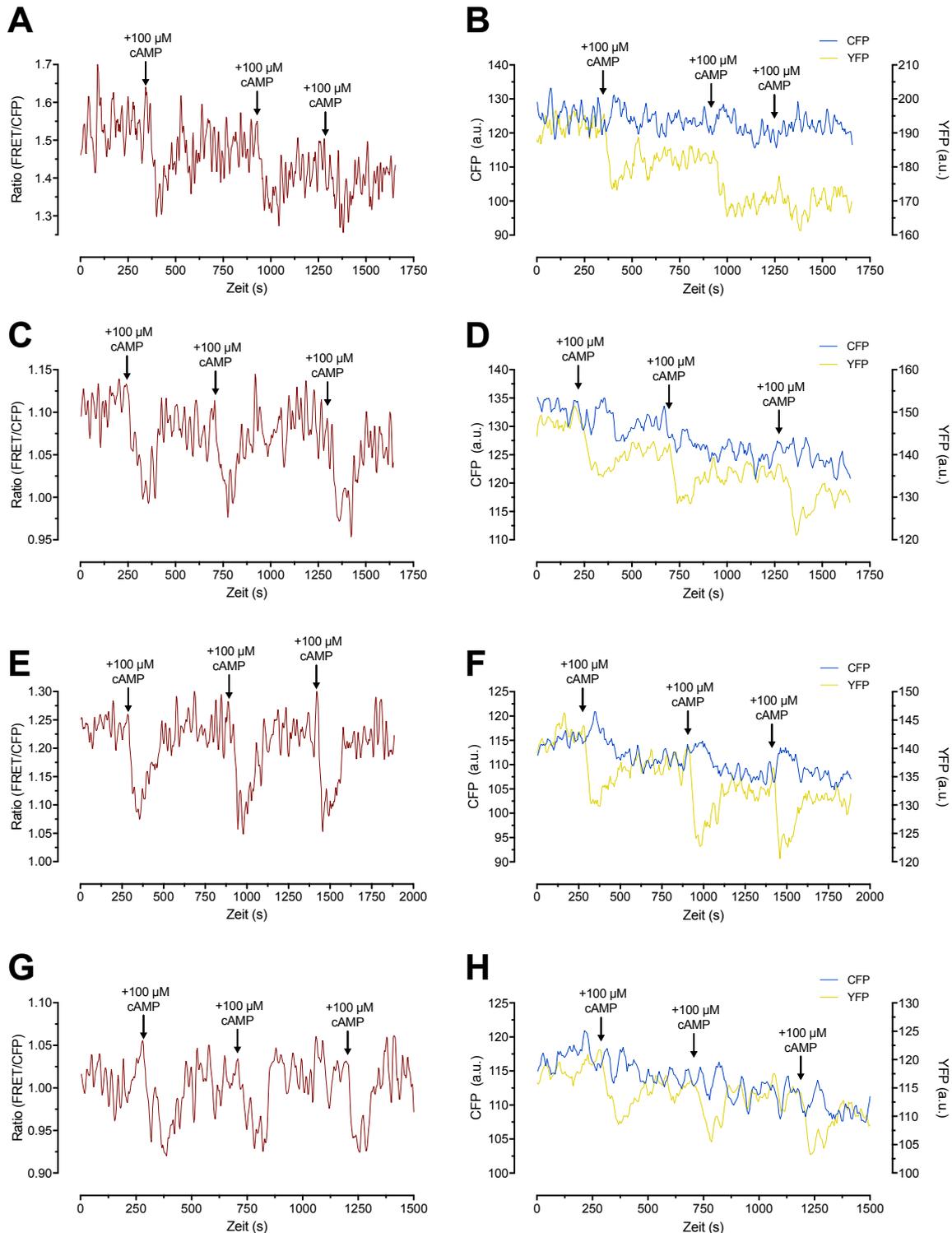


**Abb. 29** Darstellung von repräsentativen Spektren der PDE2A3. In allen Spektren sieht man einen Abfall im YFP-Peak und einen Anstieg des CFP-Peaks, welcher zum Teil nicht gut zur Darstellung kommt aufgrund der Volumenveränderungen bei jeder zusätzlichen Zugabe von cAMP. Angegeben sind molare Konzentrationen von cAMP (M). **A-H** Vor Messung wurde 30 min mit 100  $\mu$ M EHNA inkubiert. **I** Epac1-camps-PDE2A3 wurde 5 min mit 3  $\mu$ M cGMP inkubiert, danach Aufnahme der Spektren.

