

FUNKTIONELLE ANALYSE DER  
PHOTOAKTIVIERTEN ADENYLATZYKLASE (PAC)  
AUS *Euglena gracilis*



Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von:

**JENS LOOSER**

geboren in TETTANANG

Würzburg 2010

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Gutachter: Prof. Dr. Georg Nagel

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Euglena gracilis</i> . . . . .	1
1.2	Zyklische Nukleotide . . . . .	2
1.2.1	Übersicht . . . . .	2
1.2.2	Zyklische Nukleotide in Pflanzen . . . . .	4
1.3	Adenylatzyklen . . . . .	6
1.3.1	Übersicht . . . . .	6
1.3.2	Klasse III Adenylatzyklen . . . . .	7
1.4	PAC – Photoaktivierte Adenylatzyklase . . . . .	10
1.5	Ziel der Arbeit . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Arbeiten mit Bakterien . . . . .	16
2.1.1	Kultur der Bakterien . . . . .	16
2.1.2	Transformation und Selektion . . . . .	16
2.1.3	Plasmidisolierung . . . . .	17
2.1.4	Kryokonservierung . . . . .	18
2.2	Arbeiten mit Nucleinsäuren . . . . .	18
2.2.1	Restriktion . . . . .	18
2.2.2	Ligation . . . . .	19
2.2.3	Gelelektrophorese . . . . .	19
2.2.4	DNA-Extraktion aus Agarosegelen . . . . .	21
2.2.5	PCR – Polymerase Kettenreaktion . . . . .	22
2.2.6	Gerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese . . . . .	23

---

2.2.7	IVT – <i>in vitro</i> Transkription . . . . .	23
2.3	Herstellung der PAC-Fusionsproteine, -Mutanten und -Chimären . . . . .	25
2.3.1	PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ -Knockoutmutanten . . . . .	25
2.3.2	Fusionsprotein aus PAC $\alpha$ und CNGA2 . . . . .	27
2.3.3	PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären . . . . .	28
2.3.4	Domänen-Deletionsmutanten in PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ . . . . .	29
2.3.5	Austausch der Zyklase-Domänen . . . . .	29
2.3.6	Veränderung der Substratspezifität von PAC $\alpha$ . . . . .	30
2.4	Arbeiten mit Oocyten . . . . .	32
2.4.1	Operative Entnahme und Injektion . . . . .	32
2.4.2	Belichtung der Oocyten . . . . .	33
2.5	Elektrophysiologische Messungen . . . . .	35
2.5.1	Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik . . . . .	35
2.5.2	Konventionen . . . . .	36
2.5.3	Elektroden . . . . .	36
2.5.4	Elektrophysiologische Bestimmung der Zyklaseaktivität . . . . .	37
2.6	Immunologische cAMP/cGMP-Bestimmung . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Lichtabhängigkeit und Kinetik von PAC $\alpha$ . . . . .	43
3.1.1	Zyklaseaktivität von PAC $\alpha$ in Abhängigkeit der Lichtintensität . . . . .	43
3.1.2	Kinetik der PAC $\alpha$ -Aktivität . . . . .	44
3.2	PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ - Knockoutmutanten . . . . .	46
3.3	Dimerisierung von PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ . . . . .	48
3.4	Austausch der Zyklasedomänen . . . . .	53
3.4.1	Austausch mit GCY-35 . . . . .	53

---

3.4.2	Austausch mit GCY-35 und GCY-36 . . . . .	56
3.5	Fusionsprotein aus PAC $\alpha$ und CNGA2 . . . . .	57
3.5.1	N-terminale Fusion von CNGA2 an PAC $\alpha$ . . . . .	57
3.5.2	Einfügen eines Linkerpeptids zwischen CNGA2 und PAC $\alpha$ . . . . .	59
3.5.3	C-terminale Fusion von CNGA2 an PAC $\alpha$ . . . . .	60
3.6	Domänen-Deletionsmutanten in PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ . . . . .	60
3.6.1	Deletion des C-Terminus . . . . .	60
3.6.2	Deletion der F2-Domäne . . . . .	61
3.7	PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären . . . . .	62
3.8	Veränderung der Substratspezifität von PAC $\alpha$ . . . . .	64
3.8.1	Bestimmung der zu mutierenden Aminosäuren . . . . .	64
3.8.2	PAC $\alpha$ K250E D317C und PAC $\alpha$ K660E E729C . . . . .	65
3.8.3	PAC $\alpha$ K250E T319C und PAC $\alpha$ K660E E729R . . . . .	67
3.8.4	PAC $\alpha$ K250E D317C E729R und PAC $\alpha$ K250E T319C E729R . . . . .	68
3.8.5	Tripelmutante PAC $\alpha$ K250E T319G S329Y . . . . .	69
3.8.6	Quadrupelmutante PAC $\alpha$ K250E D317K T319G S329Y . . . . .	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>75</b>
4.1	Lichtabhängigkeit und Kinetik von PAC $\alpha$ . . . . .	75
4.1.1	Abhängigkeit der Zyklyaseaktivität von der Lichtintensität . . . . .	75
4.1.2	Kinetik . . . . .	76
4.2	Knockoutmutanten . . . . .	77
4.3	Dimerisierung . . . . .	78
4.4	Austausch der Zyklysedomänen . . . . .	80
4.5	Fusionsprotein PAC CNG . . . . .	83

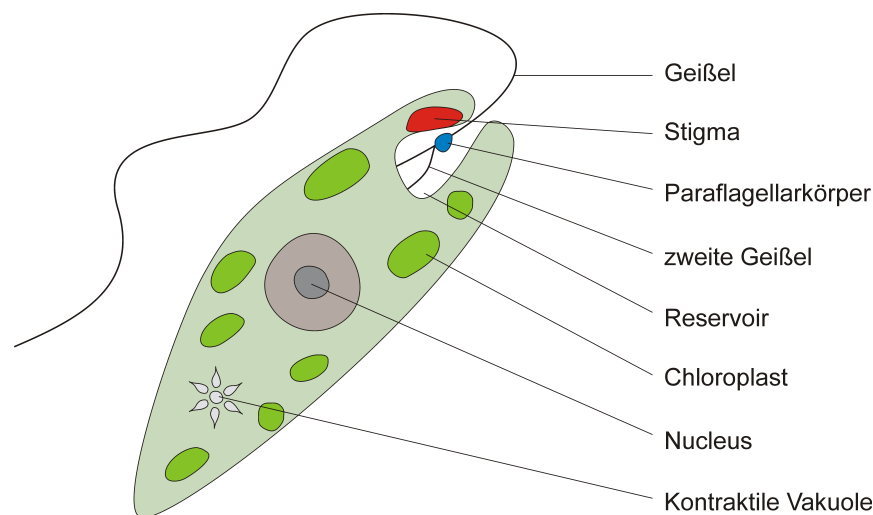
---

4.6	Domänen-Deletionsmutanten . . . . .	85
4.6.1	Deletion der F2-Domäne . . . . .	85
4.6.2	Deletion des C-Terminus . . . . .	87
4.7	PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären . . . . .	88
4.8	Veränderung der Substratspezifität . . . . .	89
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>96</b>
	<b>Literatur</b>	<b>I</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XII</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XIV</b>
	<b>Nukleotidsequenzen</b>	<b>XVII</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Euglena gracilis*

Der Flagellat *Euglena gracilis* („schlankes Augentierchen“) ist eine frei schwimmende Süßwasseralege und gehört zu den Eukaryoten. Er besitzt mehrere Chloroplasten und ist in der Lage, sich sowohl autotroph als auch heterotroph zu ernähren. *Euglena* besteht aus einer einzelnen ca. 50 µm langen Zelle mit einem Durchmesser von ca. 10 µm, besitzt einen Zellkern und eine kontraktile Vakuole zur Osmoregulation (siehe Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des Flagellaten *Euglena gracilis*. Dargestellt sind die Geißel zur Fortbewegung sowie die zweite Geißel, die noch innerhalb des Reservoirs endet, Chloroplasten, Nucleus, kontraktile Vakuole und der Paraflagellarkörper, der mit dem Stigma die Bestimmung der Lichtrichtung ermöglicht.

Zur Fortbewegung dient eine Geißel, welche aus einer Reservoir genannten Vertiefung in der Plasmamembran am vorderen Ende der Zelle entspringt. *Euglena* besitzt eine zweite Geißel, welche sich aber noch innerhalb des Reservoirs mit der Motorgeißel vereint. Direkt darüber befindet sich eine Verdickung an der Motorgeißel, der Paraflagellarkörper. Dies ist ein kristalliner Komplex innerhalb der Geißelmembran (Wolken, 1977; Piccini & Mammi,

1978).

Ebenfalls auf dieser Höhe befindet sich das früher als Augenfleck bezeichnete Stigma: eine Ansammlung von membranumschlossenen Vesikeln, die mit Carotinoiden gefüllt sind (Batra & Tollin, 1964; Bartlett *et al.*, 1972). Das Zusammenwirken von Stigma und dem Paraflagellarkörper ermöglicht die Phototaxis. Der eigentliche Photorezeptor befindet sich im Paraflagellarkörper, während das Stigma den Photorezeptor, je nach Orientierung zum Licht, mehr oder weniger stark abschirmt (Lebert & Hader, 1997). Durch eine Rotation um die Längsachse während der Fortbewegung ist *Euglena* somit in der Lage, die Richtung des einfallendes Lichts zu bestimmen.

Desweiteren zeigt *Euglena* eine phobische Reaktion, sowohl wenn die Lichtintensität stark zunimmt, als auch wenn sie stark abnimmt. Hierbei verändert sich der Geißelschlag und die Zelle beginnt eine Taumelbewegung senkrecht zur Längsachse. Iseki *et al.* (2002) zeigten, dass es sich bei dem Protein, das für die photophobische Reaktion nach einem Anstieg der Lichtintensität verantwortlich ist, um die Photoaktivierte Adenylatzyklase (PAC) handelt. PAC ist außerdem an der positiven und der negativen Phototaxis beteiligt, nicht jedoch an der photophobischen Reaktion bei einer starken Abnahme der Lichtintensität (Ntefidou *et al.*, 2003).

## 1.2 Zyklische Nukleotide

### 1.2.1 Übersicht

In mehrzelligen Organismen stellen zyklische Nukleotide wichtige sekundäre Botenstoffe dar. Zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) ist als sekundärer Botenstoff an verschiedenen Signalwegen beteiligt, bei denen auch die Proteinkinase A eine wichtige Rolle spielt. An erster Stelle in einem solchen Signalweg stehen G-Protein gekoppelte Rezeptoren,



die das Signal von außen wahrnehmen. Die Rezeptoren gehören zur Familie der Sieben-Transmembrandomänen-Proteine und sind unter anderem an der Wahrnehmung von Hormonen oder Licht beteiligt. Nachdem der Rezeptor aktiviert wurde, vollzieht er eine Konformationsänderung, woraufhin das an den Rezeptor gebundene heterotrimere G-Protein dissoziiert.

Die G-Proteinuntereinheit  $G_{\alpha}$  kann daraufhin an eine membrangebundene Adenylatzyklase binden, welche dann die Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) in cAMP katalysiert. Das cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA), diese dissoziieren vom PKA-Holoenzym ab, wodurch die katalytischen Untereinheiten freigesetzt werden. Die PKA kann nun andere Proteine phosphorylieren und somit deren Aktivität verändern (Übersicht in Nairn *et al.*, 1985; Kirschner *et al.*, 2009).

Ein Beispiel für einen solchen Signalweg findet sich in Nervenzellen. Der muskarinische Acetylcholinrezeptor bindet Acetylcholin, woraufhin die oben beschriebene Signalkaskade abläuft. Dies scheint eine Rolle bei der Gedächtnisbildung zu spielen (Übersicht in Schwartz & Greenberg, 1987; Kandel & Schwartz, 1982).

In der Meeresschnecke *Aplysia* wurde die Beteiligung einer cAMP-abhängigen Kinase am Langzeitgedächtnis nachgewiesen. Nagahama *et al.* (2007) zeigten, wie die heterologe Expression von PAC in *Aplysia*-Neuronen die neuronale Plastizität beeinflusst. Auch das Lernen bei Honigbienen hängt mit cAMP zusammen (Menzel & Müller, 1996).

In Prokaryoten ist cAMP an der Regulation der Genexpression beteiligt. Hier wird die Transkription vieler katabolischer Enzyme durch cAMP bindende Proteine reguliert (Übersicht in Botsford & Harman, 1992). Ein Beispiel ist das *lac*-Operon in *E. coli*, dessen Gene exprimiert werden, wenn sich Zucker im Medium befinden.

Im Pilz *Trichoderma atroviride* bindet cAMP den Transkriptionsfaktor BLR. Dies geschieht nach einem Blaulichtreiz und führt dann zur Konidienbildung, woran auch die PKA beteiligt ist (Casas-Flores *et al.*, 2006). Auch in einzelligen Eukaryoten spielt cAMP eine Rolle.

In Hefe wird die cAMP-Bildung durch Glukose angeregt und hat einen Einfluss auf die Kontrolle des Zellzyklus (Thevelein & de Winde, 1999).

Der Zellzyklus von *Euglena* hängt ebenfalls mit cAMP zusammen. Unter dem Einfluss von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) verändern Adenylatzyklen und Phosphodiesterasen ihre Aktivität periodisch. Daraufhin oszilliert die cAMP-Konzentration in der Zelle und regelt so auch den circadianen Rhythmus (Tong & Edmunds, 1993; Mohabir & Edmunds, 1999), was sich auf den Zyklus der Zellteilung auswirkt (Carré & Edmunds, 1993, 1992).

In einigen einzelligen Eukaryoten wirkt cAMP nicht nur als sekundäres Signalmolekül innerhalb der Zelle, sondern als Signal von außen. Die Amöbe *Dictyostelium* sezerniert cAMP, was den Artgenossen in der Umgebung als Signal dient, sich zu aggregieren (Tyson & Murray, 1989).

### 1.2.2 Zyklische Nukleotide in Pflanzen

Die Relevanz zyklischer Nukleotide in Pflanzen war lange umstritten (Übersicht in Assmann, 1995; Martinez-Atienza *et al.*, 2007). Schon früh gab es biochemische Hinweise auf Nukleotidzyklaseaktivität in Pflanzenextrakten. In Extrakten aus Wurzeln von *Medicago sativa* wurde die Aktivität einer Adenylatzyklase gezeigt, die von den divalenten Kationen  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  abhing.

Ein molekularbiologischer Nachweis blieb jedoch lange aus. Erst Ludidi & Gehring (2003) fanden mit AtGC1 eine Guanylatzyklase in *Arabidopsis*, die sie auch klonieren und in *E. coli* überexprimieren konnten, um deren Guanylatzyklaseaktivität *in vivo* nachzuweisen.

Für die Wirkung von cAMP auf Pflanzen gibt es mehrere Hinweise. cAMP beeinflusst das Wachstum und die Orientierung von Pollenschläuchen in *Agapanthus umbellatus* (*Liliaceae*)

(Moutinho *et al.*, 2001). Eine für die Bildung des cAMP verantwortliche Adenylatzyklase (AC) wurde in dieser Arbeit ebenfalls identifiziert und war in der Lage einen AC-defizienten *E. coli*-Stamm zu komplementieren.

Bei der Regulation von Ionenkanälen scheinen zyklische Nukleotide ebenfalls eine Rolle zu spielen (Übersicht in Newton & Smith, 2004). So beeinflusst cGMP die Regulation der Stomaöffnung (Cousson, 2001; Pharmawati *et al.*, 1998). Volotovski *et al.* (1998) zeigten den Einfluss von zyklischen Nukleotiden auf Kationenströme in Tabak Protoplasten. Hier führt eine Erhöhung der zytosolischen cAMP- und cGMP-Konzentration zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle.

In Wurzeln von *Arabidopsis* führen bereits mikromolare Konzentrationen von cAMP und cGMP im Zytoplasma zu einem schnellen Schließen der Natriumkanäle (Maathuis & Sanders, 2001) und verändern den Ein- und Ausstrom von Kalium (Maathuis, 2006). Außerdem führt cGMP in der Wurzel zur Änderung der Transkription von Genen, die an Metabolismus, Gentranskription, Signalweg- und Abwehrmechanismen beteiligt sind, aber auch von Genen die für Transporter kodieren. Dies waren Transporter für nichtselektive Kationenkanäle und Kationen-Protonen-Antiporter (Maathuis, 2006).

Über die Signalwege, die zu einer Reaktion auf veränderte Konzentrationen an zyklischen Nukleotiden führen ist noch wenig bekannt. So gibt es im Genom von *Arabidopsis* keine Homologe zur Proteinkinase A. Auf biochemischem Weg konnte jedoch in der Winde *Pharbitis nil* cGMP-regulierte Proteinkinaseaktivität nachgewiesen werden (Szmidt-Jaworska *et al.*, 2003).

In anderen Pflanzen gelang dies nicht. Bridges *et al.* (2005) fanden keinen biochemischen Nachweis für die Existenz von zyklischen Nukleotid regulierten Proteinkinasen in Reis und *Arabidopsis*. Die bioinformatische Analyse des Genoms von Reis und *Arabidopsis* führte zur Identifizierung zahlreicher putativer Proteinkinasen. Darunter gibt es auch welche, die eine zyklische Nukleotid Bindedomäne (CNBD) besitzen (Krupa *et al.*, 2006).

Ein molekularbiologischer Nachweis für die Funktion von zyklisch Nukleotid gesteuerten Proteinkinasen fehlt bislang. Da die Existenz und die Wirkung zyklischer Nukleotide in Pflanzen aber feststeht, muss hier ein Signalweg vorliegen, der sich grundlegend von dem in Tieren unterscheidet.