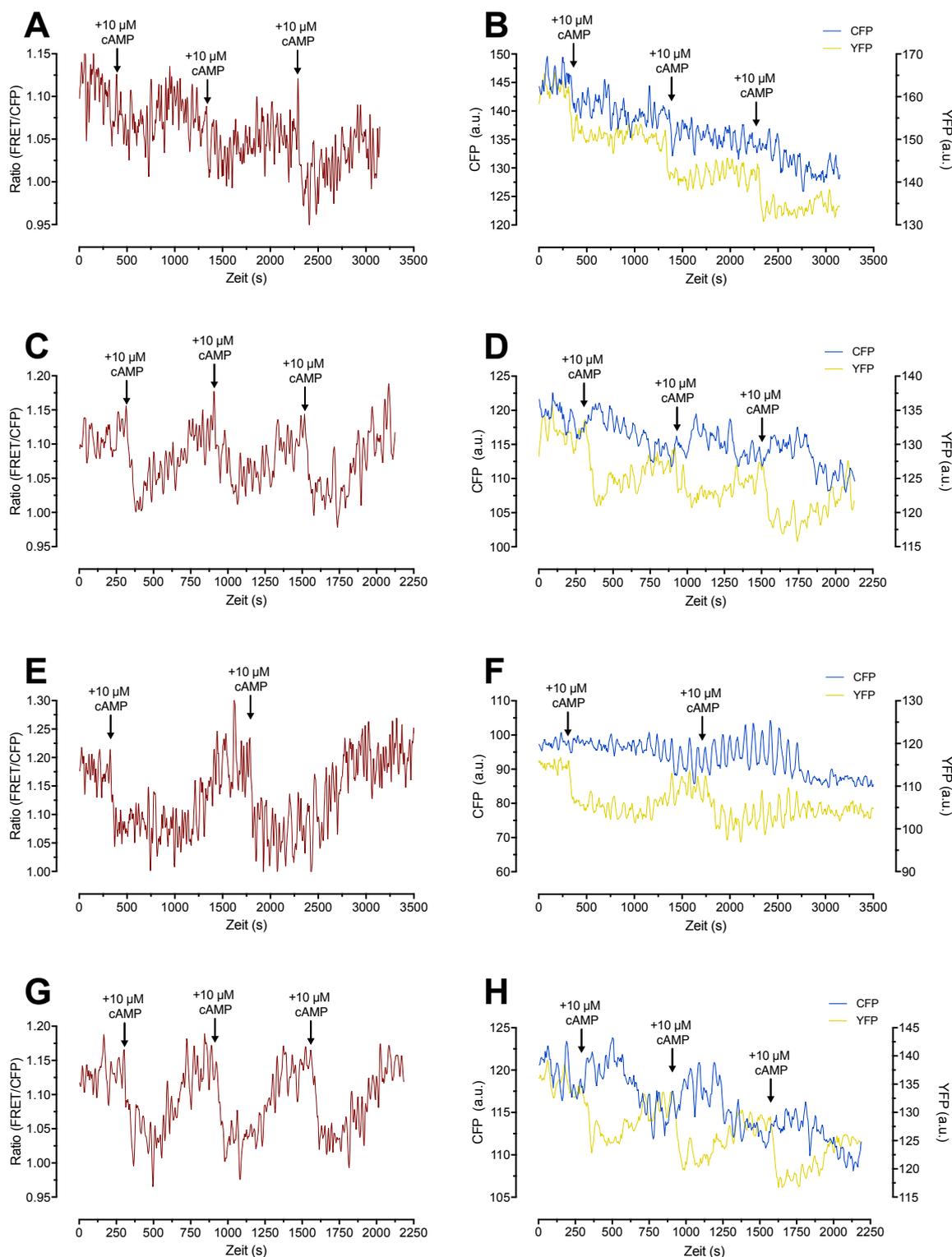


**Abb. 30** Darstellung von repräsentativen Spektren der PDE8A1. In allen Spektren sieht man einen Abfall im YFP-Peak und einen Anstieg des CFP-Peaks, welcher zum Teil nicht gut zur Darstellung kommt aufgrund der Volumenveränderungen bei jeder zusätzlichen Zugabe von cAMP. Angegeben sind molare Konzentrationen von cAMP (M).

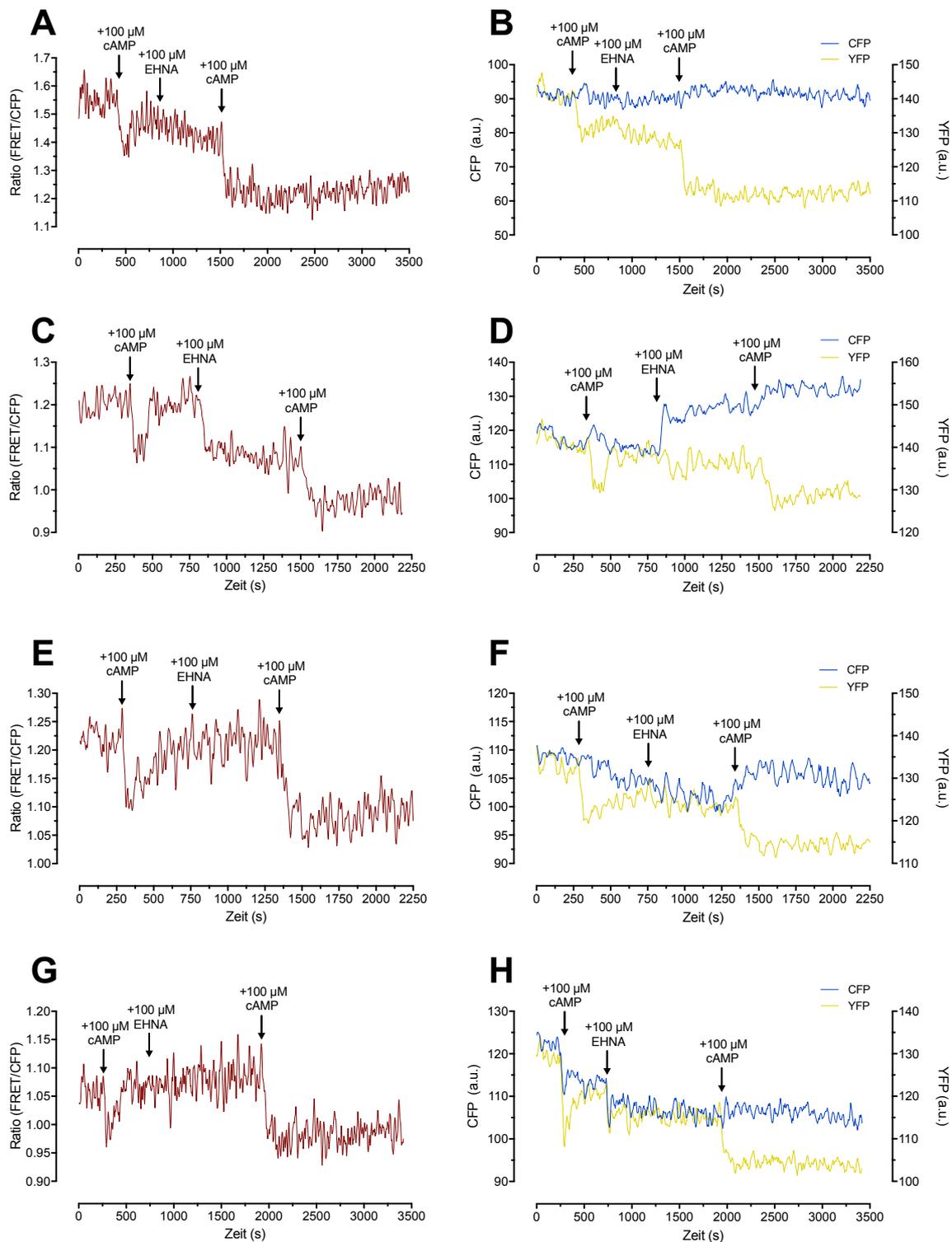
## 10.2 Ratiometrische Messungen



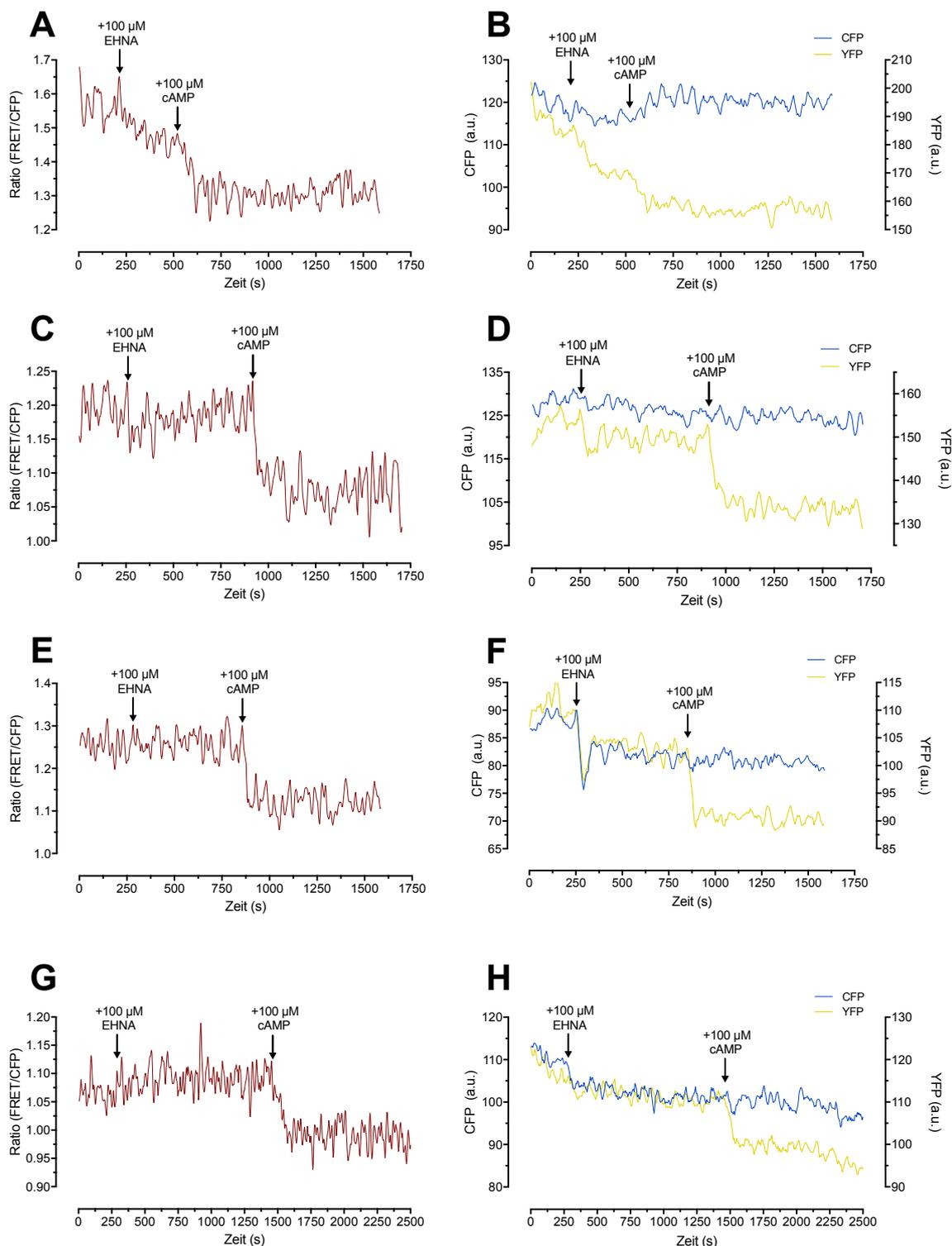
**Abb. 31 Wiederholte Stimulation der PDE2-basierten Konstrukte.** Ratiometrische Messung der zytosolischen Fraktion transfizierter HEK-TsA Zellen. **A-B** Epac1-camps-PDE2A3 **C-D** Epac1-camps-PDE2katD **E-F** Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 **G-H** Epac1-camps-SAH30-PDE2katD **A,C,E,G** Wiederholte Stimulation führt zu keiner Veränderung der Konformation des transienten FRET-Signals. Das System ist nahezu vollständig regeneriert. **B,D,F,H** Zu A,C,E,G zugehörige CFP- und YFP-Kanäle. Es handelt sich bei allen Stimulationen um ein echtes FRET-Signal.