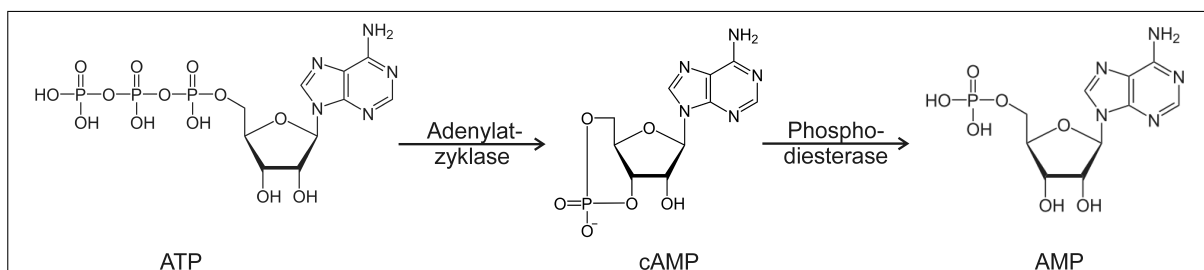
## 1.3 Adenylatzyklasten

### 1.3.1 Übersicht

Adenylatzyklasten katalysieren die Umsetzung von Adenosin triphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP, siehe Abb. 1.2), welches ein weit verbreiteter sekundärer Botenstoff ist. Das primäre Signal, das zur Bildung von cAMP führt, kann vielfältig sein. Es kann sich um Hormone handeln, ebenso wie um Änderungen im pH oder der Ionenzusammensetzung im Zellinneren. Beim Riechen in höheren Tieren bindet der Odorant an den Rezeptor und es kommt über eine G-Proteinkaskade zur Aktivierung einer Adenylatzyklaste.

Adenylatzyklasten werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in sechs Klassen eingeteilt. Diese weisen untereinander keine Sequenzhomologien auf, weshalb von einer konvergenten evolutiven Entstehung ausgegangen wird (Übersicht in Bârzu & Danchin, 1994).

Adenylatzyklasten der Klasse I kommen ausschließlich in gram-negativen Bakterien vor. In



**Abb. 1.2:** Eine Adenylatzyklaste katalysiert die Umsetzung von ATP in cAMP, eine Phosphodiesterase die Umsetzung von cAMP in AMP.

*E. coli* regulieren diese Adenylatzyklen die cAMP-Konzentration entsprechend der Glucosekonzentration im Medium. Das cAMP bindet dann an Transkriptionsfaktoren für Gene des Metabolismus, wie das lac-operon (Bârzu & Danchin, 1994).

Pathogene Bakterien wie *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis* und *Pseudomonas aeruginosa* bilden Klasse II Adenylatzyklen als extrazelluläre Toxine. Diese dringen in die Wirtszelle (Säuger) ein, und erhöhen daraufhin die cAMP-Konzentration auf ein toxisches Niveau (Übersicht in Bârzu & Danchin, 1994).

Die meisten bekannten Adenylatzyklen gehören zur Klasse III (Übersicht in Linder & Schultz, 2003; Linder, 2006) und kommen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor. Sie sind u. a. in tierischen Zellen an der Hormonantwort durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren beteiligt, wobei die Proteinkinase A eine wichtige Rolle als Ziel im weiteren Signalweg spielt. Diese Klasse wird in 1.3.2 genauer beschrieben.

Für die weiteren Klassen von Adenylatzyklen gibt es nur einzelne Beispiele. Im  $\gamma$ -Proteobakterium *Aeromonas hydrophila* wurde eine Klasse IV Adenylatzyklen beschrieben (Sismeiro *et al.*, 1998), eine Klasse V Adenylatzyklen in *Provatella ruminicola*, ebenfalls ein Bakterium (Cotta *et al.*, 1998). Die Klasse VI der Adenylatzyklen bildet eine bakterielle Zyklase aus *Rhizobium etli* (Téllez-Sosa *et al.*, 2002).

### 1.3.2 Klasse III Adenylatzyklen

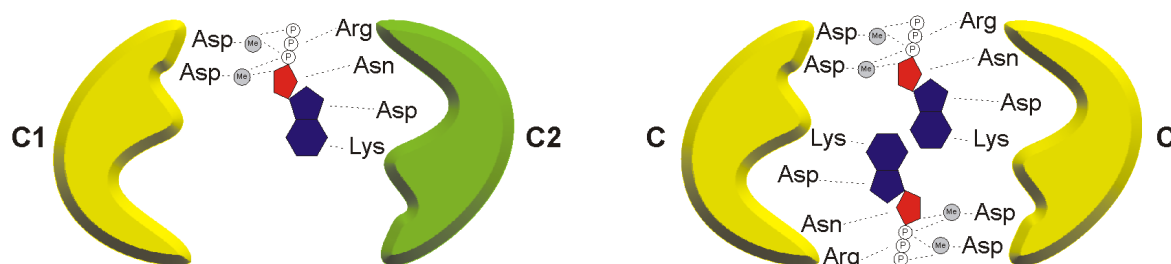
Die katalytischen Domänen der Klasse III Adenylatzyklen müssen Dimere aus zwei Zyklasedomänen bilden, um katalytisch aktiv zu sein. Das katalytische Zentrum befindet sich dann an der Berührungsfläche der beiden Zyklasedomänen (Tesmer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997).

In Säugern gibt es neun verschiedene membrangebundene Adenylatzyklen (Typ I–Typ IX), die jeweils unterschiedlich reguliert werden, sowie eine lösliche Adenylatzyklen (Übersicht

in Linder, 2006). Alle besitzen zwei Zyklasedomänen (C1 und C2), die sich in ihrer Sequenz leicht voneinander unterscheiden. Bilden diese beiden Zyklasedomänen ein sogenanntes Pseudoheterodimer, so enthält dieses nur ein katalytisches Zentrum (Whisnant *et al.*, 1996; Tesmer *et al.*, 1999).

Im Gegensatz dazu besitzen Klasse III Adenylatzyklasen aus Bakterien nur eine Zyklasedomäne. Da die katalytische Umsetzung von ATP zu cAMP auch bei diesen Zyklasten an der Berührungsfläche zweier Zyklasedomänen stattfindet, müssen auch diese ein, aus zwei Zyklasedomänen bestehendes, Dimer bilden.

In diesem Homodimer aus zwei identischen Zyklasedomänen bilden sich zwei katalytische Zentren aus (Hurley, 1998; Guo *et al.*, 2001; Steegborn *et al.*, 2005). Eine Übersicht über die beiden Möglichkeiten zur Bildung eines Dimers ist in Abb. 1.3 dargestellt.



**Abb. 1.3:** Vergleich der beiden Möglichkeiten zur Bildung eines Dimers. Links ein Heterodimer aus zwei unterschiedlichen Zyklasedomänen, wie es in einem Pseudoheterodimer in einer Klasse III Adenylatzyklase aus Säugern entsteht. Hier bildet sich *ein* katalytisches Zentrum aus. Rechts ein Homodimer aus zwei identischen Zyklasedomänen. Hierbei entstehen *zwei* katalytische Zentren. Dargestellt sind die Zyklasedomänen (gelb und grün), die an der Umsetzung von ATP nach cAMP beteiligten Aminosäuren. Das dargestellte Substrat ATP besteht aus dem Purinring (blau), Ribose (rot) und den drei Phosphatresten (P). Die beiden Aspartate binden die zweiwertigen Metallionen (Me).

Die Kristallisierung und Strukturaufklärung von Klasse III Adenylatzyklasen ergab genauere Einblicke in die Dimere der Zyklasedomänen und die Grenzfläche zwischen den Domänen mit den katalytischen Zentren. Hierfür wurden Heterodimere aus Säuger-Adenylatzyklasen vom Typ V (C1) und Typ II (C1) mit einem katalytischen Zentrum untersucht (Tesmer *et al.*, 1997, 1999, 2000).

Dabei stellte sich heraus, dass die Klasse III Adenylatzyklen große strukturelle Ähnlichkeit mit Guanylatzyklen besitzen. Bei der katalytischen Umsetzung von ATP zu cAMP sind sechs Aminosäuren direkt beteiligt. In Säuger-Adenylatzyklen befinden sich zwei von ihnen auf der Zyklasedomäne C1, die übrigen vier auf der Zyklasedomäne C2.

Die Position der Aminosäuren bezieht sich im Folgenden auf das chimäre Säugerprotein aus Typ V (C1) und Typ II (C2) Zyklasedomänen oder auf PAC $\alpha$  (in Klammern). Bei der Bindung des Substrats interagieren Lys938 (PAC $\alpha$  Lys250) und Asp1018 (PAC $\alpha$  Thr319) direkt mit dem Purinring des Adenosintri-phosphat (eingerahmt in Abb. 1.4). Diese Reste sind auch für die Unterscheidung zwischen ATP und GTP wichtig. Die Zyklisierungsreaktion findet unter Beteiligung von zwei zweiwertigen Metallionen ( $Mg^{2+}$ ) statt. Die beiden Ionen werden hierfür von den beiden sauren Aminosäuren Asp396 (PAC $\alpha$  Asp620) und Asp440 (PAC $\alpha$  Asp664) gebunden.

Um den trigonal-bipyramidalen Übergangszustand bei der Umesterung zu stabilisieren, neutralisiert die positive Teilladung von Asn1025 (PAC $\alpha$  Asn326) die negative Ladung des  $\alpha$ -Phosphats und Arg1029 (PAC $\alpha$  Arg330) bringt die Ribose in eine energetisch günstigere Position (Übersicht in Linder, 2006).

Somit sind die Aminosäuren der Zyklasedomäne C1 ausschließlich an der katalytischen Umsetzung von ATP zu cAMP beteiligt, während die Aminosäuren in C2 für die Substratbindung und -spezifität zuständig sind.

Der Vergleich von Säuger-Adenylatzyklen der Klasse III mit PAC $\alpha$  zeigt, dass sich die

Bos taurus	Ret GC-1	(GC)	920	D	V	Y	K	V	E	T	I	G	D	A	930	992	T	M	P	R	Y	C	L	F	G	D	T	1002
Rat alpha_1/beta_1		(GC)	520	D	V	Y	K	V	E	T	I	G	D	A	530	589	K	M	P	R	Y	C	L	F	G	D	T	599
Rat VC_1/IIC_2		(AC)	933	G	V	E	K	I	K	T	I	G	S	T	943	1013	Q	K	P	Q	Y	D	I	W	G	N	T	1023
Spirulina	CyaG	(AC)	528	K	L	E	K	I	K	T	I	G	D	A	538	600	K	K	F	I	Y	D	L	W	G	D	A	610
PACa C1		(AC)	245	G	G	Q	V	A	K	F	I	T	G	I	255	314	R	K	A	D	F	T	L	L	G	D	C	324
PACb C1		(AC)	246	G	G	N	I	A	K	F	I	T	G	I	256	315	R	K	S	D	F	T	L	L	G	D	C	325
PACa C2			655	G	G	E	V	I	K	L	I	G	D	C	675	726	G	M	T	E	F	V	V	A	G	E	V	736
PACb C2			659	G	G	E	V	I	K	L	I	G	D	C	669	730	G	L	T	E	Y	V	V	A	G	A	V	740

**Abb. 1.4:** Alignment von Ausschnitten der Zyklasedomänen von PAC mit den im Text erwähnten Säuger-Zyklasedomänen vom Typ V und Typ II. Eingerahmt dargestellt sind die im Text aufgeführten Aminosäuren.

wichtigen Aminosäuren aus C1 in Säuger-Adenylatzyklen bei PAC $\alpha$  in C2 befinden und umgekehrt (siehe Abb. 1.4). Aber auch in PAC $\alpha$  muss sich ein C1-C2-Heterodimer ausbilden, da im Gegensatz zu bakteriellen Adenylatzyklen die wichtigen Aminosäuren auf die Zyklasedomänen C1 und C2 verteilt sind.

Wie erwähnt sind sich Klasse III Adenylatzyklen und Guanylatzyklen strukturell sehr ähnlich. Bei beiden müssen zwei Zyklasedomänen dimerisieren, um ein katalytisches Zentrum auszubilden. Guanylatzyklen besitzen meist nur eine Transmembrandomäne. Im Gegensatz dazu haben die meisten Klasse III Adenylatzyklen aus Säugern eine komplexe Membrantopologie.

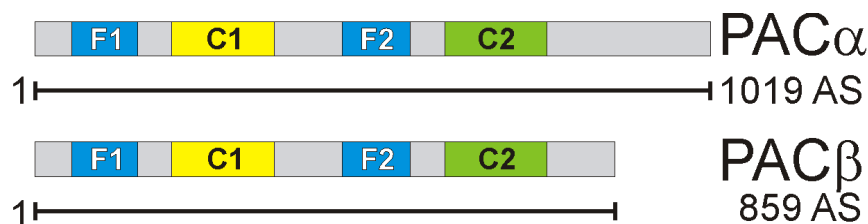
Sie besitzen zwei große transmembranäre Bereiche (TM1 und TM2), die aus jeweils sechs Transmembranhelices bestehen. Es gibt in Säugern aber auch lösliche Klasse III Adenylatzyklen (Übersicht in Sunahara *et al.*, 1996). Ihre katalytische Aktivität ist abhängig von der Bicarbonatkonzentration im Zellinneren, aber unabhängig vom dort herrschenden pH-Wert (Stegborn *et al.*, 2005).

## 1.4 PAC – Photoaktivierte Adenylatzyklase

Obwohl Diehn (1969) aufgrund des Aktionsspektrums der Phototaxis bei *Euglena* schon früh vermutete, dass es sich bei dem Licht absorbierenden Pigment um ein Flavinpigment handeln musste, konnte der Photorezeptor erst vor wenigen Jahren identifiziert und aus dem Paraflagellarkörper von *Euglena* isoliert werden (Iseki *et al.*, 2002). Es handelte sich dabei um PAC, eine Photoaktivierte Adenylatzyklase (*engl.*: **p**hotoacitvated **a**denylyl **c**yclase).

Nach der Isolation von PAC aus dem Paraflagellarkörper mit anschließender Gelfiltration, wurde PAC als ein Proteinkomplex mit 400 kDa bestimmt. Bei einer Gelelektrophorese





**Abb. 1.5:** Übersicht über die Topologie der Proteine PAC $\alpha$  und PAC $\beta$ . Beide Proteine besitzen die FAD-bindenden Domänen F1 und F2, sowie die Zyklasedomänen C1 und C2. Außerdem ist die Anzahl der Aminosäuren angegeben, aus denen die Proteine bestehen (nach Iseki *et al.*, 2002).

dieses Proteins unter denaturierenden Bedingungen zeigte sich, dass der Komplex aus zwei unterschiedlich großen Proteinen bestand. Das größere von beiden wurde PAC $\alpha$  genannt, das kleinere PAC $\beta$  (Iseki *et al.*, 2002).

PAC $\alpha$  hat eine Länge von 1019 Aminosäuren (AS) und PAC $\beta$  von 859 AS (siehe Abb. 1.5), dies entspricht einer Molekülmasse von 105 kDa bzw. 90 kDa. Beide besitzen jeweils zwei Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-bindende Domänen F1 und F2, die zur Familie der BLUF-Domänen gehören (sensor of blue light using FAD, Gomelsky & Klug, 2002), sowie die beiden Zyklasedomänen C1 und C2.

Die Aminosäuresequenzen von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  sind einander sehr ähnlich. In den N-terminalen 800 AS weisen sie eine Homologie von 75 % auf. Ein großer Unterschied zwischen PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  ist der C-terminale Bereich. Dieser ist in PAC $\alpha$  um 160 AS länger als in PAC $\beta$ .

Als Adenylatzyklase katalysiert PAC die Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Pyrophosphat (PP $_i$ ). Iseki *et al.* (2002) zeigten, dass PAC aus isolierten Paraflagellarkörpern bereits im Dunkeln enzymatische Aktivität besaß, diese aber durch Belichtung um das 80-fache gesteigert werden konnte.

Später gelang es Schröder-Lang *et al.* (2007) PAC heterolog in Oocyten von *Xenopus laevis* und HEK293-Zellen zu exprimieren. Durch Koexpression mit cAMP-sensitiven Ionenkanälen wurden der Leitwert der Zellen als indirektes Maß für die cAMP-Konzentration ver-

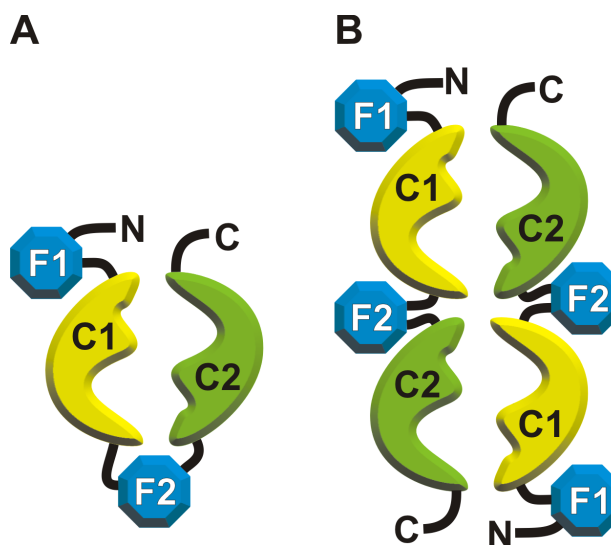
wendet. Somit konnte auch in diesen Systemen die Aktivität von PAC untersucht werden. In Oocyten wurden sowohl PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  gemeinsam, als auch jeweils PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  einzeln exprimiert. Hierbei zeigte sich, dass die gemessene Zyklaseaktivität bei einer Koexpression von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  in etwa gleich groß war wie bei einer Expression von PAC $\alpha$  alleine. Um bei PAC $\beta$  dieselbe Aktivität messen zu können wie bei PAC $\alpha$ , musste von PAC $\beta$  die 100-fache Menge an RNA injiziert werden.