**Abb. 32** *Wiederholte Stimulation der PDE8-basierten Konstrukte. Ratiometrische Messung der zytosolischen Fraktion transfizierter HEK-TsA Zellen. A-B Epac1-camps-PDE8A1 C-D Epac1-camps-PDE8katD E-F Epac1-camps-SAH30-PDE8A1 G-H Epac1-camps-SAH30-PDE8katD A,C,E,G Wiederholte Stimulation führt zu keiner Veränderung der Konformation des transienten FRET-Signals. Das System ist nahezu vollständig regeneriert. B,D,F,H Zu A,C,E,G zugehörige CFP- und YFP-Kanäle. Es handelt sich bei allen Stimulationen um ein echtes FRET-Signal. A-B Auffällig langsamer Abfall des FRET-Ratios nach Stimulation. E-F Extrem langsames transientes FRET-Signal.*



**Abb. 33 Spezifische Inhibition der PDE2A3-basierten Konstrukte mit EHNA I.** Ratiometrische Messung der zytosolischen Fraktion transfizierter HEK-TsA-Zellen. **A-B** Epac1-camps-PDE2A3 **C-D** Epac1-camps-PDE2katD **E-F** Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 **G-H** Epac1-camps-SAH30-PDE2katD **A,C,E,G** Stimulation des entsprechenden Konstrukts zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der PDE, danach spezifische Inhibition mit 100  $\mu$ M EHNA und erneute Stimulation mit 100  $\mu$ M cAMP. Nach Inhibition ist kein Rückgang des transienten FRET-Signals sichtbar, da die inhibierte PDE kein cAMP hydrolysiert; hierdurch Zuordnung des transienten FRET-Signals zur Hydrolyse der verwendeten PDE. **B,D,F,H** Entsprechende CFP- und YFP-Kanäle. Nach Inhibition handelt es sich auch um ein „echtes“ FRET-Signal, welches im Plateau bleibt.



**Abb. 34 Spezifische Inhibition der PDE2A3-basierten Konstrukte mit EHNA II.** Ratiometrische Messung der zytosolischen Fraktion transfizierter HEK-TsA-Zellen. **A-B** Epac1-camps-PDE2A3 **C-D** Epac1-camps-PDE2katD **E-F** Epac1-camps-SAH30-PDE2A3 **G-H** Epac1-camps-SAH30-PDE2katD **A,C,E,G** Analog zu Abb. 33, nun jedoch alleinige Inhibition mit 100 μM EHNA und erneute Stimulation mit 100 μM cAMP. Nach Inhibition ist ebenfalls kein Rückgang des transienten FRET-Signals sichtbar, da die inhibierte PDE kein cAMP hydrolysiert; hierdurch zusätzlich zu Abb. 33 Ausschluss von Verfälschung durch vorherige Stimulation. **B,D,F,H** Entsprechende CFP- und YFP-Kanäle. Nach Inhibition handelt es sich ebenfalls um ein „echtes“ FRET-Signal, welches im Plateau bleibt.

## 11 Referenzen

1. Chen, W., H. Levine, and W.J. Rappel, *A mathematical analysis of second messenger compartmentalization*. Phys Biol, 2008. **5**(4): p. 046006.
2. Zagotta, W.N., et al., *Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 200-5.
3. Lee, K.A., *Transcriptional regulation by cAMP*. Curr Opin Cell Biol, 1991. **3**(6): p. 953-9.
4. Prasad, K.N., et al., *Defects in cAMP-pathway may initiate carcinogenesis in dividing nerve cells: a review*. Apoptosis, 2003. **8**(6): p. 579-86.
5. McLeod, S.J., et al., *The Rap GTPases regulate B cell migration toward the chemokine stromal cell-derived factor-1 (CXCL12): potential role for Rap2 in promoting B cell migration*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1365-71.
6. Ozaki, N., et al., *cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(11): p. 805-11.
7. Holz, G.G., *Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell*. Diabetes, 2004. **53**(1): p. 5-13.
8. Torgersen, K.M., et al., *Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function*. Cell Signal, 2002. **14**(1): p. 1-9.
9. Nikolaev, V.O., et al., *Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37215-8.
10. Kamenetsky, M., et al., *Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems*. J Mol Biol, 2006. **362**(4): p. 623-39.
11. Cooper, D.M., *Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 517-29.
12. Walsh, D.A., J.P. Perkins, and E.G. Krebs, *An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle*. J Biol Chem, 1968. **243**(13): p. 3763-5.
13. Su, Y., et al., *Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains*. Science, 1995. **269**(5225): p. 807-13.
14. Lüllmann H, M.K., Hein L, *Taschenatlas Pharmakologie*. Hrsg. 7., vollständig überarbeitete Auflage ed. 2014, Stuttgart: Thieme.

15. Graefe K, L.W., Bönisch H, *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. Hrsg.2., vollständig überarbeitete Auflage ed. Vol. Thieme. 2016, Stuttgart.
16. Ludwig, J., et al., *Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium*. FEBS Lett, 1990. **270**(1-2): p. 24-9.
17. Wahl-Schott, C., S. Fenske, and M. Biel, *HCN channels: new roles in sinoatrial node function*. Curr Opin Pharmacol, 2014. **15**: p. 83-90.
18. Bos, J.L., *Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 733-8.
19. Brand, T., *The Popeye Domain Containing Genes and Their Function as cAMP Effector Proteins in Striated Muscle*. J Cardiovasc Dev Dis, 2018. **5**(1).
20. Reese, D.E., et al., *bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development*. Dev Biol, 1999. **209**(1): p. 159-71.
21. Andree, B., et al., *Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart*. Dev Biol, 2000. **223**(2): p. 371-82.
22. Beavo, J.A. and L.L. Brunton, *Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 710-8.
23. Houslay, M.D. and D.R. Adams, *PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 1): p. 1-18.
24. Dodge-Kafka, K.L., et al., *The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 574-8.
25. Conti, M. and J. Beavo, *Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 481-511.
26. Feinstein, W.P., et al., *Assessment of cellular mechanisms contributing to cAMP compartmentalization in pulmonary microvascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(6): p. C839-52.
27. Leroy, J., et al., *Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases*. Circ Res, 2008. **102**(9): p. 1091-100.
28. Iancu, R.V., S.W. Jones, and R.D. Harvey, *Compartmentation of cAMP signaling in cardiac myocytes: a computational study*. Biophys J, 2007. **92**(9): p. 3317-31.

29. Terrin, A., et al., *PGE(1) stimulation of HEK293 cells generates multiple contiguous domains with different [cAMP]: role of compartmentalized phosphodiesterases*. J Cell Biol, 2006. **175**(3): p. 441-51.
30. Chen, W., H. Levine, and W.J. Rappel, *Compartmentalization of second messengers in neurons: a mathematical analysis*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2009. **80**(4 Pt 1): p. 041901.
31. Shcherbakova, O.G., et al., *Organization of beta-adrenoceptor signaling compartments by sympathetic innervation of cardiac myocytes*. J Cell Biol, 2007. **176**(4): p. 521-33.
32. Stangherlin, A. and M. Zaccolo, *cGMP-cAMP interplay in cardiac myocytes: a local affair with far-reaching consequences for heart function*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(1): p. 11-4.
33. Cooper, D.M. and V.G. Tabbasum, *Adenylate cyclase-centred microdomains*. Biochem J, 2014. **462**(2): p. 199-213.
34. Froese, A. and V.O. Nikolaev, *Imaging alterations of cardiomyocyte cAMP microdomains in disease*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 172.
35. Mika, D., et al., *PDEs create local domains of cAMP signaling*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(2): p. 323-9.
36. Maiellaro, I., et al., *cAMP Signals in Drosophila Motor Neurons Are Confined to Single Synaptic Boutons*. Cell Rep, 2016. **17**(5): p. 1238-1246.
37. Tasken, K. and E.M. Aandahl, *Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 137-67.
38. Lohse, C., et al., *Experimental and mathematical analysis of cAMP nanodomains*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0174856.
39. Jurevicius, J. and R. Fischmeister, *cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by beta-adrenergic agonists*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 295-9.
40. Buxton, I.L. and L.L. Brunton, *Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes*. J Biol Chem, 1983. **258**(17): p. 10233-9.
41. Schrader, J. and E. Gerlach, *Compartmentation of cardiac adenine nucleotides and formation of adenosine*. Pflugers Arch, 1976. **367**(2): p. 129-35.
42. Fell, D.A., *Theoretical analyses of the functioning of the high- and low-K<sub>m</sub> cyclic nucleotide phosphodiesterases in the regulation of the concentration of*

- adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in animal cells*. J Theor Biol, 1980. **84**(2): p. 361-85.
43. Brunton, L.L., J.S. Hayes, and S.E. Mayer, *Functional compartmentation of cyclic AMP and protein kinase in heart*. Adv Cyclic Nucleotide Res, 1981. **14**: p. 391-7.
44. Hayes, J.S. and L.L. Brunton, *Functional compartments in cyclic nucleotide action*. J Cyclic Nucleotide Res, 1982. **8**(1): p. 1-16.
45. Corbin, J.D., et al., *Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue*. J Biol Chem, 1977. **252**(11): p. 3854-61.
46. Zaccolo, M., *Phosphodiesterases and compartmentalized cAMP signalling in the heart*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(7): p. 693-7.
47. Colledge, M. and J.D. Scott, *AKAPs: from structure to function*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(6): p. 216-21.
48. Langeberg, L.K. and J.D. Scott, *A-kinase-anchoring proteins*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 15): p. 3217-20.
49. Sutherland, E.W. and T.W. Rall, *Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles*. J Biol Chem, 1958. **232**(2): p. 1077-91.
50. Rall, T.W. and E.W. Sutherland, *Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles*. J Biol Chem, 1958. **232**(2): p. 1065-76.
51. Rich, T.C., et al., *Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion*. J Gen Physiol, 2000. **116**(2): p. 147-61.
52. Rich, T.C., et al., *A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13049-54.
53. Blackman, B.E., et al., *PDE4D and PDE4B function in distinct subcellular compartments in mouse embryonic fibroblasts*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 12590-601.
54. Jurevicius, J., V.A. Skeberdis, and R. Fischmeister, *Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cAMP compartmentation following beta2-adrenergic stimulation of ICa,L in frog ventricular myocytes*. J Physiol, 2003. **551**(Pt 1): p. 239-52.

55. Mongillo, M., et al., *Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases*. *Circ Res*, 2004. **95**(1): p. 67-75.
56. Rochais, F., et al., *A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes*. *Circ Res*, 2006. **98**(8): p. 1081-8.
57. Sayner, S.L., et al., *Soluble adenylyl cyclase reveals the significance of cAMP compartmentation on pulmonary microvascular endothelial cell barrier*. *Circ Res*, 2006. **98**(5): p. 675-81.
58. Warriar, S., et al., *cAMP microdomains and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in guinea-pig ventricular myocytes*. *J Physiol*, 2007. **580**(Pt.3): p. 765-76.
59. Willoughby, D., et al., *An anchored PKA and PDE4 complex regulates subplasmalemmal cAMP dynamics*. *EMBO J*, 2006. **25**(10): p. 2051-61.
60. Mongillo, M., et al., *Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway*. *Circ Res*, 2006. **98**(2): p. 226-34.
61. Calebiro, D. and I. Maiellaro, *cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 350.
62. Yang, P.C., et al., *A Computational Modeling and Simulation Approach to Investigate Mechanisms of Subcellular cAMP Compartmentation*. *PLoS Comput Biol*, 2016. **12**(7): p. e1005005.
63. Brunton, L.L., *PDE4: arrested at the border*. *Sci STKE*, 2003. **2003**(204): p. PE44.
64. Fischmeister, R., et al., *Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases*. *Circ Res*, 2006. **99**(8): p. 816-28.
65. Neves, S.R., et al., *Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks*. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 666-80.
66. Oliveira, R.F., et al., *The role of type 4 phosphodiesterases in generating microdomains of cAMP: large scale stochastic simulations*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11725.
67. Zaccolo, M. and T. Pozzan, *Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes*. *Science*, 2002. **295**(5560): p. 1711-5.