Nachdem der Photorezeptor PAC identifiziert war, konnte seine Funktion *in vivo* untersucht werden. Durch RNAi-Experimente in *Euglena gracilis* konnte gezeigt werden, dass PAC an der phobischen Reaktion bei einem plötzlichen Anstieg der Lichtintensität beteiligt ist (Iseki *et al.*, 2002). Ntefidou *et al.* (2003) zeigten in ähnlichen Experimenten, dass PAC oder ein Homolog davon außerdem an der positiven und negativen Phototaxis beteiligt ist. Durch die Möglichkeit, PAC heterolog in verschiedenen Systemen zu exprimieren, wird es als Werkzeug für neurobiologische Untersuchungen verwendet. So war es möglich PAC im Gehirn von *Drosophila melanogaster* zu exprimieren, was zu einer Licht induzierten Veränderung im Verhalten führte (Schröder-Lang *et al.*, 2007).

Desweiteren war es möglich, aus *Euglena gracilis* aufgereinigtes PAC in sensorischen Neuronen von *Aplysia* zu injizieren (Nagahama *et al.*, 2007). Hier konnte eine Veränderung der Form und Größe der Aktionspotentiale durch Belichtung gezeigt werden. Für biochemische Untersuchungen an PAC war es möglich, PAC in Insektenzellen überzuexprimieren und in größeren Mengen aufzureinigen (Ntefidou *et al.*, 2006).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Bei großen Proteinen, die aus mehreren Domänen bestehen, ist es schwierig die Struktur des gesamten Proteins zu bestimmen. Dabei bildet auch PAC keine Ausnahme. Durch Sequenzhomologien können Modelle der einzelnen Domänen erstellt werden, doch über die



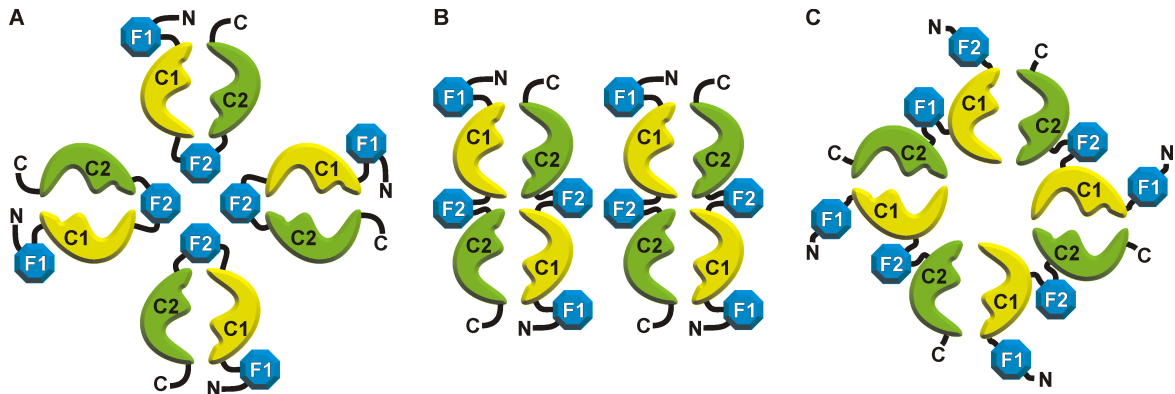
**Abb. 1.6:** Die Möglichkeiten der Dimerisierung bei PAC. **A:** Um ein C1-C2-Heterodimer auszubilden könnte PAC ein intramolekulares Pseudoheterodimer bilden, wie es in Säuger-Adenylatzyklasen vorkommt. **B:** Eine andere Möglichkeit ist die Bildung eines Dimers aus zwei PAC-Untereinheiten, wobei die C1-C2-Heterodimere intermolekular gebildet werden. [Angepasst mit Erlaubnis von Verlag Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.: Biological Chemistry, (Looser *et al.*, 2009), (©2009)]

Art und Weise, wie diese Domänen im Bezug zueinander angeordnet sind, kann dadurch keine Aussage getroffen werden.

PAC besitzt, wie die Säuger-Adenylatzyklasen der Klasse III, zwei leicht unterschiedliche Zyklasedomänen. In Säugern bilden diese wahrscheinlich ein intramolekulares Pseudoheterodimer, an dessen Grenzschicht dadurch ein katalytisches Zentrum entsteht. Von PAC wird vermutet, dass es *in vivo* als Tetramer existiert, von dem angenommen wurde, dass es aus zwei PAC $\alpha$ - und zwei PAC $\beta$ -Untereinheiten besteht (Iseki *et al.*, 2002).

Die Bildung eines Heterodimers der Zyklasedomänen C1 und C2 aus PAC ist auf verschiedene Arten denkbar. Die Dimerisierung könnte intramolekular stattfinden (siehe Abb. 1.6 A), wie es bei den Säuger-Adenylatzyklasen der Fall ist. Eine weitere Möglichkeit ist die Dimerisierung von zwei PAC-Untereinheiten, wobei das C1-C2-Heterodimer aus den Domänen zweier verschiedener Untereinheiten stammt (siehe Abb. 1.6 B).

Die Tatsache, dass PAC *in vivo* als Tetramer existiert, könnte bedeuten, dass vier PAC-



**Abb. 1.7:** Die Möglichkeiten der Tetramerbildung bei PAC. **A:** Vier PAC-Untereinheiten, die ein intramolekulares C1-C2-Pseudoheterodimer bilden, lagern sich zusammen. **B:** Zwei PAC-Dimere mit jeweils zwei intermolekularen C1-C2-Pseudoheterodimeren finden zusammen. **C:** Vier PAC-Untereinheiten lagern sich so zusammen, dass die C1-C2-Pseudoheterodimere aus den katalytischen Domänen jeweils benachbarter Untereinheiten stammen, wodurch sich ein rotationssymmetrisches Tetramer formt.

Untereinheiten jeweils ein intramolekulares C1-C2 Heterodimer bilden und sich dann zu einem Tetramer zusammenfinden (Abb. 1.7 A). Oder zwei PAC-Untereinheiten bilden ein Dimer (Abb. 1.6 B) und zwei solcher PAC-Dimere lagern sich zu einem tetrameren Komplex zusammen (Abb. 1.7 B). Es wäre aber auch denkbar, dass die C1-C2-Heterodimere aus Zyklasedomänen jeweils unterschiedlicher PAC-Untereinheiten bestehen, wodurch ein rotationssymmetrisches Tetramer entstünde (Abb. 1.7 C). Durch die Koexpression verschiedener PAC-Mutanten und die Bestimmung der dadurch entstehenden Adenylatzyklaseaktivität sollte in dieser Arbeit untersucht werden, auf welche Art die Heterotetramerisierung der Zyklasedomänen bei PAC erfolgt.

Bei heterologer Expression in Oocyten des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* zeigten auch schon PAC $\alpha$  bzw. PAC $\beta$  alleine eine messbare Zyklaseaktivität. Dabei lag die Aktivität von PAC $\alpha$  deutlich über der von PAC $\beta$  (Schröder-Lang *et al.*, 2007). Durch die Herstellung von Mutanten und Chimären aus PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Teile von PAC für die unterschiedlich starke Aktivität der beiden Untereinheiten verantwortlich sind.

Im katalytischen Zentrum unterscheidet sich PAC von anderen Klasse III Adenylatzyklen, deren Struktur bereits bekannt ist. An Position 319, wo bei den Säuger-Adenylatzyklen ein Aspartat mit dem Purinring des ATP interagiert, besitzt PAC ein Threonin. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss dieses Threonin auf die Substratbindung und -spezifität hat.

Außerdem sollten durch Mutationen auch die anderen Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung des Purins und somit der Substratspezifität beteiligt sind. Neben der Identifizierung dieser Aminosäuren sollten sie so verändert werden, dass PAC neben ATP auch GTP bindet. Somit sollte durch gezielte Mutation aus einer Photoaktivierten Adenylatzyklase eine Photoaktivierte Guanylatzyklase gemacht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 2.1.1 Kultur der Bakterien

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Bakterien handelte es sich ausschließlich um *Escherichia coli* des Stamms *XL1 Blue MRF'*. Zur Vermehrung einzelner Klone wurden diese in ca. 5 mL flüssigem LB-Medium (siehe Tab. 2.1) in einem 15 mL *Falcon*-Röhrchen bei 37 °C geschüttelt (G25 Incubator Shaker; New Brunswick Scientific). Nach einer Transformation (siehe 2.1.2) wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten (LB-Medium + 1,5 % Agar) ausgestrichen und im Wärmeschrank (BE600; Memmert) bei 37 °C kultiviert.

#### 2.1.2 Transformation und Selektion

Die chemisch kompetenten Zellen wurden in Aliquots von 50 µL bei –80 °C aufbewahrt. Zur Transformation wurden sie mit maximal 5 µL wässriger DNA-Lösung aus dem Ligationsansatz (siehe 2.2.2) versetzt und für 30 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Bakterien für 45 s in ein Wasserbad mit 42 °C gestellt und danach wieder für 3 min auf Eis überführt. Nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium (siehe Tab. 2.1) wurde die Suspension für 30 min bei 37 °C geschüttelt.

**Tab. 2.1:** Zusammensetzung von LB- und SOC-Medium

LB-Medium		SOC-Medium	
Trypton	10 g/L	Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L	Hefeextrakt	5 g/L
<i>NaCl</i>	10 g/L	<i>NaCl</i>	0,5 g/L
in <i>ddH</i> <sub>2</sub> O		<i>MgSO</i> <sub>4</sub>	5 g/L

**Tab. 2.2:** Zusammensetzung von TE- und TENS-Puffer

TE-Puffer		TENS-Puffer	
Tris- <i>HCl</i> pH 7,5	10 mM	TE-Puffer	9,4 mL
<i>Na</i> -EDTA	1 mM	10 % SDS	500 $\mu$ L
in <i>ddH</i> <sub>2</sub> O		10 M <i>NaOH</i>	100 $\mu$ L
		RNase	200 $\mu$ g/mL

Zuletzt wurde diese Suspension auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Da für Transformation in dieser Arbeit ausschließlich der Vektor pGEM-HE eingesetzt wurde, welcher das  $\beta$ -Lactamasegen enthält, wurden ausschließlich LB-Agarplatten mit Ampicillin (50  $\mu$ g/mL) verwendet.

### 2.1.3 Plasmid isolation

Zur Isolation der Plasmide aus *E. coli* wurde die „Ten Minute Plasmid Mini Prep“ (Zhou *et al.*, 1990) verwendet, welche auf dem Prinzip der alkalische Lyse beruht. Hierfür wurden 1,5 mL der Flüssigkultur (siehe 2.1.1) in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 30 s bei 13 000 *g* pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 50  $\mu$ L verworfen und die Bakterien darin resuspendiert.

Durch die Zugabe von 300  $\mu$ L TENS-Puffer (siehe Tab. 2.2) und anschließendes Mischen wurden die Zellwände lysiert und die bakterielle DNA freigesetzt. Das Lysat wurde mit 150  $\mu$ L 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) neutralisiert. Anschließend konnten durch Zentrifugation (13 000 *g*, 5 min) die Zellwandbestandteile, die genomische DNA, Lipide und Proteine größtenteils aus der Lösung entfernt werden. Die Plasmid-DNA befand sich weiterhin in der Lösung.

Nach der Überführung des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß und Zugabe von 600  $\mu$ L Isopropanol fiel die Plasmid-DNA aus und konnte durch Zentrifugation (13 000 *g*, 5 min) pelletiert werden. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurde das Pellet mit 500  $\mu$ L

70 % Ethanol gewaschen und anschließend bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in 50 µL DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat, inaktiviert Ribonukleasen) aufgenommen.

#### 2.1.4 Kryokonservierung

Um Bakterienkulturen über längere Zeit aufzubewahren, wurden Glycerinstocks angefertigt. Hierfür wurden 1,5 mL einer Flüssigkultur in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (30 s bei 13 000 G) und der Überstand bis auf ca. 200 µL entfernt. Dann wurden 200 µL 80 % Glycerin zugegeben, durch kräftiges Schütteln gemischt (Vortex) und unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend konnten die Bakterien bei –80 °C gelagert werden.

## 2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.2.1 Restriktion

Doppelsträngige DNA kann mit Restriktionsendonukleasen an genau definierten Stellen geschnitten werden. Solche Stellen werden Erkennungssequenzen genannt. Sie sind mindestens 6 bp lang und meist palindromisch aufgebaut. Die von den Endonukleasen katalysierte Reaktion ist die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen in beiden Strängen der DNA.

Die Reaktion wird wie in Tab. 2.3 beschrieben, angesetzt und dann für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Ein Schnitt durch ein Restriktionsenzym kann ohne Überhang (*blunt*), mit einem 3'- oder mit einem 5'-Überhang (*sticky*) erfolgen. Restriktionen wurden verwendet, um die PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären herzustellen (siehe 2.3).



**Tab. 2.3:** Ansatz eines Restriktionsverdaus

Reagenz	Kontrollverdau	Linearisierung
10× Puffer	1 µL	5 µL
DNA	1 µg	10 µg
Restriktionsenzym	3 U	25 U
<i>ddH</i> <sub>2</sub> O	ad 20 µL	ad 50 µL

**Tab. 2.4:** Ansatz einer DNA-Ligation

Reagenz	eingesetzte Menge
10× Ligase-Puffer	2 µL
DNA (Vektor)	ca.1 µg
DNA (Insert)	3–5× Menge an Vektor
T4-DNA Ligase	2 U
<i>ddH</i> <sub>2</sub> O	ad 10 µL

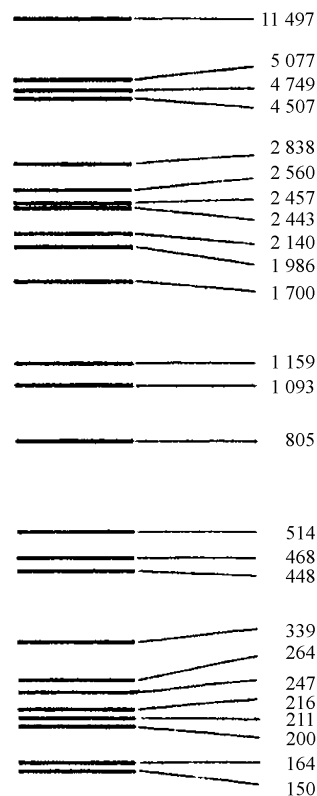
### 2.2.2 Ligation

Bei der Ligation werden Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngigen DNA-Molekülen hergestellt. Diese Mg<sup>2+</sup>- und ATP-abhängige Reaktion wurde von der T4-DNA-Ligase (Fermentas) katalysiert. Der in Tab. 2.4 gezeigte Ansatz wurde für ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.2.3 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuremoleküle unterschiedlicher Größe voneinander getrennt. Da DNA und RNA ein negativ geladenes Phosphatrückgrat besitzen, können sie im elektrischen Feld bewegt werden. Das Gel dient hierbei als Matrix, durch die sich kleinere Moleküle schneller bewegen können als große.

Zur Herstellung eines N%igen Gels wurden 400 mL 1× TBE-Puffer (siehe Tab. 2.6) mit 4×N g Agarose (PeqLab) versetzt und durch Kochen vollständig gelöst. Nachdem sich das



**Abb. 2.1:** DNA-Marker  $\lambda$ -PstI: Dargestellt ist die Größe der Fragmente in bp und deren Auftrennung in einem 1%igen Agarose-Gel in TBE.

flüssige Gel auf ca. 60 °C abgekühlt hatte, wurden 4  $\mu$ L Ethidiumbromid (10 mg/mL) zugesetzt, gemischt und in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen.

Nach vollständigem Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1 $\times$ TBE gefüllte Gelkammer gelegt. Zum Beladen des Gels wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer (siehe Tab. 2.5) versetzt. Als Marker diente  $\lambda$ -PstI-Marker (siehe Abb. 2.1). Für die Gelelektrophorese mit RNA wurden 300 mL 1 $\times$ MEN-Puffer angesetzt, 20,5 mL davon mit 0,25 g Agarose versetzt und aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 4,5 mL 37%ige Formaldehydlösung zugegeben, gemischt und anschließend in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Als Probenpuffer diente der 2 $\times$  *RNA Loading Dye* (Fermentas), welcher auch Ethidiumbromid enthielt.

**Tab. 2.5:** Zusammensetzung der DNA-Probenpuffer

5× DNA-Probenpuffer		10× DNA-Probenpuffer	
Bromphenolblau	0,25 %	Orange G	0,5 %
Xylencyanol	0,25 %	EDTA	25 mM
EDTA	100 mM	Glycerin	60 %
Glycerin	50 %	in <i>ddH<sub>2</sub>O</i>	
in <i>ddH<sub>2</sub>O</i>			

**Tab. 2.6:** Zusammensetzung von 10× TBE und 10× MEN

10× TBE		10× MEN	
Tris	0,9 M	MOPS	200 mM
Borsäure	0,9 M	Na-Acetat	50 mM
EDTA	20 mM	EDTA	5 mM
in <i>ddH<sub>2</sub>O</i>	pH 8,3	in <i>ddH<sub>2</sub>O</i>	pH 7,0

Vor dem Auftragen wurde die Probe mit dem Probenpuffer für 5 min bei 65 °C denaturiert und danach auf Eis zwischengelagert. Zum Größenvergleich wurde der Marker *RiboRuler<sup>TM</sup> High Range RNA Ladder* (Fermentas) aufs Gel aufgetragen. In einer Gelkammer mit 1×MEN wurde ein elektrisches Feld mit 6 V/cm angelegt, um die Fragmente zu trennen.

#### 2.2.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese für weitere Schritte verwenden zu können, mussten diese aus dem Gel extrahiert werden. Hierfür wurde das Fragment mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde mit dem Kit *NucleoSpin<sup>®</sup> ExtractII* (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers die DNA aus dem Gel aufgereinigt. Zum Schluss wurde die DNA nicht im mitgelieferten Elutionspuffer, sondern in *ddH<sub>2</sub>O* eluiert. Bei geringen Ausbeuten hat dies den Vorteil, dass die Salzkonzentration in der folgenden enzymatischen Reaktion (Ligation) nicht zu hoch werden.