68. Agarwal, S.R., C.E. Clancy, and R.D. Harvey, *Mechanisms Restricting Diffusion of Intracellular cAMP*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19577.
69. Bender, A.T. and J.A. Beavo, *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 488-520.
70. Conti, M., *Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(9): p. 1317-27.
71. Piper, M., F. van Horck, and C. Holt, *The role of cyclic nucleotides in axon guidance*. Adv Exp Med Biol, 2007. **621**: p. 134-43.
72. Boolell, M., et al., *Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction*. Int J Impot Res, 1996. **8**(2): p. 47-52.
73. Martinez, F.J., et al., *Effect of roflumilast on exacerbations in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease uncontrolled by combination therapy (REACT): a multicentre randomised controlled trial*. Lancet, 2015. **385**(9971): p. 857-66.
74. Vogelmeier, C.B., R.; Burghuber, O.; Criée, C.-P.; Ewig, S.; Godnic-Cvar, J.; Hartl, S.; Herth, F.; Kardos, P.; Kenn, K.; Nowak, D.; Rabe, K.F.; Studnicka, M.; Watz, H.; Welte, T.; Windisch, W.; Worth, H. *S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD)*. 2018; Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/020-006l\\_S2k\\_COPD\\_chronisch-obstruktive-Lungenerkrankung\\_2018-01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-006l_S2k_COPD_chronisch-obstruktive-Lungenerkrankung_2018-01.pdf).
75. Movsesian, M.A., *Cyclic AMP-mediated signal transduction in heart failure: molecular pathophysiology and therapeutic implications*. J Investig Med, 1997. **45**(8): p. 432-40.
76. Baim, D.S., et al., *Evaluation of a new bipyridine inotropic agent--milrinone--in patients with severe congestive heart failure*. N Engl J Med, 1983. **309**(13): p. 748-56.
77. Maskin, C.S., et al., *Sustained hemodynamic and clinical effects of a new cardiotonic agent, WIN 47203, in patients with severe congestive heart failure*. Circulation, 1983. **67**(5): p. 1065-70.
78. Jaski, B.E., et al., *Positive inotropic and vasodilator actions of milrinone in patients with severe congestive heart failure. Dose-response relationships and comparison to nitroprusside*. J Clin Invest, 1985. **75**(2): p. 643-9.
79. Packer, M., et al., *Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group*. N Engl J Med, 1991. **325**(21): p. 1468-75.

80. Cuffe, M.S., et al., *Short-term intravenous milrinone for acute exacerbation of chronic heart failure: a randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **287**(12): p. 1541-7.
81. Joseph, S.M., et al., *Acute decompensated heart failure: contemporary medical management*. Tex Heart Inst J, 2009. **36**(6): p. 510-20.
82. Abraham, W.T., et al., *In-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure requiring intravenous vasoactive medications: an analysis from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE)*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(1): p. 57-64.
83. Kokkonen, K. and D.A. Kass, *Nanodomain Regulation of Cardiac Cyclic Nucleotide Signaling by Phosphodiesterases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2017. **57**: p. 455-479.
84. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
85. Tsai, E.J. and D.A. Kass, *Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics*. Pharmacol Ther, 2009. **122**(3): p. 216-38.
86. Boerrigter, G., H. Lapp, and J.C. Burnett, *Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 485-506.
87. Massion, P.B., et al., *Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2005. **142**(2): p. 144-50.
88. Hammond, J. and J.L. Balligand, *Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(2): p. 330-40.
89. Zaccolo, M. and M.A. Movsesian, *cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology*. Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1569-78.
90. Zhao, C.Y., J.L. Greenstein, and R.L. Winslow, *Roles of phosphodiesterases in the regulation of the cardiac cyclic nucleotide cross-talk signaling network*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **91**: p. 215-27.
91. Mehel, H., et al., *Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(17): p. 1596-606.
92. Zoccarato, A., et al., *Cardiac Hypertrophy Is Inhibited by a Local Pool of cAMP Regulated by Phosphodiesterase 2*. Circ Res, 2015. **117**(8): p. 707-19.

93. Baliga, R.S., et al., *Phosphodiesterase 2 inhibition preferentially promotes NO/guanylyl cyclase/cGMP signaling to reverse the development of heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(31): p. E7428-E7437.
94. Osadchii, O.E., *Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease*. Cardiovasc Drugs Ther, 2007. **21**(3): p. 171-94.
95. Patrucco, E., et al., *Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(2): p. 330-3.
96. Blair, C.M., et al., *Targeting B-Raf inhibitor resistant melanoma with novel cell penetrating peptide disrupters of PDE8A - C-Raf*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 266.
97. Chimienti, F., et al., *Brain region-specific alterations of RNA editing in PDE8A mRNA in suicide decedents*. Transl Psychiatry, 2019. **9**(1): p. 91.
98. Chimienti, F., et al., *Correction: Brain region-specific alterations of RNA editing in PDE8A mRNA in suicide decedents*. Transl Psychiatry, 2019. **9**(1): p. 112.
99. Johnstone, T.B., et al., *PDE8 Is Expressed in Human Airway Smooth Muscle and Selectively Regulates cAMP Signaling by beta2-Adrenergic Receptors and Adenylyl Cyclase 6*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018. **58**(4): p. 530-541.
100. Booiman, T., et al., *Phosphodiesterase 8a supports HIV-1 replication in macrophages at the level of reverse transcription*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109673.
101. Vang, A.G., et al., *Differential Expression and Function of PDE8 and PDE4 in Effector T cells: Implications for PDE8 as a Drug Target in Inflammation*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 259.
102. Huang, X., et al., *Inhibition of phosphodiesterase 2 reverses gp91phox oxidase-mediated depression- and anxiety-like behavior*. Neuropharmacology, 2018. **143**: p. 176-185.
103. Maurin, T. and B. Bardoni, *Fragile X Mental Retardation Protein: To Be or Not to Be a Translational Enhancer*. Front Mol Biosci, 2018. **5**: p. 113.
104. Wang, H., et al., *Kinetic and structural studies of phosphodiesterase-8A and implication on the inhibitor selectivity*. Biochemistry, 2008. **47**(48): p. 12760-8.
105. Yan, Z., et al., *Refolding and kinetic characterization of the phosphodiesterase-8A catalytic domain*. Protein Expr Purif, 2009. **64**(1): p. 82-8.

106. Martins, T.J., M.C. Mumby, and J.A. Beavo, *Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues*. J Biol Chem, 1982. **257**(4): p. 1973-9.
107. Rosman, G.J., et al., *Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Gene, 1997. **191**(1): p. 89-95.
108. Chambers, R.J., et al., *A new chemical tool for exploring the physiological function of the PDE2 isozyme*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. **16**(2): p. 307-10.
109. Aravind, L. and C.P. Ponting, *The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(12): p. 458-9.
110. Anantharaman, V., E.V. Koonin, and L. Aravind, *Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains*. J Mol Biol, 2001. **307**(5): p. 1271-92.
111. Heikaus, C.C., J. Pandit, and R.E. Klevit, *Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights*. Structure, 2009. **17**(12): p. 1551-1557.
112. Martinez, S.E., et al., *Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 3082-7.
113. Martinez, S.E., J.A. Beavo, and W.G. Hol, *GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides*. Mol Interv, 2002. **2**(5): p. 317-23.
114. Martinez, S.E., et al., *The structure of the GAF A domain from phosphodiesterase 6C reveals determinants of cGMP binding, a conserved binding surface, and a large cGMP-dependent conformational change*. J Biol Chem, 2008. **283**(38): p. 25913-9.
115. Martinez, S.E., et al., *The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13260-5.
116. Pandit, J., et al., *Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(43): p. 18225-30.
117. Podzuweit, T., P. Nennstiel, and A. Muller, *Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine*. Cell Signal, 1995. **7**(7): p. 733-8.

118. Mumby, M.C., et al., *Identification of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase in lung tissue with monoclonal antibodies*. J Biol Chem, 1982. **257**(22): p. 13283-90.
119. Noyama, K. and S. Maekawa, *Localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 2 in the brain-derived Triton-insoluble low-density fraction (raft)*. Neurosci Res, 2003. **45**(2): p. 141-8.
120. Michie, A.M., et al., *Rapid regulation of PDE-2 and PDE-4 cyclic AMP phosphodiesterase activity following ligation of the T cell antigen receptor on thymocytes: analysis using the selective inhibitors erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine (EHNA) and rolipram*. Cell Signal, 1996. **8**(2): p. 97-110.
121. Surapisitchat, J., et al., *Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3*. Circ Res, 2007. **101**(8): p. 811-8.
122. Yamamoto, T., V.C. Manganiello, and M. Vaughan, *Purification and characterization of cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from calf liver. Effects of divalent cations on activity*. J Biol Chem, 1983. **258**(20): p. 12526-33.
123. Soderling, S.H., S.J. Bayuga, and J.A. Beavo, *Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8991-6.
124. Fisher, D.A., et al., *Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**(3): p. 570-7.
125. Wang, P., et al., *Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution*. Gene, 2001. **280**(1-2): p. 183-94.
126. Huang, Z.J., I. Ederly, and M. Rosbash, *PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors*. Nature, 1993. **364**(6434): p. 259-62.
127. Nambu, J.R., et al., *The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1157-67.
128. Pao, G.M. and M.H. Saier, Jr., *Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution*. J Mol Evol, 1995. **40**(2): p. 136-54.
129. De Cesare, D. and P. Sassone-Corsi, *Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2000. **64**: p. 343-69.

130. Shikama, N., et al., *Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8933-43.
131. Conti, M. and S.L. Jin, *The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1999. **63**: p. 1-38.
132. Rybalkin, S.D., T.R. Hinds, and J.A. Beavo, *Enzyme assays for cGMP hydrolyzing phosphodiesterases*. Methods Mol Biol, 2013. **1020**: p. 51-62.
133. Soderling, S.H. and J.A. Beavo, *Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(2): p. 174-9.
134. Vang, A.G., et al., *PDE8 regulates rapid Teff cell adhesion and proliferation independent of ICER*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12011.
135. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **437**(1-2): p. 55-75.
136. Piston, D.W. and G.J. Kremers, *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(9): p. 407-14.
137. Herget, S., M.J. Lohse, and V.O. Nikolaev, *Real-time monitoring of phosphodiesterase inhibition in intact cells*. Cell Signal, 2008. **20**(8): p. 1423-31.
138. Sivaramakrishnan, S., et al., *Dynamic charge interactions create surprising rigidity in the ER/K alpha-helical protein motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13356-61.
139. Sivaramakrishnan, S. and J.A. Spudich, *Systematic control of protein interaction using a modular ER/K alpha-helix linker*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20467-72.
140. Sivaramakrishnan, S., et al., *Combining single-molecule optical trapping and small-angle x-ray scattering measurements to compute the persistence length of a protein ER/K alpha-helix*. Biophys J, 2009. **97**(11): p. 2993-9.
141. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology, 1973. **52**(2): p. 456-67.
142. BioLabs, N.E. *NEBcloner® v1.3.13*. 2019 2014-2018 [cited 2019 July 31]; Available from: <https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>.
143. Chen, I. and D. Dubnau, *DNA uptake during bacterial transformation*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(3): p. 241-9.