### 2.2.5 PCR – Polymerase Kettenreaktion

Mit der PCR (engl.: *Polymerase Chain Reaction*) können DNA-Fragmente *in vitro* amplifiziert werden (Mullis *et al.*, 1986). Die zu amplifizierende Sequenz wird durch die Wahl der dafür verwendeten Primer bestimmt. Der Ansatz einer PCR ist in Tab. 2.7 dargestellt. Die PCR wurde eingesetzt, um die DNA-Sequenz von CNGA2 zu vermehren (siehe 2.3.2). Außerdem konnten mithilfe der verwendeten Oligos Schnittstellen am Anfang und am Ende der vermehrten Sequenz eingefügt werden. Als Polymerase wurde die *Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase* verwendet. Die Reaktion fand in einem Thermocycler (Primus25, MWG-Biotech) statt.

**Tab. 2.7:** Ansatz einer PCR: die eingesetzte Menge an DNA-Template hängt ebenso wie die Annealingtemperatur von der Anwendung ab.

Reagenz		eingesetzte Menge
5×HF-Puffer		10 µL
dNTPs (je 10 mM)		1 µL
Template-DNA		ca. 50 – 100 ng
Primer fwd. (10 µM)		2,5 µL
Primer rev. (10 µM)		2,5 µL
DNA-Polymerase ( <i>Phusion<sup>TM</sup></i> )		1 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)		0,5 µL
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>		ad 50 µL
Zyklen	Temperatur	Zeit
1	98 °C	5' 00"
35	98 °C	0' 20"
	50 – 70 °C	0' 20"
	72 °C	2' 10"
1	72 °C	2' 30"

### 2.2.6 Gerichtete *in vitro*-Mutagenese

Für die Expression in Oocyten wurden verschiedene Mutanten von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  hergestellt, die sich in einzelnen Aminosäuren vom Wildtyp unterschieden. Dies geschah mit Hilfe der *in vitro*-Mutagenese (IvM). Als Grundlage diente das Plasmid mit der codierenden Sequenz für PAC $\alpha$  bzw. PAC $\beta$ .

Ähnlich einer PCR (siehe 2.2.5) wurden alle Komponenten in ein 0,2- $\mu$ L-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert und gemischt. Die Polymerasereaktion fand dann in einem Thermocycler (Primus25, MWG-Biotech) statt (siehe Tab. 2.8). Zur Kontrolle wurden nach der Reaktion 10  $\mu$ L des Ansatzes auf ein Gel aufgetragen.

Weitere 10  $\mu$ L wurden mit 1,5  $\mu$ L des Restriktionsenzym DpnI versetzt und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Dieses Enzym schneidet nur die methylierte Template-DNA, während die *in vitro* synthetisierte DNA davon unberührt bleibt. So wurde gewährleistet, dass bei der anschließenden Transformation (siehe 2.1.2) nur DNA mit der gewünschten Mutation transformiert wird. Für die Transformation wurden 5  $\mu$ L des IvM-Ansatzes eingesetzt.

Um die Korrektheit der Klone zu überprüfen, wurden Restriktionsverdaus angefertigt, falls neue Schnittstellen eingefügt wurden. Außerdem wurde die codierende Sequenz durch Sequenzierung überprüft.

### 2.2.7 IVT – *in vitro* Transkription

Mit der *in vitro* Transkription (IVT) wurde die cRNA der Proteine hergestellt, die in Oocyten exprimiert werden sollten. Als Matrize hierfür diente der linearisierte Vektor mit der codierenden Sequenz des Proteins. Wichtig hierbei war, dass die Vektoren über die viralen Promotoren (Sp6/T7) verfügten, die von den RNA-Polymerasen erkannt werden, mit der die IVT durchgeführt wurde (siehe Tab. 2.9).

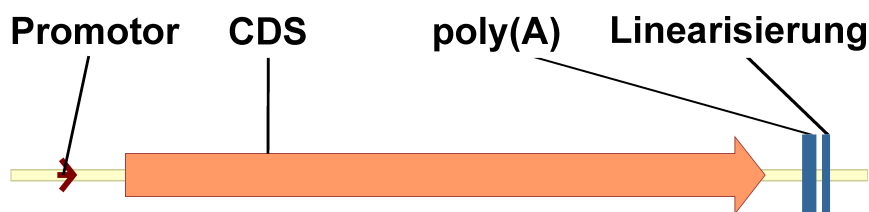
Die Vektoren sind so aufgebaut (siehe Abb. 2.2), dass vor der codierenden Sequenz (CDS)

**Tab. 2.8:** Ansatz einer *in vitro*-Mutagenese

Reagenz		eingesetzte Menge
5×HF-Puffer		10 µL
dNTPs (je 10 mM)		1 µL
Template-DNA		ca. 500 ng
Primer fwd. (10 µM)		1 µL
Primer rev. (10 µM)		1 µL
DNA-Polymerase ( <i>Phusion</i> <sup>TM</sup> )		1 µL
DMSO		1,5 µL
<i>ddH</i> <sub>2</sub> O		ad 50 µL
Zyklen	Temperatur	Zeit
1	98 °C	5' 00''
21	98 °C	0' 20''
	54 °C	0' 20''
	72 °C	2' 10''
1	72 °C	2' 30''

in 5'→3'-Richtung der virale Promotor steht. Hinter der CDS folgt die poly(A)-Sequenz, ein kurzer Bereich, der ausschließlich aus Adenosinen besteht, und der wie der Poly(A)-Schwanz in einer mRNA die Degradation hemmt. Kurz hinter der poly(A)-Sequenz befindet sich die Linearisierungsschnittstelle, an der vor der IVT geschnitten wurde.

Nach der Linearisierung (siehe 2.2.1) wurde die DNA aufgereinigt (*NucleoSpin*<sup>®</sup> *ExtractII*, Macherey-Nagel). Anschließend wurde der IVT-Ansatz, wie in Tab. 2.10 beschrieben, in einem 0,2-µL-Reaktionsgefäß gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus einem Transkriptionsvektor. Abgebildet sind der virale Promotor, die codierende Sequenz (CDS), die poly(A)-Sequenz und die Position der Schnittstelle zur Linearisierung des Vektors.

**Tab. 2.9:** Übersicht über die verwendeten Vektoren, Transkriptionspromotoren und Linearisierungsschnittstellen.

Klon	Vektor	Promotor	Linearisierung
PAC $\alpha$ /PAC $\beta$ (WT & Mutanten)	pGEM-HE	T7	NheI
CFTR	pSP64	SP6	SapI
cGK-II	pBS	T7	XbaI
rOAT1	pOG2	T7	NotI

**Tab. 2.10:** Ansatz einer *in vitro* Transkription nach AmpliCap-Max<sup>TM</sup> von EPICENTRE<sup>TM</sup>.

Reagenz	eingesetzte Menge
10 $\times$ Transcription Buffer	1 $\mu$ L
DNA (linearisierter Vektor)	ca. 6 $\mu$ L (2 $\mu$ g)
Cap/NTP PreMix	8 $\mu$ L
DTT (100 mM)	2 $\mu$ L
T7/SP6 Enzyme Solution	2 $\mu$ L

Ansatz mit 20  $\mu$ L Ammoniumacetat (3 M) versetzt und für 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt und anschließend für 1 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (13 000 *g*).

Nachdem der Überstand abgenommen wurde, musste das Pellet mit 700  $\mu$ L 70 % Ethanol gewaschen werden. Nach dem Trocknen bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Heizblock wurde die RNA in 20  $\mu$ L DEPC-Wasser aufgenommen. Um die Qualität der RNA zu prüfen, wurden je 1  $\mu$ L davon auf ein Gel aufgetragen und die Konzentration und Reinheit im Photometer bestimmt.

## 2.3 Herstellung der PAC-Fusionsproteine, -Mutanten und -Chimären

### 2.3.1 PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ -Knockoutmutanten

Um die Knockoutmutanten von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  herzustellen, wurden die für die Funktion wichtigen Aminosäuren in der Zyklasedomäne 1 (C1) bzw. in der Zyklasedomäne 2 (C2)

**Tab. 2.11:** Oligos zur Herstellung der PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten

Name	Sequenz
PACa K250E / G254C FWD	GGG GGC CAA GTG GCA GAG TTC ATC ACT TGT ATT TGC ATG GCG TAT TGG CC
PACa K250E / G254C REV	GGC CAA TAC GCC ATG CAA ATA CAA GTG ATG AAC TCT GCC ACT TGG CCC CC
PACa K250E / G254S FWD	GGG GGC CAA GTG GCA GAG TTC ATC ACT TCG ATT TGC ATG GCG TAT TGG CC
PACa K250E / G254S REV	GGC CAA TAC GCC ATG CAA ATC GAA GTG ATG AAC TCT GCC ACT TGG CCC CC
PACa K660E / D664C FWD	GGT GGG GAG GTC ATT GAA TTG ATT GGT TGT TGT GTG ACA GCA TAT TTC C
PACa K660E / D664C REV	GGA AAT ATG CTG TCA CAC AAC AAC CAA TCA ATT CAA TGA CCT CCC CAC C
PACa K660E / D664S FWD	GGT GGG GAG GTC ATT GAA TTG ATT GGT TCT TGT GTG ACA GCA TAT TTC C
PACa K660E / D664S REV	GGA AAT ATG CTG TCA CAC AAG AAC CAA TCA ATT CAA TGA CCT CCC CAC C

mutiert. In C1 handelte es sich um die Mutationen K250E G254C(S) bei PAC $\alpha$ , K251E und G255C(S) bei PAC $\beta$ .

In C2 waren es K660E und D664C(S) bei PAC $\alpha$ , K664E und D668C bei PAC $\beta$ . Die verwendeten Oligos für die Mutationen in PAC $\alpha$  sind in Tab. 2.11, die für die Mutationen in PAC $\beta$  sind in Tab. 2.12 aufgeführt.

**Tab. 2.12:** Oligos zur Herstellung der PAC $\beta$  Knockoutmutanten

Name	Sequenz
PACb K251E G255C fwd	GGT GGC AAC ATC GCC GAG TTC ATC ACA TGT ATT TGC ATG GCA TAC
PACb K251E G255C rev	GTA TGC CAT GCA AAT ACA TGT GAT GAA CTC GGC GAT GTT GCC ACC
PACb K664E D668C fwd	GGA GGA GAG GTG ATC GAA CTG ATT GGT TGC TGT GTG ACA GCA TAT TTC C
PACb K664E D668C rev	GGA AAT ATG CTG TCA CAC AGC AAC CAA TCA GTT CGA TCA CCT CTC CTC C



### 2.3.2 Fusionsprotein aus PAC $\alpha$ und CNGA2

Insgesamt wurden drei verschiedene Fusionskonstrukte mit PAC $\alpha$  und CNGA2 hergestellt.

- CNGA2::PAC $\alpha$  / pGEM-HE
- CNGA2::Linker::PAC $\alpha$  / pGEM-HE
- PAC $\alpha$ ::CNGA2 / pGEM-HE

Für das erste Konstrukt wurde die CDS von CNGA2 mit den Primern *CNG fwd NcoI MAMM* und *CNG rev\* EcoRI SacII* (siehe Tab. 2.13) amplifiziert. Über die so generierten Schnittstellen NcoI und SacII wurde die Sequenz auf der 5'-Seite von PAC $\alpha$  inkloniert. Hierbei wurden die im Vektor mit PAC $\alpha$  bereits vorhandenen Schnittstellen NcoI und SacII genutzt.

Eine Variante dieses Konstrukts wurde über das Einfügen eines Linkers erzeugt. Der Linker bestand aus 15 Aminosäuren: [GGGAA]<sub>3</sub>. Hierfür wurden zwei lange (61b, 55b) Oligonukleotide bestellt, die nach dem gegenseitigen Annealing ein doppelsträngiges DNA-Fragment bilden, welches an beiden Enden Überhänge der Schnittstellen EcoRI (5') und SacII (3') besitzt. Die Schnittstellen für EcoRI und SacII im Vektor mit CNGA2::PAC wurden bereits bei der Amplifizierung des CNGA2-Fragments generiert.

Das dritte Konstrukt wurde erzeugt, indem mit den Primern *PAC $\alpha$  3' EcoRI fwd* und *PAC $\alpha$  3' EcoRI rev* im Vektor mit PAC $\alpha$  das Stopcodon in der CDS entfernt und durch eine EcoRI-Schnittstelle ersetzt wurde. Danach wurde die CDS von CNGA2 mit den Primern *CNGA2 fwd EcoRI* und *CNGA2 rev NotI* amplifiziert und über die Schnittstellen EcoRI und NotI in den Vektor kloniert.

**Tab. 2.13:** Oligos zum Einfügen von Schnittstellen zur Herstellung von Fusionsproteinen aus PAC $\alpha$  und CNGA2

Name	Sequenz
CNG fwd NcoI MAMM	GGA TCC ATG GCG ATG ATG ACC GAA AAA TCC
CNG rev* EcoRI SacII	CAC CCG CGG ATG GGA ATT CAG CAG CAG TTG GCT C
CNGA2 LINKER fwd XbaI	AAT TCG GTG GAG GTG CTG CAG GAG GTG GAG CAG CTG GAG GAG GTG CAG CTC TAG ATA CCG C
CNGA2 LINKER rev XbaI	GGT ATC TAG AGC TGC ACC TCC TCC AGC TGC TCC ACC TCC TGC AGC ACC TCC ACC G
CNGA2 fwd EcoRI	CCT GAA TTC ACA TGG ATG ATG ACC GAA AAA TC
CNGA2 rev NotI	CAC GCG GCC GCC CTG GAG TCA GAC CAA GGC TG
PAC $\alpha$ 3' EcoRI fwd	GGG TTC GCA CAA ATA TGA ACA TGA ATT CTA CGG CGA ATC ACT AGT GCG GC
PAC $\alpha$ 3' EcoRI rev	GCC GCA CTA GTG ATT CGC CGT AGA ATT CAT GTT CAT ATT TGT GCG AAC CC

### 2.3.3 PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären

Die Chimären aus PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  wurden erzeugt, indem in den beiden CDS an homologer Stelle eine XbaI-Schnittstelle eingefügt wurde. Die hierfür verwendeten Oligos sind in Tab. 2.14 aufgeführt. Um die Chimären herzustellen, wurden beide Vektoren (PAC $\alpha$  und PAC $\beta$ ) mit XbaI und SpeI geschnitten, auf ein Gel aufgetragen und mit jeweils ausgetauschtem Insert ligiert.

Auf diese Weise wurden folgende Chimären hergestellt:

- PAC $\alpha$ (F1 C1)  $\beta$ (F2 C2 CT) / pGEM-HE
- PAC $\beta$ (F1 C1)  $\alpha$ (F2 C2 CT) / pGEM-HE
- PAC $\alpha$ (F1 C1 F2 C2)  $\beta$ (CT) / pGEM-HE
- PAC $\beta$ (F1 C1 F2 C2)  $\alpha$ (CT) / pGEM-HE

**Tab. 2.14:** Oligos zum Einfügen von Schnittstellen zur Herstellung von PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären

Name	Sequenz
PAC $\alpha$ XbaI fwd	GAA CCA GCC AAA TCT AGA CCA AGT TCA GCG
PAC $\alpha$ XbaI rev	CGC TGA ACT TGG TCT AGA TTT GGC TGG TTC
PAC $\beta$ XbaI fwd	CGG ACC CCC GGC TCT AGA GGC CGG CAG CGC
PAC $\beta$ XbaI rev	GCG CTG CCG GCC TCT AGA GCC GGG GGT CCG
PAC $\alpha$ CT XbaI fwd	CGA CTG TCT CCC AAA CTT CTA GAC ACG GGC ATC GTC CCC
PAC $\alpha$ CT XbaI rev	GGG GAC GAT GCC CGT GTC TAG AAG TTT GGG AGA CAG TCG
PAC $\beta$ CT XbaI fwd	GGA GGT GGA GGC CAT TAC TCT AGA GGT GGG CTA CGC C
PAC $\beta$ CT XbaI rev	GGC GTA GCC CAC CTC TAG AGT AAT GGC CTC CAC CTC G

### 2.3.4 Domänen-Deletionsmutanten in PAC $\alpha$ und PAC $\beta$

Zur Deletion ganzer Domänen wurde die in 2.2.6 beschriebene *in vitro*-Mutagenese genutzt. Die verwendeten Primer (siehe Tab. 2.15) wurden so gewählt, dass sie jeweils vor und hinter dem zu deletierenden Bereich banden. Auf diese Weise wurden folgende Deletionsmutanten erzeugt:

- PAC $\alpha$  dCT / pGEM-HE (Deletion des C-Terminus)
- PAC $\beta$  dCT / pGEM-HE (Deletion des C-Terminus)
- PAC $\alpha$  dF2 / pGEM-HE (Deletion der F2-Domäne)

### 2.3.5 Austausch der Zyklase-Domänen

Die Zyklase-Domänen C1 und C2 von PAC $\alpha$  wurden durch die Zyklase-Domänen der Guanlylatzyklasen GCy35 und GCy36 aus *C. elegans* ausgetauscht. Hierfür wurden die in PAC $\alpha$  vorhandenen Schnittstellen BstXI (C1) und XhoI / Tth111I (C2) verwendet. Außerdem

**Tab. 2.15:** Oligos zur Herstellung der PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ -Deletionsmutanten

Name	Sequenz
PACa dCT fwd	CCA GTT GCG GAT CGA CTG TCT CCC GAG CAA AAG CTG ATC TCG G
PACa dCT rev	CCG AGA TCA GCT TTT GCT CGG GAG ACA GTC GAT CCG CAA CTG G
PACb dCT fwd	GCC CGG GTG ATG GAG GTG GAG GCC GGG GAG CAA AAG CTG ATC TCG G
PACb dCT rev	CCG AGA TCA GCT TTT GCT CCC CGG CCT CCA CCT CCA TCA CCC GGG C
PACa F2 del fwd	GCA TGA TGG CAG GTG GTG AAG GCC AGT CCG CCA CTG AGG AAA TGT TGG CC
PACa F2 del rev	GGC CAA CAT TTC CTC AGT GGC GGA CTG GCC TTC ACC ACC TGC CAT CAT GC

**Tab. 2.16:** Oligos zur Herstellung der Zyklasedomänen-Austauschmutanten

Name	Sequenz
PACa C1 EcoRI fwd	GCC TGT GCA AGT GTA CGA ATT CAA TGC TCC AG
PACa C1 EcoRI rev	CTG GAG CAT TGA ATT CGT ACA CTT GCA CAG GC

wurde auf der 3'-Seite von C1 eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt (siehe Tab. 2.16).

Passend zu diesen Schnittstellen wurde eine *in vitro* synthetisierte CDS bestellt und über Restriktion und Ligation in die PAC $\alpha$ -Sequenz integriert.

### 2.3.6 Veränderung der Substratspezifität von PAC $\alpha$

Um die Substratspezifität von PAC $\alpha$  zu untersuchen, wurden einzelne Aminosäuren der PAC $\alpha$ -CDS mutiert. Dies geschah mit der in 2.2.6 beschriebenen *in vitro* Mutagenese. Die dazu verwendeten Primer sind in Tab. 2.17 aufgeführt. Die dabei erzeugten Mutanten waren:

- PAC $\alpha$  K250E / pGEM-HE
- PAC $\alpha$  K250E D317C / pGEM-HE

- PAC $\alpha$  K250E T319C / pGEM-HE
- PAC $\alpha$  K250E D317C E729R / pGEM-HE
- PAC $\alpha$  K250E T319C E729R / pGEM-HE
- PAC $\alpha$  K250E T319G / pGEM-HE
- PAC $\alpha$  K250E T319G S329Y / pGEM-HE
- PAC $\alpha$  K250E D317K T319C S329Y / pGEM-HE
- PAC $\alpha$  K660E / pGEM-HE
- PAC $\alpha$  K660E E729R / pGEM-HE

**Tab. 2.17:** Oligos zur Veränderung der Substratspezifität von PAC $\alpha$

Name	Sequenz
PACa K250E fwd	GGG CCA AGT GGC AGA GTT CAT CAC TGG GAT TTG
PACa K250E rev	CAA ATC CCA GTG ATG AAC TCT GCC ACT TGG CCC
PACa D317C fwd	GGT TTC CGA AAG GCT TGT TTC ACC CTC CTT GGC
PACa D317C rev	GCC AAG GAG GGT GAA ACA AGC CTT TCG GAA ACC
PACa K660E fwd	GGT GGG GAG GTC ATT GAA TTG ATT GGT GAT TG
PACa K660E rev	CAA TCA CCA ATC AAT TCA ATG ACC TCC CCA CC
PACa E729C fwd	GTT TGG GGA TGA CAT GCT TTG TGG TGG CTG GGG
PACa E729C rev	CCC CAG CCA CCA CAA AGC ATG TCA TCC CCA AAC
PACa T319C fwd	CGA AAG GCT GAT TTC TGC CTC CTT GGC GAC TGC
PACa T319C rev	GCA GTC GCC AAG GAG GCA GAA ATC AGC CTT TCG
PACa E729R fwd	GTT TGG GGA TGA CAC GGT TTG TGG TGG CTG GGG
PACa E729R rev	CCC CAG CCA CCA CAA ACC GTG TCA TCC CCA AAC
PACa T319G fwd	CCG AAA GGC TGA TTT CGG CCT CCT TGG CGA CTG
PACa T319G rev	CAG TCG CCA AGG AGG CCG AAA TCA GCC TTT CGG
PACa S329Y fwd	GCA TCA ACA CTG CCT ATC GGA TCA CCT CGT TG
PACa S329Y rev	CAA CGA GGT GAT CCG ATA GGC AGT GTT GAT GC
PACa D317K T319G fw	GGT TTC CGA AAG GCT AAG TTC GGC CTC CTT GG
PACa D317K T319G rev	CCA AGG AGG CCG AAC TTA GCC TTT CGG AAA CC

**Tab. 2.18:** Zusammensetzung ND96- und Standard ORi-Lösung

ND96		Standard. ORi	
NaCl	96 mM	NaCl	110 mM
KCl	2 mM	KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
MES/NaOH	10 mM	HEPES/NaOH	5 mM
Gentamycin	60 µg/mL	in <i>ddH<sub>2</sub>O</i>	pH 7,6
D-Sorbitol in <i>ddH<sub>2</sub>O</i>	ad 220 mosmol/L pH 7,4		

## 2.4 Arbeiten mit Oocyten

### 2.4.1 Operative Entnahme und Injektion

Die elektrophysiologischen Messungen wurden ausschließlich an Oocyten des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt. Die Frösche wurden in kleinen Gruppen (5-6 Frösche) in Becken bei ca. 20 °C Wassertemperatur gehalten.

Um den Fröschen die Oocyten operativ zu entfernen, mussten diese zuvor betäubt werden. Hierfür wurde der Frosch für 30 min in 1,5 L Wasser mit 1,25 g Tricaine (Ethyl 3-Aminobenzoessäureethylester) gelegt, dem nach den ersten 15 min Eis zugegeben wurde. Zur Operation wurde der Frosch mit Zellstofftüchern bedeckt, die mit Tricainelösung getränkt waren.

Durch ca. 1 cm lange Schnitte in der Bauchhaut und im Muskelgewebe wurde nach Möglichkeit ein vollständiger Ovarlappen entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung in Ca<sup>2+</sup>-haltiger ND96-Lösung (siehe Tab. 2.18) aufbewahrt. Nach der Operation wurden die Schnitte zugenäht, und der Frosch zum Aufwachen in ein gesondertes Becken gesetzt. Nach einem halben Jahr Regenerationszeit hatten die Frösche wieder genügend Oocyten nachgebildet, um für weitere Operationen herangezogen werden zu können.

Die entnommenen Ovarlappen wurden nach der Entnahme unter dem Binokular mit Uhrmacherpinzetten in gleichmäßig kleine Stücke zerteilt, um eine größere Oberfläche für den anschließenden Collagenaseverdau zu bilden. Für diesen Verdau wurden die Oocyten mehrfach mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier ND96-Lösung gewaschen, mit 1–2 mg/mL Collagenase versetzt und für 1–2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Hierbei wurden die Oocyten von Bindegewebe und Follikelzellen befreit.

Danach mussten die Oocyten mehrmals mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier ND96-Lösung gespült werden. Auf diese Weise wurden auch die unreifen und zu kleinen Oocyten entfernt. Zuletzt wurden die Oocyten noch einmal mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger ND96-Lösung gewaschen um sie dann in dieser Lösung bei 16 °C aufzubewahren.

Die Injektion der cRNA wurde mit einem Nanoliter-Injektor (Nanoject<sup>TM</sup>; Drummond Scientific Company) durchgeführt. Die Injektionskapillaren (3.5" Drummond #3-000-203-G/X; Drummond Scientific Company) wurden in einem vertikalen Puller (PP-83; Narishige) in zwei Zügen bei jeweils maximaler Heizleistung ausgezogen. Unter dem Mikroskop wurden die Spitzen der Kapillaren auf ca. 30 µm abgebrochen.

#### 2.4.2 Belichtung der Oocyten

Die Belichtung der Oocyten erfolgte in der Messkammer. Zur Übertragung des Lichts von außerhalb der Kammer diente ein Lichtleiter (PMMA-Lichtfaser 1,5 mm), dessen Enden plan abgeschliffen und anschließend poliert wurden. Als Lichtquelle diente eine LED (Luxeon 1 W Emitter, Blau 470 nm), die zur Abführung der Wärme auf eine Metallplatte geklebt wurde und deren Kunststofflinse über dem Halbleiter entfernt wurde.

Auf diese Weise konnte der Lichtleiter, der zur Übertragung des Lichts in die Messkammer diente, direkt über dem Halbleiter angebracht werden. Das andere Ende des Lichtleiters wurde so in der Messkammer fixiert, dass sich die zu belichtenden Oocyten in weniger als 1 mm Abstand dazu befanden. Die Leistung, mit der das Licht aus dem Lichtleiter austrat,

wurde in regelmäßigen Abständen überprüft.

Zur Belichtung mehrerer Oocyten auf einmal wurden 5-6 Oocyten in ein mit Aluminiumfolie umwickeltes 1,5-mL-Reaktionsgefäß mit 500  $\mu\text{L}$  ND96-Lösung überführt. Die Belichtung erfolgte mit einer LED (Luxeon 3 W Emitter, Blau 470 nm), die im Deckel des Reaktionsgefäßes fixiert war. Die Lichtintensität wurde mit  $2,6 \text{ mW mm}^2$  (10 mmol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) gemessen.

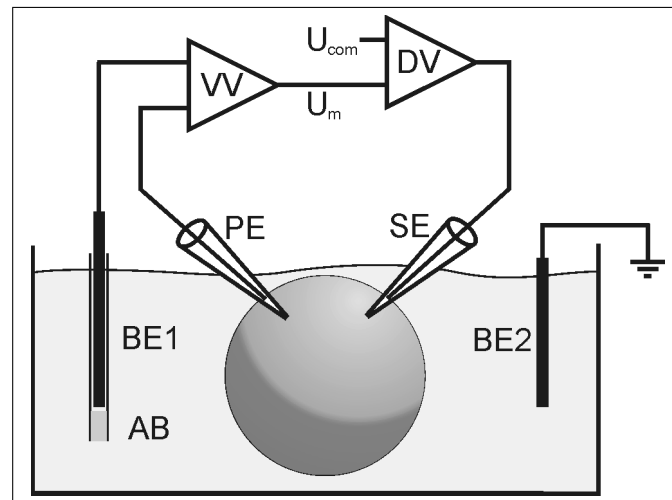
Die Lichtintensität wurde mit dem Gerät LICOR *Li-250a* mit dem *Li-190 Quantum Sensor* als die Anzahl der Photonen pro Quadratmeter und Sekunde bestimmt, die auf dem Sensor auftrafen. Mit dem Gerät *FieldMate<sup>TM</sup> Laser Power Meter* von COHERENT wurde die Leistung in mW gemessen. Um die Werte ineinander umzurechnen, wird das Planck'sche Wirkungsquantum  $h$ , die Lichtgeschwindigkeit  $c$  und die Avogadro'sche Zahl  $N$  benötigt, sowie die Frequenz  $\nu$  des Lichts bzw. dessen Wellenlänge  $\lambda$ . ( $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ Js}$  ( $= \text{Ws}^2$ ),  $c = 3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ ,  $N = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )

Hiermit errechnet sich die Energie eines Mols Photonen mit 470 nm als

$$\begin{aligned}
 E &= h \cdot \nu \cdot N \\
 &= h \cdot \frac{c}{\lambda} \cdot N \\
 E &= \frac{6,63 \times 10^{-34} \text{ Ws}^2 \cdot 3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}}{470 \times 10^{-9} \text{ m}} \cdot 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} \\
 &= 2,55 \times 10^5 \text{ Ws mol}^{-1} = 2,55 \times 10^5 \text{ J mol}^{-1}
 \end{aligned} \tag{1}$$

Der Lichtleiter hat einen Durchmesser von 1,5 mm und somit eine Fläche von  $\sim 1,8 \text{ mm}^2 = 1,8 \times 10^{-6} \text{ m}^2$ . Durch diesen Wert wird die von dem Gerät *FieldMate* gemessene Leistung in mW geteilt, um die Leistung pro Fläche in  $\text{mW m}^{-2}$  zu erhalten. Dieser Wert wird durch  $2,55 \times 10^5 \text{ J mol}^{-1}$  geteilt und es ergibt sich die Anzahl der Photonen pro Zeit und Fläche in  $\text{mmol Photonen mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Um diesen Wert auf den Quadratmeter zu beziehen, muss noch mit  $10^6$  multipliziert werden, was die Einheit  $\text{mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ergibt.





**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der DEVC-Technik. Dargestellt sind der Vorverstärker (VV), der Differenzverstärker (DV), an dem die Sollspannung ( $U_{com}$ ) und die Membranspannung ( $U_m$ ) verglichen werden, die Potialelektrode (PE), die Stromelektrode (SE) und die Badelektroden (BE1 und BE2), von denen eine über eine Agarbrücke (AB) mit dem Badmedium verbunden ist.

## 2.5 Elektrophysiologische Messungen

### 2.5.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (DEVC) ermöglicht die Messung von Strömen über die ganze Zelle bei definiertem Membranpotential. Das Potential, bei dem gemessen werden soll ( $U_{com}$ ), kann an einem Messverstärker eingestellt werden. Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik nach Finkel & Redman (1985) werden zwei Mikroelektroden in eine Oocyte eingestochen.

Die Differenz zwischen dem Badpotential und dem Potential im Inneren der Oocyte stellt das Membranpotential dar. Dieses wird mit der Spannungselektrode und der Badelektrode 1 (BA1, Abb. 2.3) gemessen und über einen Vorverstärker (VV) als  $U_m$  an den Differenzverstärker (DV) weitergegeben.

Der Differenzverstärker vergleicht die Differenz zwischen der Sollspannung  $U_{com}$  und der tatsächlichen Membranspannung  $U_m$  und gibt an seinem Ausgang eine Spannung aus, die

proportional dazu ist. Diese Spannung wird über die Stromelektrode (SE) an die Oocytenmembran angelegt und resultiert somit in einen Strom, der über die Oocytenmembran zur Badelektrode 2 (BE2) und zurück in den Verstärker fließt.

Durch die Verwendung von zwei Elektroden in der Oocyte ist es möglich – trotz des im Vergleich zu den Elektroden geringen Widerstands der Oocytenmembran (siehe 2.5.3) – Strom und Spannung gleichzeitig zu messen.

### 2.5.2 Konventionen

Das Membranpotential ist die Differenz zwischen dem Potential im extrazellulären Raum und dem Potential im Inneren der Zelle. Hierbei ist das Potential im extrazellulären Raum definitionsgemäß Null. Ein Einstrom von positiven Ladungen in die Zelle wird wie ein Ausstrom von negativen Ladungen aus der Zelle als Einstrom bezeichnet und in der Messung als negativer Strom dargestellt. Bei einem positiven Strom fließen positive Ladungen aus der Zelle oder negative Ladungen in die Zelle.

### 2.5.3 Elektroden

Für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik wurden zwei Elektroden in die Oocyten eingestochen, zwei Elektroden befanden sich in der Badlösung. Beim metallischen Leiter aller Elektroden handelte es sich um einen Silberdraht, der elektrolytisch chloriert wurde (siehe Gleichung 2), d. h. auf seiner Oberfläche befand sich eine Silberchloridschicht (AgCl).



Um den Stromkreis für die Stromelektrode zu schließen, wurde der chlorierte Silberdraht in direkter Nähe der Oocyte in der Lösung fixiert (BE2, Abb. 2.3). Für die Badelektrode 1

wurde eine Agarbrücke verwendet: der chlorierte Silberdraht befand sich in einem mit 3 M KCl gefüllten PVC-Schlauch.

Damit kein direkter Kontakt zwischen der Badlösung und der 3 M KCl bestand, war der Schlauch mit einem Pfropfen aus 2% Agar in 3 M KCl verschlossen. Somit wurde gewährleistet, dass sich, bei einer Änderung der  $\text{Cl}^-$ -Konzentration in der Badlösung, das Grenzflächenpotential an der Badelektrode nicht änderte, die elektrische Leitfähigkeit aber weiterhin vorhanden war.

Für die Einstichelektroden wurden Kapillaren aus Borosilikatglas ( $\varnothing=1,5$  mm, Wandstärke 0,15 mm; Hilgenberg) in einem vertikalen Puller in zwei Zügen ausgezogen. Diese wurden mit 0,1% Agar in 3 M KCl-Lösung gefüllt. Der Widerstand der beiden Elektroden lag zwischen  $0,5 \text{ M}\Omega$  und  $1 \text{ M}\Omega$ .

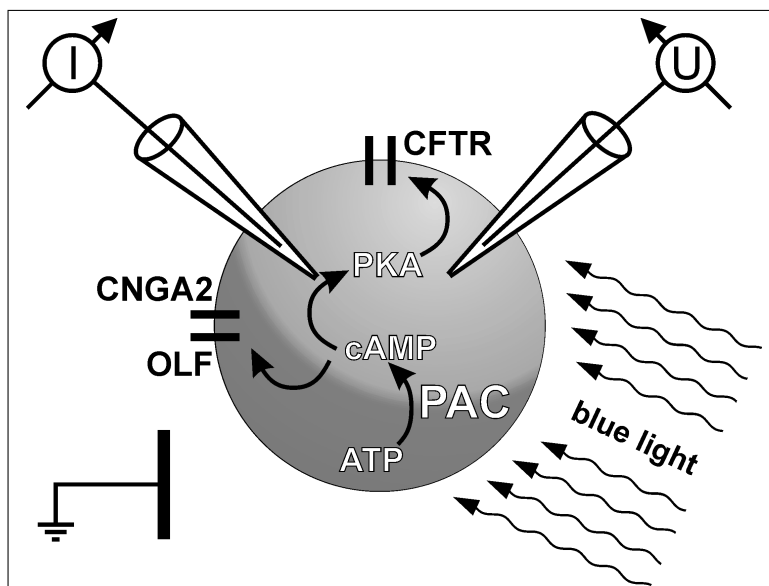
**Tab. 2.19:** Zusammensetzung der für die elektrophysiologischen Messungen verwendeten Lösungen

ORi-NMG		NMG-Aspartat	
NMG	115 mM	NMG	115 mM
$\text{CaCl}_2$	2 mM	$\text{CaCl}_2$	2 mM
$\text{MgCl}_2$	1 mM	$\text{MgCl}_2$	1 mM
HEPES	5 mM	HEPES	5 mM
in $ddH_2O$		in $ddH_2O$	
pH 7,6 eingestellt mit HCl		pH 7,6 eingestellt mit DL-Aspartat	

## 2.5.4 Elektrophysiologische Bestimmung der Zykklaseaktivität

### 2.5.4.1 Versuchsaufbau

Um die Zykklaseaktivität elektrophysiologisch zu bestimmen, wurden neben der PAC weitere Proteine in den Oocyten exprimiert (siehe Tab. 2.20). Dies waren Ionenkanäle, deren Leitwert direkt oder indirekt von der Konzentration an zyklischen Nukleotiden abhing (siehe Abb. 2.4).