144. Angers-Loustau, A., J. Rainy, and K. Wartiovaara, *PlasmaDNA: a free, cross-platform plasmid manipulation program for molecular biology laboratories*. BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 77.
145. Wang, H., et al., *Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors*. Biochem J, 2007. **408**(2): p. 193-201.
146. Erneux, C., et al., *The binding of cyclic nucleotide analogs to a purified cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase from bovine adrenal tissue*. J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res, 1985. **10**(5): p. 463-72.
147. Gamanuma, M., et al., *Comparison of enzymatic characterization and gene organization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family in humans*. Cell Signal, 2003. **15**(6): p. 565-74.
148. Zhong, Q., et al., *FCPR16, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, produces an antidepressant-like effect in mice exposed to chronic unpredictable mild stress*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2019. **90**: p. 62-75.
149. Liu, L., et al., *The neuroprotective and antidepressant-like effects of Hcyb1, a novel selective PDE2 inhibitor*. CNS Neurosci Ther, 2018. **24**(7): p. 652-660.
150. El-Haggar, S.M., et al., *The Phosphodiesterase Inhibitor Pentoxifylline as a Novel Adjunct to Antidepressants in Major Depressive Disorder Patients: A Proof-of-Concept, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. Psychother Psychosom, 2018. **87**(6): p. 331-339.
151. Prickaerts, J., P.R.A. Heckman, and A. Blokland, *Investigational phosphodiesterase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease*. Expert Opin Investig Drugs, 2017. **26**(9): p. 1033-1048.
152. Wu, Y., et al., *Novel Phosphodiesterase Inhibitors for Cognitive Improvement in Alzheimer's Disease*. J Med Chem, 2018. **61**(13): p. 5467-5483.
153. Hu, J., et al., *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Dual-Target Inhibitors of Acetylcholinesterase (AChE) and Phosphodiesterase 9A (PDE9A) for the Treatment of Alzheimer's Disease*. ACS Chem Neurosci, 2019. **10**(1): p. 537-551.
154. Jankowska, A., et al., *Multifunctional Ligands Targeting Phosphodiesterase as the Future Strategy for the Symptomatic and Disease-Modifying Treatment of Alzheimer's Disease*. Curr Med Chem, 2019.
155. Wu, Y., et al., *Discovery of Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitors against Phosphodiesterase-9, a Novel Target for the Treatment of Vascular Dementia*. J Med Chem, 2019. **62**(8): p. 4218-4224.

156. Mehta, A. and B.M. Patel, *Therapeutic opportunities in colon cancer: Focus on phosphodiesterase inhibitors*. Life Sci, 2019. **230**: p. 150-161.
157. Amsallem, E., et al., *Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(1): p. CD002230.
158. Perera, R.K. and V.O. Nikolaev, *Compartmentation of cAMP signalling in cardiomyocytes in health and disease*. Acta Physiol (Oxf), 2013. **207**(4): p. 650-62.
159. Guellich, A., H. Mehel, and R. Fischmeister, *Cyclic AMP synthesis and hydrolysis in the normal and failing heart*. Pflugers Arch, 2014. **466**(6): p. 1163-75.
160. Tang, X., et al., *Milrinone for the Treatment of Acute Heart Failure After Acute Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015. **117**(3): p. 186-94.
161. Bobin, P., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective*. Arch Cardiovasc Dis, 2016. **109**(6-7): p. 431-43.
162. Zhu, J., et al., *X-ray crystal structure of phosphodiesterase 2 in complex with a highly selective, nanomolar inhibitor reveals a binding-induced pocket important for selectivity*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(32): p. 11708-11.
163. Castro, L.R., et al., *Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons*. J Neurosci, 2010. **30**(17): p. 6143-51.
164. Sprenger, J.U., et al., *In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6965.
165. Koschinski, A. and M. Zaccolo, *Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14090.
166. Beavo, J.A., P.J. Bechtel, and E.G. Krebs, *Activation of protein kinase by physiological concentrations of cyclic AMP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(9): p. 3580-3.
167. Terasaki, W.L. and G. Brooker, *Cardiac adenosine 3':5'-monophosphate. Free and bound forms in the isolated rat atrium*. J Biol Chem, 1977. **252**(3): p. 1041-50.
168. Kameyama, M., F. Hofmann, and W. Trautwein, *On the mechanism of beta-adrenergic regulation of the Ca channel in the guinea-pig heart*. Pflugers Arch, 1985. **405**(3): p. 285-93.

169. Borner, S., et al., *FRET measurements of intracellular cAMP concentrations and cAMP analog permeability in intact cells*. Nat Protoc, 2011. **6**(4): p. 427-38.

## 12 Danksagung

Hiermit möchte ich meinen Dank allen Personen aussprechen, die mich während des gesamten Prozesses der Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zu Beginn möchte ich Prof. Dr. Martin J. Lohse danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Thema zu forschen und mich motiviert und bestätigt hat, auch über den Rahmen der Promotion hinaus weiterhin in der biomedizinischen Grundlagenforschung zu arbeiten.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Dr. Andreas Bock, der mir immer bei allen Problemen und Fragen zur Seite stand, mir eine Vielzahl an Methoden beibrachte und mir jede Freiheit gegeben hat, das Projekt auszuweiten und den Fokus auf meine eigenen Interessensgebiete zu legen.

Ich danke der gesamten AG Lohse, die mich sofort herzlich aufgenommen hat, mich täglich motivierte und immer bei Problemen unterstützte. Hervorzuheben sind vor allem Annette Hannawacker, die mich hervorragend in der Zellkultur unterwies und Dr. Ulrike Zabel, die mir bei allen Schwierigkeiten und Problemen beim Klonieren sofort zur Seite stand. Aber ein großes Dankeschön geht auch an alle anderen Mitglieder der AG Lohse, wie auch weiteren Mitarbeiter des Instituts für Pharmakologie, die meine Zeit absolut bereicherten.

Ferner danke ich der Graduate School of Life Sciences (GSLs), Würzburg, vor allem für die lehrreichen Seminare, als auch für das Netzwerk an medizinischen und naturwissenschaftlichen Doktoranden, welches durch die GSLs aufgebaut wurde.

Abschließend gebührt ebenso großer Dank sowohl Antonin Kayser als auch meinem Bruder und vor allem meinen Eltern, die mich alle zu jeder Zeit unterstützt haben, mir Zuspruch gaben und mich immer motivierten, meinen Weg zu gehen, sowohl in der Phase der Promotion als auch während meines gesamten Studiums.

## 13 Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Biochemical Characterization of cAMP Gradients – Influence of Phosphodiesterases” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as a part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

## 14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Biochemische Charakterisierung von cAMP-Gradienten – Einfluss von Phosphodiesterasen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

**15 CV**