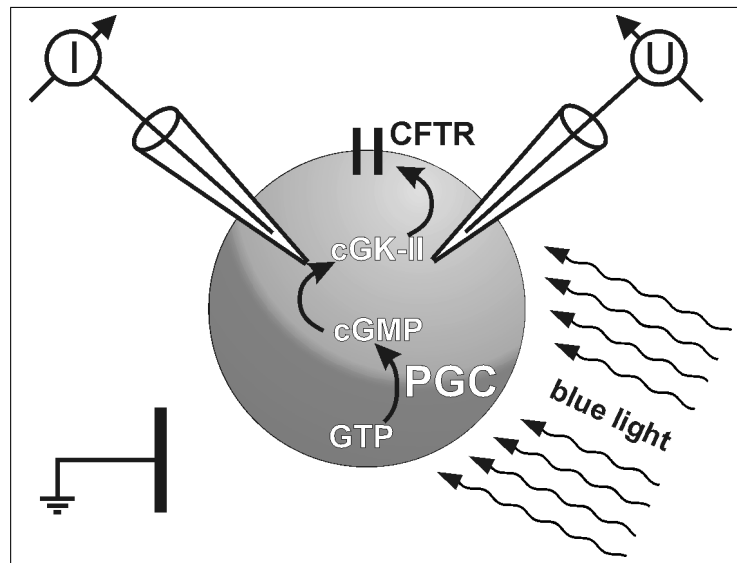
**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Dargestellt sind die die Stromelektrode (I) und die Spannungselektrode (U), sowie die Badlösung als Erde. Nach der Belichtung mit blauem Licht katalysiert PAC die Umsetzung von ATP zu cAMP. Dies aktiviert die Ionenkanäle CNGA2 und OLF, sowie die Proteinkinase A (PKA), welche den Kanal CFTR phosphoryliert, sodass dieser öffnet. [Angepasst mit Erlaubnis von Verlag Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.: Biological Chemistry, (Looser *et al.*, 2009), (©2009)]

**Tab. 2.20:** Exprimierte Ionenkanäle und dazugehörige Halbsättigungswerte für cAMP

Ionenkanal	$K_{1/2}$ [cAMP]
OLF T537S	14 $\mu$ M
CNGA2 C460W/E583M	1 $\mu$ M
CFTR (PKA)	0, 1 $\mu$ M

Der bovine Kanal OLF (Kaupp *et al.*, 1989) gehört ebenso wie der aus der Ratte stammende Kanal CNGA2 (Dhallan *et al.*, 1990) zur Familie der CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide gated*). Sie sind nicht selektive Kationenkanäle und besitzen Bindestellen für zyklische Nukleotide. In Membranen kommen sie als Tetramere vor. Binden zyklische Nukleotide an einen CNG-Kanal, so öffnet dieser und es kann eine Zunahme des Leitwerts gemessen werden.

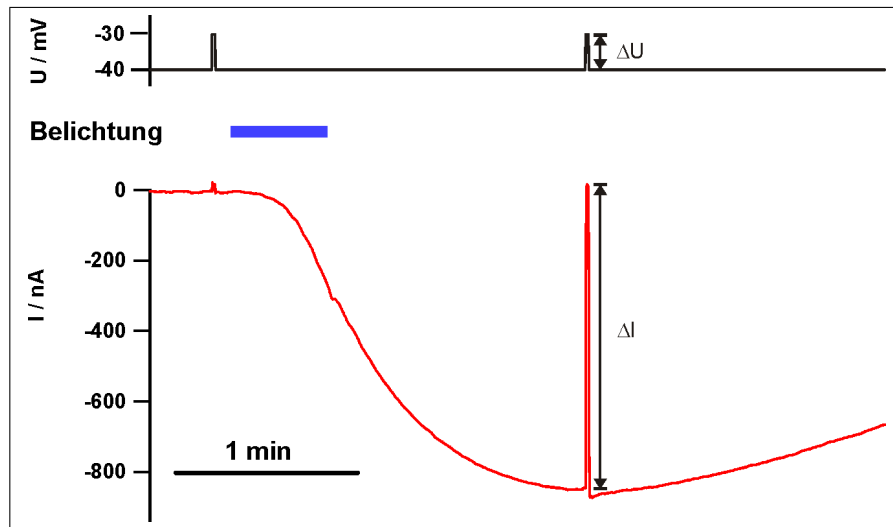
Der Kanal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) besitzt keine Bin-



**Abb. 2.5:** Elektrophysiologische Bestimmung der Guanylatzyklase-Aktivität in Oocyten. Dargestellt sind die Stromelektrode und die Spannungselektrode, sowie die Badlösung als Erde. Durch die Belichtung mit blauem Licht katalysiert die PGC die Umsetzung von GTP in cGMP. Dieses aktiviert die Kinase cGK-II, welche den Kanal CFTR phosphoryliert, woraufhin dieser öffnet. [Angepasst mit Erlaubnis von Verlag Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.: Biological Chemistry, (Looser *et al.*, 2009), (©2009)]

destelle für zyklische Nukleotide (Kerem *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989). Seine Permeabilität wird reguliert durch die Bindung von ATP und durch Phosphorylierung (Cheng *et al.*, 1991). In der regulatorischen Domäne (R-Domäne) besitzt dieser Kanal Sequenzen, die spezifisch von der Proteinkinase A (PKA) erkannt und phosphoryliert werden, woraufhin sich der Kanal öffnet (Cheng *et al.*, 1991) und der Leitwert der Oocytenmembran zunimmt.

Die Aktivität der Proteinkinase A hängt von der cAMP-Konzentration im Cytosol ab. Somit ist der Leitwert des CFTR-Kanals ein indirektes Maß für die cAMP-Konzentration in der Oocyte und kann für die Messung der Zykylaseaktivität der PAC herangezogen werden. Für die Messung der Guanylatzyklaseaktivität war die PKA nicht geeignet. Deshalb wurde die Kinase cGK-II mit CFTR koexprimiert (siehe Abb. 2.5). cGK-II ist eine membrangebundene Proteinkinase (Vaandrager *et al.*, 1996), die durch cGMP aktiviert wird. Sie ist



**Abb. 2.6:** Typischer Verlauf einer elektrophysiologischen Messung der Zyklaseaktivität von PAC. Die Spannung  $U$  (schwarz) springt vor und nach der Belichtung (blauer Balken) kurz von  $-40$  mV auf  $-30$  mV und wieder zurück ( $\Delta U$ ). Durch die Belichtung kommt eine Zunahme des Einstroms (rot) zu Stande, ebenso wird die Stromänderung ( $\Delta I$ ) nach der Belichtung größer. [Angepasst mit Erlaubnis von Verlag Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.: Biological Chemistry, (Looser *et al.*, 2009), (©2009)]

wie die Proteinkinase A in der Lage CFTR zu phosphorylieren (Vaandrager *et al.*, 1997). Eine Koexpression von CFTR und cGK-II führt dazu, dass sich der Leitwert der Oocytenmembran in Abhängigkeit der cytosolischen cGMP-Konzentration ändert.

Um die Zyklaseaktivität der PAC-Mutanten zu bestimmen, wurden sie mit oben genannten Kanälen in Oocyten exprimiert. Zur Messung wurde die Spannung konstant auf  $-40$  mV geklemmt. Zur Bestimmung des Leitwerts wurde die Spannung für 1 s auf  $-30$  mV erhöht (siehe Abb. 2.6).

Direkt im Anschluss erfolgte die Belichtung, welche zwischen 2 s und 32 s dauerte. Während und nach der Belichtung nahm der Einstrom für 60–90 s zu und erreichte dann ein Maximum. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte der zweite Spannungssprung für 1 s auf  $-30$  mV.

### 2.5.4.2 Bestimmung des Leitwerts

Wie in 2.5.4.1 gezeigt, wurde die Spannung vor der Belichtung der Zellen und danach kurzzeitig verändert. Dies diente dazu, den Leitwert der Oocytenmembran zu bestimmen. In Abb. 2.6 ist zu sehen, wie die Änderung der Klemmspannung ( $\Delta U$ ) eine Stromänderung ( $\Delta I$ ) ergibt. Aus ihrem Quotienten konnte der elektrische Leitwert  $G$  errechnet werden (siehe Gleichung 3).

$$G = \frac{1}{R} = \frac{\Delta I}{\Delta U} \quad (3)$$

## 2.6 Immunologische cAMP/cGMP-Bestimmung

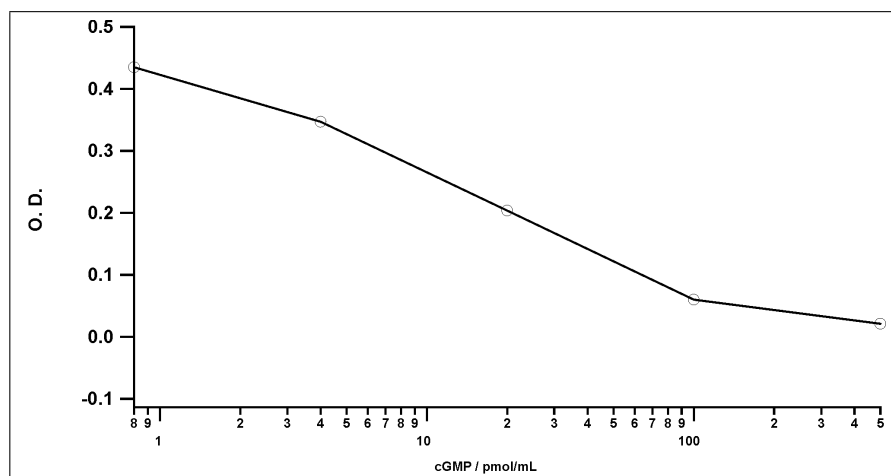
Neben der elektrophysiologischen Bestimmung der cAMP/cGMP-Konzentration in den Oocyten wurde auch ein immunologischer Assay durchgeführt. Für den cAMP-Nachweis wurde das *cyclic AMP Complete EIA Kit*, für den cGMP-Nachweis das *cyclic GMP Complete EIA Kit* (beide ASSAY DESIGNS) verwendet.

Für die Messung wurde jeweils eine Oocyte in 150  $\mu\text{L}$  0,1 M HCl aufgenommen und durch häufiges Pipettieren zerstört. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, 13 000  $g$ ) konnten die Proben weiterverwendet werden. Hierfür wurden je Probe 100  $\mu\text{L}$  in die mit Ziege-anti-Kaninchen IgG Antikörpern beschichteten Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Wurden mehrere Oocyten auf einmal belichtet, wurden diese anschließend in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 750  $\mu\text{L}$  0,1 M HCl überführt und homogenisiert.

Hinzu kam eine Lösung mit einem Konjugat aus dem zu untersuchenden zyklischen Nukleotid und einer alkalischen Phosphatase und eine Lösung mit einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen gegen das zyklische Nukleotid. Während der Inkubation bei Raumtemperatur banden die Antikörper kompetitiv an cAMP/cGMP aus der Probe oder das cAMP/cGMP des Konjugats.

Danach wurden die Wells gewaschen, womit nur noch gebundene Nukleotide zurückblieben, und anschließend mit pNpp Substratlösung versetzt. Das Substrat bildet ein gelbes Produkt, wenn es von der Phosphatase im Konjugat gespalten wird. Durch Zugabe der Stoplösung wurde die Inkubation beendet, und die Proben konnten im Photometer gemessen werden. Der Gehalt an zyklischem Nukleotid war umgekehrt proportional zur gemessenen optischen Dichte.

Der verwendete Antikörper bindet neben den zyklischen Nukleotiden auch andere Nukleotide mit geringer Affinität. Der Hersteller gibt die Kreuzreaktivität des anti-cGMP Antikörpers mit GMP, GTP, cAMP, AMP, ATP, cUMP und CTP mit unter 0,001 % an. Für den anti-cAMP Antikörper wird die Kreuzreaktivität mit AMP als <0,33 %, mit ATP als <0,12 %, und mit cGMP, GMP, GTP, cUMP und CTP jeweils als <0,001 % angegeben. Zur quantitativen Auswertung des cAMP/cGMP Gehalts der Proben, wurden Standards mit bekannten Konzentrationen gemessen, und damit eine Standardkurve erstellt (siehe Abb. 2.7). Anhand dieser Kurve und der für die Proben gemessenen optischen Dichte wurde die Konzentration an zyklischen Nukleotiden in der Probe graphisch ermittelt.



**Abb. 2.7:** Beispiel einer Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration der zyklischen Nukleotide mit den *cyclic AMP/GMP Complete EIA Kits*.

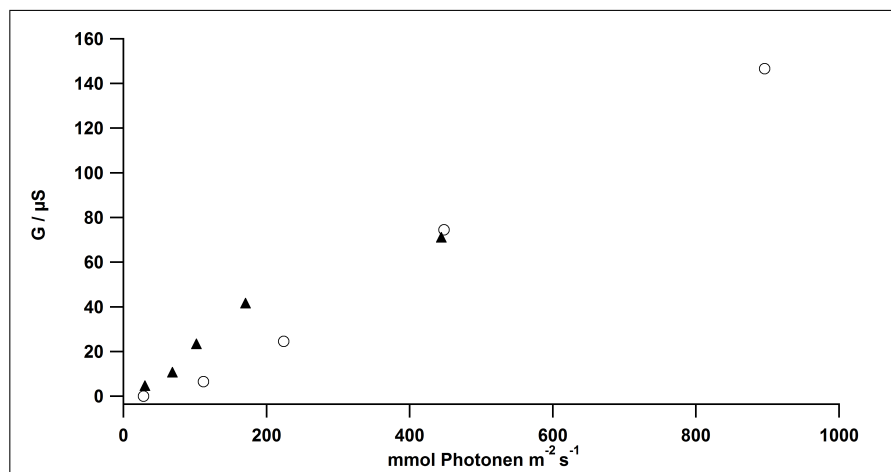


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Lichtabhängigkeit und Kinetik von PAC $\alpha$

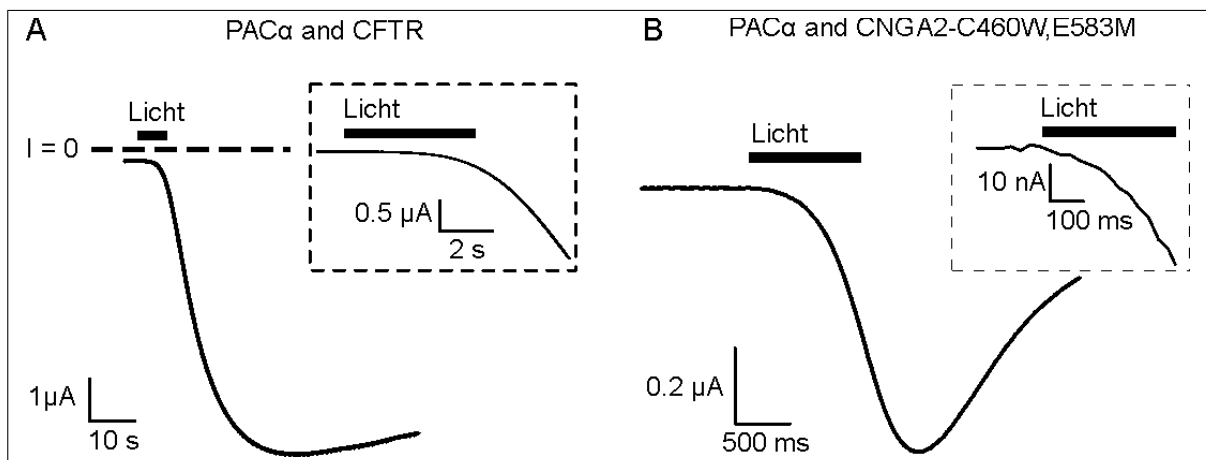
#### 3.1.1 Zyklaseaktivität von PAC $\alpha$ in Abhängigkeit der Lichtintensität

Wie in 2.4.2 erwähnt, erfolgte die Belichtung der Oocyten mit einer LED, deren Licht über einen Lichtleiter in die Messkammer geleitet wurde. Die LED wurde über eine Stromquelle betrieben, an der mehrere verschiedene Stromstärken eingestellt werden konnten. Zu jeder Stromstärke wurde die Lichtleistung am Ausgang des Lichtleiters bestimmt.



**Abb. 3.1:** Leitwert von PAC $\alpha$ - und OLF-exprimierenden Oocyten in Abhängigkeit der Lichtintensität und Beleuchtungsdauer. Belichtet wurde mit 1,9 bis 28 mmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (0,5 - 7 mW mm<sup>-2</sup>) für 16 s (▲) bzw. für 1 bis 32 s mit 28 mmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (7 mW mm<sup>-2</sup>, ○). [Angepasst mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods (Schröder-Lang *et al.*, 2007), (©2007)]

Für die Bestimmung der PAC $\alpha$ -Aktivität in Abhängigkeit der Lichtintensität wurden die CFTR und PAC $\alpha$  exprimierenden Oocyten für 16 s belichtet. Die Intensität des Lichts (Photonenflussdichte) wurde von 1,9 mmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> bis 28 mmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (0,5 - 7 mW mm<sup>-2</sup>) variiert. Nach jeder Belichtung wurde der maximale Leitwert der



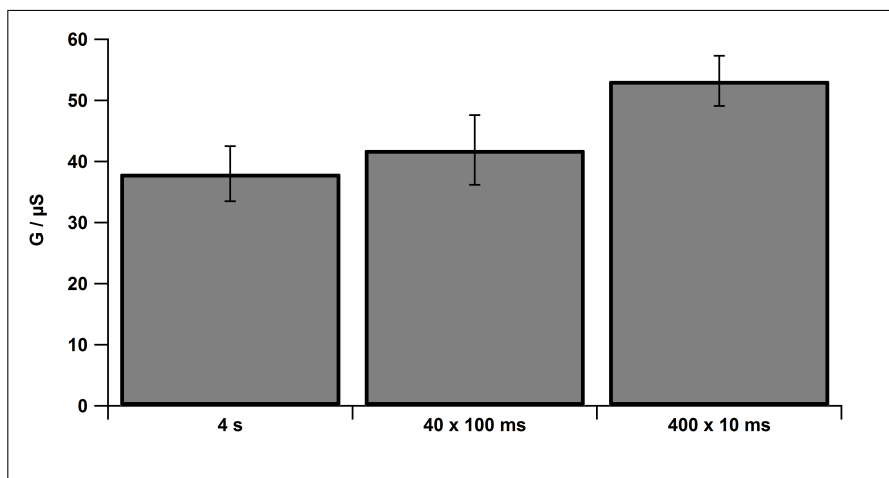
**Abb. 3.2:** A: Stromzunahme nach Belichtung ( $28 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) in Oocyten mit PAC $\alpha$  und CFTR. B: Stromzunahme nach Belichtung in Oocyten mit PAC $\alpha$  und CNGA2. Die Oocyten waren in beiden Fällen auf  $-60 \text{ mV}$  geklemmt. Die Belichtung ist durch den grauen Balken symbolisiert. Eingerahmt dargestellt sind jeweils Ausschnitte, die den Anfang der Stromzunahme zeigen. [Angepasst mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods (Schröder-Lang *et al.*, 2007), (©2007)]

Oocyten bestimmt. Zur Bestimmung der PAC $\alpha$ -Aktivität in Abhängigkeit der Belichtungsdauer wurden die Oocyten mit  $28 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) für 2 s bis 32 s belichtet. Danach wurde ebenfalls der maximale Leitwert der Oocyten ermittelt.

In Abb. 3.1 wurden die ermittelten Leitwerte aus beiden Versuchen gegen die Photonendichte (Photonenflussdichte  $\times$  Zeit) aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass sowohl mit zunehmender Belichtungsdauer als auch mit zunehmender Lichtintensität der maximale Leitwert ansteigt. Nach einer Belichtung mit  $28 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) für 16 s war der Leitwert mit  $\sim 70 \mu\text{S}$  halb so groß wie nach 32 s Belichtung mit  $28 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $7 \text{ mW mm}^{-2}$ ), wo der Leitwert  $\sim 140 \mu\text{S}$  betrug.

### 3.1.2 Kinetik der PAC $\alpha$ -Aktivität

In Abb. 3.2 ist der Stromverlauf von DEVC-Messungen in *Xenopus*-Oocyten mit PAC $\alpha$  dargestellt. Nach Belichtung konnte eine Zunahme des Einstroms beobachtet werden. Außerdem ist in Abb. 3.2 A zu erkennen, dass in Oocyten mit PAC $\alpha$  und CFTR innerhalb



**Abb. 3.3:** Bestimmung der Deaktivierungskinetik: Die Oocyten wurden unterschiedlich langen Lichtpulsen belichtet (10 ms - 4 s). Die Anzahl der Lichtpulse wurde so gewählt, dass sie jeweils mit  $10,7 \mu\text{mol}$  Photonen belichtet wurden ( $1 \times 4 \text{ s}$ ,  $40 \times 100 \text{ ms}$ ,  $400 \times 10 \text{ ms}$ ). Ein signifikanter Unterschied ( $p=0,01$ ) ergab sich zwischen den Leitwerten bei  $1 \times 4 \text{ s}$  und  $400 \times 10 \text{ ms}$  Belichtung. Der Unterschied zwischen den Leitwerten bei  $1 \times 4 \text{ s}$  und  $40 \times 100 \text{ ms}$  ist nicht signifikant. Die injizierten RNA-Mengen waren: PAC $\alpha$   $0,2 \text{ ng}$ , CFTR,  $5 \text{ ng}$ . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar ( $n=3$ ).

von 10 s nach Beginn der Belichtung mit  $28 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) die Stromzunahme einsetzte.

In Oocyten mit PAC $\alpha$  und CNGA2 setzte, wie in Abb. 3.2 zu sehen ist, die Stromzunahme bereits innerhalb der 2 s Belichtungszeit ein. Sogar 100 ms nach Belichtungsbeginn konnte eine Zunahme des Einstroms beobachtet werden. Somit lag die Aktivierungszeit von PAC $\alpha$  in einem Bereich von unter 100 ms. Desweiteren ist in Abb. 3.2 zu sehen, dass der Einstrom nach dem Ende der Belichtung weiter ansteigt. Somit konnte auf diese Art keine Aussage über die Deaktivierungskinetik gemacht werden. Deshalb wurden Leitwertmessungen durchgeführt, für die die Belichtung in Form von mehreren kurzen Lichtpulsen erfolgte.

In Abb. 3.3 ist der maximale Leitwert der Oocyten dargestellt, welche PAC $\alpha$  und CFTR exprimierten. Belichtet wurden die Oocyten mit  $10,7 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $2,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) mit einer Gesamtdauer von jeweils 4 s. Die Belichtung fand statt als ein Puls von 4 s Länge, als 40 Pulse mit 100 ms (dazwischen je 100 ms Dunkelheit) und als 400 Pulse mit 10 ms

Länge (dazwischen je 40 ms Dunkelheit). Die Zeit zwischen den einzelnen Pulsen entsprach der Pulslänge.

Zu erkennen ist, dass mit Verkürzung der Pulse der Leitwert zunahm. Der Unterschied zwischen 38  $\mu$ S bei 4 s Belichtung und 42  $\mu$ S bei  $40 \times 100$  ms war noch nicht signifikant. Bei  $400 \times 10$  ms konnte eine signifikante Zunahme der Leitfähigkeit auf 53  $\mu$ S beobachtet werden. Somit lag die Deaktivierungszeit im Bereich von 10 ms.

### 3.2 PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ - Knockoutmutanten

Die Photoaktivierte Adenylatzyklase PAC enthält neben den Photodomänen und dem C-Terminus auch zwei Zyklasedomänen C1 und C2. Diese enthalten alle für die Umsetzung von ATP in cAMP benötigten Aminosäuren. Diese sind zum Einen an der Bindung der Metallionen, zum Anderen an der Stabilisierung der Übergangszustände während der Phosphatummesterung beteiligt. Durch Vergleiche der Aminosäuresequenz von PAC mit bekannten Adenylat- und Guanylatzyklasen (siehe Abb. 3.4) konnten die beteiligten Aminosäuren aus PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  identifiziert werden. In Tabelle 3.1 sind die so ermittelten Aminosäuren und ihre jeweilige Funktion aufgeführt.

Neben den an der katalytischen Umsetzung beteiligten Aminosäuren gibt es auch solche, die für die Substratspezifität verantwortlich sind. Diese waren Ziel der Mutagenese für die Konversion von PAC in PGC, eine Photoaktivierte Guanylatzyklase (siehe 3.8).

Für die Knockoutmutanten von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  wurden jeweils zwei Aminosäuren in C1 oder in C2 mutiert. Die daraus entstandenen Mutanten sind in Tab. 3.2 aufgeführt. Alle wurden in Oocyten exprimiert um ihre Zyklaseaktivität zu messen. Oocyten, die 5 ng CFTR und 5 ng der PAC-Mutanten exprimierten, wurden mit der DEVC-Methode gemessen. Dabei konnte weder eine Erhöhung des Einstroms noch eine Änderung des Leitwerts durch Belichtung beobachtet werden (siehe 3.3). Außerdem wurde der cAMP-Gehalt der



**Tab. 3.1:** Aminosäuren aus den Zyklasedomänen von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  und ihre Rolle während der Umsetzung von ATP in cAMP

PAC-Domäne	Metall-Bindung	Stabilisierung des Übergangszustands	Substratspezifität
PAC $\alpha$	C1	(Tyr 209)	Asn 326, Arg 330
	C2	Asp 620, Asp 664	Lys 250, Asp 317, Thr 319, Ser 329
PAC $\beta$	C1	(Tyr 210)	Asn 327, Arg 331
	C2	Asp 624, Asp 668	Lys 251, Asp 318, Thr 320, Ser 330

**Tab. 3.2:** PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ -Knockoutmutanten

PAC-Domäne	Mutanten
PAC $\alpha$	C1   PAC $\alpha$ K250E G254C; PAC $\alpha$ K250E G254S
	C2   PAC $\alpha$ K660E D664C; PAC $\alpha$ K660E D664S
PAC $\beta$	C1   PAC $\beta$ K251E G255C
	C2   PAC $\beta$ K664E D668C

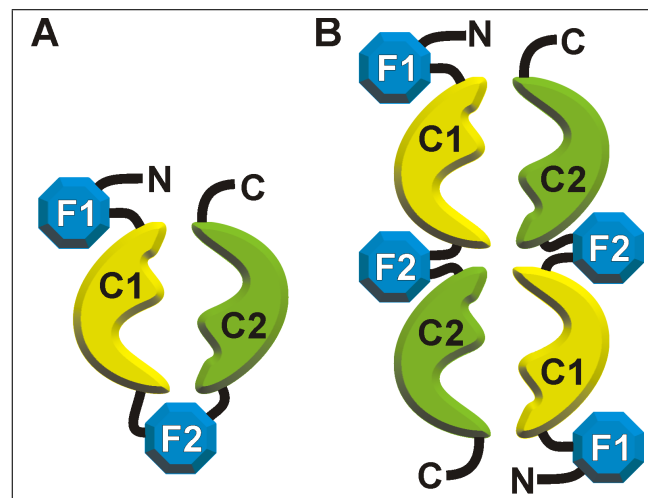
Oocyten nach 5 min Belichtung ( $10,7 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 2,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) bestimmt.

Hier war ebenfalls keine Veränderung gegenüber Kontrollzellen erkennbar.

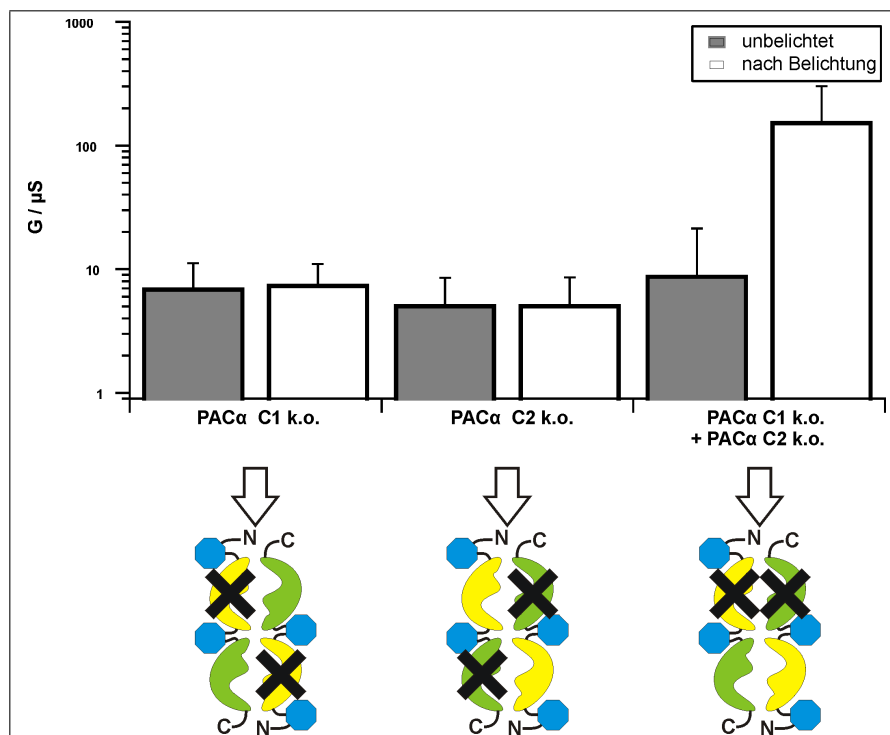
Somit führten die Mutationen in den Zyklasedomänen C1 und C2 von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  zu einer so starken Verminderung der Aktivität, dass sie mit den verwendeten Methoden nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

### 3.3 Dimerisierung von PAC $\alpha$ und PAC $\beta$

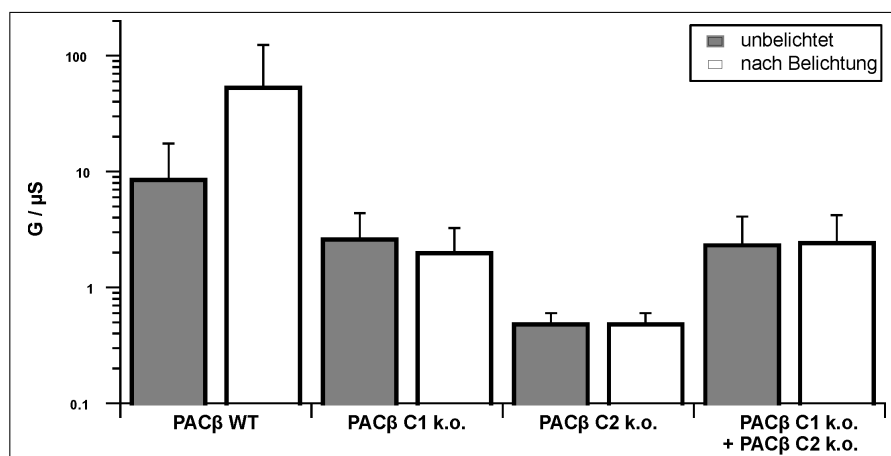
Um ein katalytisches Zentrum ausbilden zu können, müssen die Zyklasedomänen aus PAC dimerisieren (Tesmer *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Bei PAC muss ein Dimer aus den Zyklasedomänen C1 und C2 gebildet werden, wofür es zwei Möglichkeiten gibt: intramolekular und intermolekular (siehe Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** Die Möglichkeiten der Dimerisierung bei PAC: intramolekular (A) und intermolekular (B). Dargestellt sind N-Terminus (N), C-Terminus (C), Zyklasedomänen 1 und 2 (C1, C2), FAD-bindende Domänen 1 und 2 (F1, F2). [Angepasst mit Erlaubnis von Verlag Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.: Biological Chemistry, (Looser *et al.*, 2009), (©2009)]



**Abb. 3.6:** Leitwertmessung mit PACα-Knockoutmutanten in CFTR-exprimierenden Oocyten. Es waren jeweils 5 ng RNA der PACα-Mutanten und von CFTR injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ . [Angepasst mit Erlaubnis von Verlag Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.: Biological Chemistry, (Looser *et al.*, 2009), (©2009)]



**Abb. 3.7:** Leitwertmessung mit PACβ-Knockoutmutanten in CFTR-exprimierenden Oocyten. Es waren jeweils 5 ng RNA der PACα-Mutanten und von CFTR injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

Wie in 3.2 beschrieben, zeigten die PAC-Knockoutmutanten keine Zyklaseaktivität, wenn sie einzeln in Oocyten exprimiert wurden. Deshalb wurden diese Mutanten herangezogen, um Aussagen über die Art der Dimerisierung bei PAC treffen zu können.

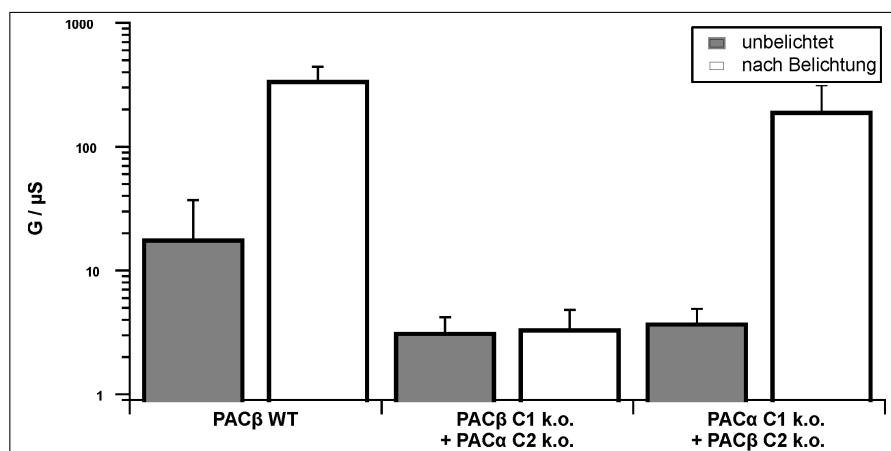
In Abb. 3.6 sind die Leitwerte von CFTR-exprimierenden Oocyten vor und nach Belichtung ( $32 \text{ s}$ ,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) dargestellt. Die Oocyten mit den einzeln exprimierten Mutanten hatten einen Dunkelleitwert von  $8 \mu\text{S}$  (*PACα C1 k.o.*) bzw.  $5 \mu\text{S}$  (*PACα C2 k.o.*), welcher durch Belichtung nicht erhöht wurde.

Im Gegensatz dazu konnte in Oocyten, die sowohl *PACα C1 k.o.* als auch *PACα C2 k.o.* exprimierten eine Erhöhung des Leitwerts von  $10 \mu\text{S}$  auf  $160 \mu\text{S}$  beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass die Dimerisierung von PACα intermolekular stattfinden musste (siehe Abb. 3.6).

Nach diesem Modell bildete jeweils die Zyklasedomäne C1 des einen Proteins ein funktionelles Zentrum mit der Zyklasedomäne 2 des anderen PAC-Proteins. Somit bestand eine funktionelle Einheit aus zwei PAC-Molekülen und enthielt zwei katalytische Zentren.

Was in Abb. 3.6 für PACα gezeigt werden konnte, sollte in Abb. 3.7 für PACβ gezeigt





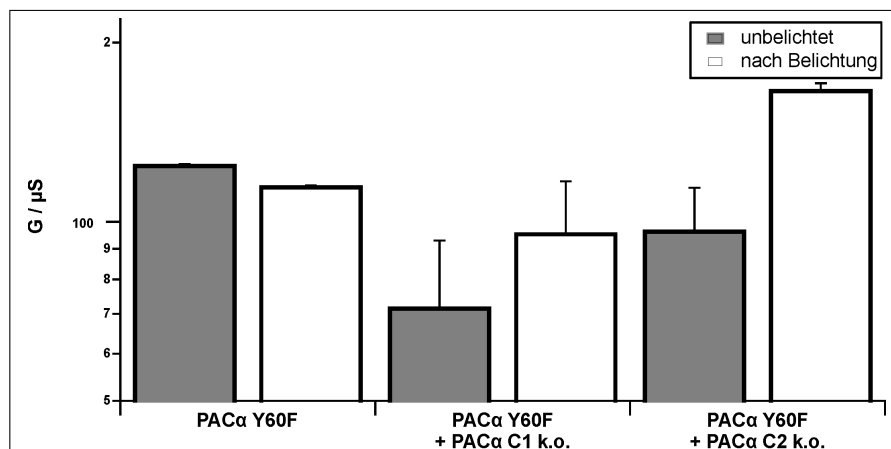
**Abb. 3.8:** Leitwertmessung mit PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ -Knockoutmutanten in CFTR-exprimierenden Oocyten. Es waren jeweils 5 ng RNA der PAC-Mutanten und von CFTR injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

werden. Hierfür wurden ebenfalls elektrophysiologische Messungen an *Xenopus*-Oocyten durchgeführt, die mit 5 ng CFTR-RNA und jeweils 10 ng RNA der PAC $\beta$ -Mutanten injiziert waren.

Dargestellt ist der Leitwert der Oocyten, vor und nach deren Belichtung (32 s,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ )). In Oocyten mit PAC $\beta$ -Wildtyp war eine Änderung des Leitwerts durch Belichtung erkennbar. Dieser lag im Dunkeln bei  $9 \mu\text{S}$ , nach Belichtung bei  $55 \mu\text{S}$ . Die anderen Oocyten wiesen zwar unterschiedlich hohe Dunkelleitwerte auf, doch änderten sich diese durch Belichtung nicht.

Nun sollte untersucht werden, ob eine Dimerisierung nicht nur zwischen je zwei PAC $\alpha$ - oder zwei PAC $\beta$ -Molekülen zustande kommen kann, sondern ob PAC $\alpha$  auch mit PAC $\beta$  ein funktionsfähiges Dimer bilden kann. Zu diesem Zweck wurden elektrophysiologische Messungen an *Xenopus*-Oocyten mit 5 ng CFTR-RNA und je 1 ng RNA der PAC-Knockoutmutanten durchgeführt.

In Abb. 3.8 ist dargestellt, wie sich die Leitwerte der Oocyten durch Belichtung (32 s,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) verändern. Oocyten mit dem Wildtyp von



**Abb. 3.9:** Leitwertmessung mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten und PAC $\alpha$  Y60F in CFTR-exprimierenden Oocyten. Es waren jeweils 5 ng RNA der PAC-Mutanten und von CFTR injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s (34 mmol Photonen  $m^{-2} s^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

PAC $\beta$  hatten einen Leitwert von 18  $\mu\text{S}$  im Dunkeln und 345  $\mu\text{S}$  nach der Belichtung. Eine Koexpression von PAC $\beta$  C1 k.o. mit PAC $\alpha$  C2 k.o. führte zu einem Dunkelleitwert der Oocyten von 3  $\mu\text{S}$ , welcher auch nach Belichtung unverändert blieb.

Im Gegensatz dazu konnte bei einer Koexpression von PAC $\alpha$  C1 k.o. mit PAC $\beta$  C2 k.o. eine Leitwertänderung beobachtet werden. In diesen Oocyten lag der Leitwert vor der Belichtung bei 4  $\mu\text{S}$  und erreichte nach der Belichtung 194  $\mu\text{S}$ . Somit konnte eine Dimerisierung von PAC $\alpha$  mit PAC $\beta$  nachgewiesen werden.

Ein weiterer Nachweis für die Dimerisierung zwischen zwei PAC $\alpha$ -Molekülen gelang bei der Koexpression weiterer PAC $\alpha$ -Mutanten. Diese waren zum Einen eine Knockoutmutante PAC $\alpha$  C1 k.o. bzw. PAC $\alpha$  C2 k.o., und zum Anderen die Mutante PAC $\alpha$  Y60F, welche zwar noch eine dem Wildtyp ähnliche Zyklaseaktivität im Dunkeln besitzt, aber durch Licht nicht weiter aktiviert werden kann (Looser *et al.*, 2009).

Hierfür wurden jeweils 25 pg der Mutanten- und 0,5 ng CFTR-RNA in *Xenopus*-Oocyten injiziert und die Leitwerte der Oocyten vor und nach einer Belichtung mit 34 mmol Photonen  $m^{-2} s^{-1}$  (8,7  $\text{mW mm}^{-2}$ ) für 32 s bestimmt (siehe Abb. 3.9). Bei einer Koexpression

der *PAC $\alpha$  Y60F* mit *PAC $\alpha$  C1 k.o.* erhöhte sich der Leitwert durch Belichtung von 72  $\mu$ S auf 92  $\mu$ S.

In Kombination mit der Mutante *PAC $\alpha$  C2 k.o.* führte eine Koexpression mit *PAC $\alpha$  Y60F* zu einer Leitwerterhöhung von 97  $\mu$ S auf 167  $\mu$ S durch Belichtung. Durch die Wiederherstellung der Lichtaktivierbarkeit konnte somit auch in diesem Versuch gezeigt werden, dass *PAC $\alpha$*  ein funktionelles intermolekulares Dimer bildet (siehe Abb. 3.5).

## 3.4 Austausch der Zyklasedomänen

### 3.4.1 Austausch mit GCY-35

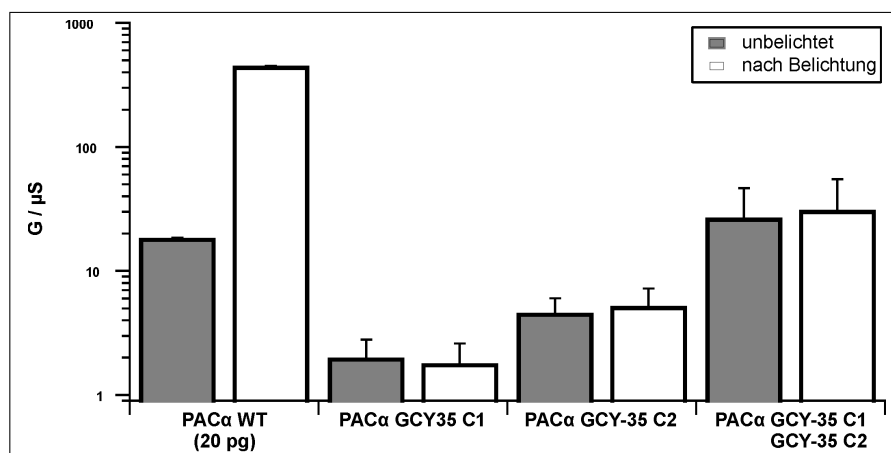
Cheung *et al.* (2004) haben die Proteine GCY-35 und GCY-36 aus *C. elegans* als lösliche Guanylatzyklase-Untereinheiten identifiziert. Hierbei entspricht GCY-35 der  $\alpha$ -Untereinheit und GCY-36 der  $\beta$ -Untereinheit von Säuger-Guanylatzyklasen.

Zur Umsetzung von GTP in cGMP steuert die  $\alpha$ -Untereinheit ein metallbindendes Asparat bei, welches in C1 von *PAC $\alpha$*  der Aminosäure Asp660 entspricht. Die  $\beta$ -Untereinheit enthält ein Asparagin, welches der Aminosäure Asn326 in C1 von *PAC $\alpha$*  entspricht.

Durch Austausch einer ganzen Zyklasedomäne sollte die Substratspezifität von *PAC $\alpha$*  von ATP zu GTP verschoben werden. Hierfür wurden über die Restriktion und Ligation die Zyklasedomänen von *PAC $\alpha$*  ausgeschnitten und die industriell synthetisierten DNA-Fragmente von GCY-35 bzw. GCY-36 stattdessen eingefügt.

Um die Aktivität der so entstandenen Domänen austausch-Mutanten zu untersuchen, wurden DEVC-Experimente durchgeführt (siehe 2.5.1). Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Mutanten gemeinsam mit dem Ionenkanal CFTR und der cGMP-abhängigen Proteinkinase cGK-II in *Xenopus*-Oocyten exprimiert (siehe 2.5.4).

Zunächst wurde nur die Zyklasedomäne aus GCY-35 in *PAC $\alpha$*  kloniert. Daraus entstanden drei Klone: im Ersten ersetzte die Domäne aus GCY-35 die C1 aus *PAC $\alpha$*  (*PAC $\alpha$  GCY-35*

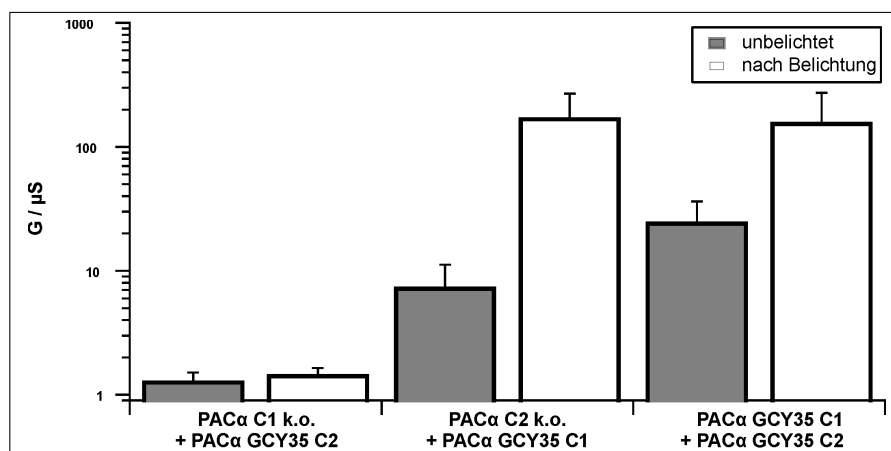


**Abb. 3.10:** Leitwertmessungen an CFTR-exprimierenden Oocyten mit PAC $\alpha$ -Mutanten, deren Zyklasedomänen gegen die Zyklasedomäne aus GCY-35 ersetzt wurde. Es waren jeweils 10 ng RNA der PAC-Mutanten, 20 pg von PAC $\alpha$  WT und 5 ng von CFTR injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

*C1*), im Zweiten die C2 aus PAC $\alpha$  (*PAC $\alpha$  GCY-35 C2*). Im dritten Klon wurde die Zyklasedomäne aus GCY-35 sowohl an Stelle der C1 als auch der C2 in PAC $\alpha$  kloniert (*PAC $\alpha$  GCY-35 C1 GCY-35 C2*).

Diese drei Klone wurden zunächst einzeln in Oocyten mit CFTR und cGK-II exprimiert. In Abb. 3.10 sind die Leitwerte vor und nach der Belichtung für 16 s mit  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) blauem Licht dargestellt. Ein Unterschied im Leitwert ist nur beim Wildtyp erkennbar. Hier lag der Dunkelleitwert bei  $20 \mu\text{S}$ , der Leitwert nach Belichtung bei  $450 \mu\text{S}$ . Bei den drei Zyklasedomänen-Austauschmutanten war keine lichtinduzierte Änderung des Leitwerts erkennbar. Der Dunkelleitwert variierte von  $2 \mu\text{S}$  bei der Mutante *PAC $\alpha$  GCY-35 C1* bis  $27 \mu\text{S}$  bei der Mutante *PAC $\alpha$  GCY-35 C1 GCY-35 C2*. Bei den elektrophysiologischen Messungen konnte bei allen drei Zyklasedomänen-Austauschmutanten keine Leitwertänderung beobachtet und somit keine Zyklaseaktivität nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob die Zyklasedomänen-Austauschmutanten korrekt translatiert wurden, wurden Koexpressionsexperimente durchgeführt. In Abb. 3.11 ist die Leitwertmessung



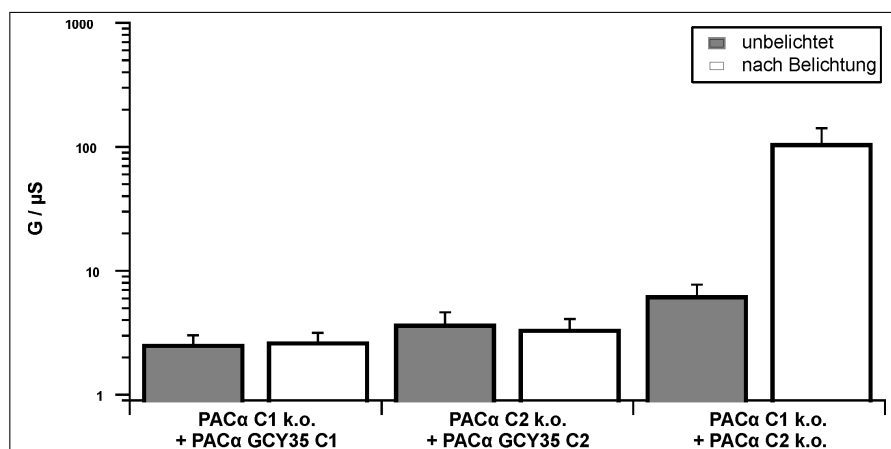
**Abb. 3.11:** Leitwertmessungen an CFTR-exprimierenden Oocyten mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten und PAC $\alpha$ -Mutanten, deren Zyklasedomänen gegen die Zyklasedomäne aus GCY-35 ersetzt wurde. Es waren jeweils 5 ng RNA der PAC-Mutanten und von CFTR injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ .

in Oocyten mit CFTR, cGK-II und den PAC $\alpha$ -Mutanten vor und nach Belichtung für 16 s mit  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) dargestellt. Zu erkennen ist, dass der Leitwert bei einer Koexpression von PAC $\alpha$  C1 k.o. mit PAC $\alpha$  GCY-35 C2 mit um die  $1,5 \mu\text{S}$  sehr niedrig war und sich durch die Belichtung nicht messbar änderte.

Bei einer Koexpression von PAC $\alpha$  C2 k.o. mit PAC $\alpha$  GCY-35 C1 lag der Leitwert im Dunkeln bei  $7,5 \mu\text{S}$  und konnte durch Belichtung auf  $172 \mu\text{S}$  erhöht werden. Eine Koexpression von PAC $\alpha$  GCY-35 C1 mit PAC $\alpha$  GCY-35 C2 führte ebenfalls zu einer Leitwerterhöhung, hier von  $25 \mu\text{S}$  auf  $160 \mu\text{S}$ . Somit konnte gezeigt werden, dass die Zyklasedomänen-Austauschmutanten korrekt translatiert wurden.

Zur Überprüfung des Modells der Dimerisierung zweier PAC $\alpha$ -Untereinheiten (siehe 3.3) wurden Koexpressionsexperimente durchgeführt, bei denen jeweils zwei verschiedene C1-Mutanten oder zwei C2-Mutanten miteinander exprimiert wurden. Wie in Abb. 3.12 dargestellt, führte weder die Koexpression von PAC $\alpha$  C1 k.o. mit PAC $\alpha$  GCY-35 C1 noch die von PAC $\alpha$  C2 k.o. mit PAC $\alpha$  GCY-35 C2 zu einer Erhöhung des Leitwerts durch Licht.

Dies bestätigte das Modell der Dimerisierung, wonach eine funktionelle Einheit aus einer



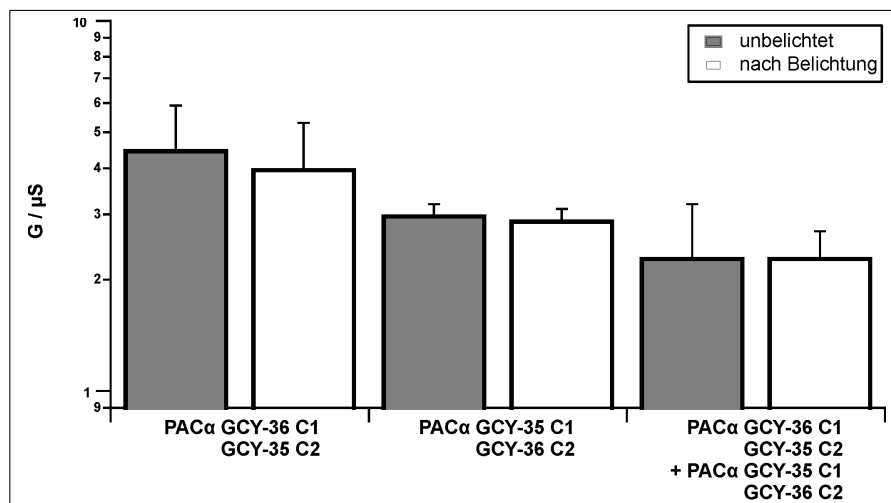
**Abb. 3.12:** Leitwertmessungen an CFTR-exprimierenden Oocyten mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten und PAC $\alpha$ -Mutanten, deren Zyklasedomänen gegen die Zyklasedomäne aus GCY-35 ersetzt wurde. Es waren jeweils 5 ng RNA der PAC-Mutanten und von CFTR injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ .

intakten C1- und einer intakten C2-Domäne von zwei verschiedenen Peptiden bestehen muss. Außerdem wurde so nachgewiesen, dass die Zyklasedomänen-Austauschmutanten korrekt translatiert wurden.

### 3.4.2 Austausch mit GCY-35 und GCY-36

Die Guanylatzyklase-Untereinheiten GCY-35 und GCY-36 aus *C. elegans* bilden *in vivo* ein funktionelles Dimer (Cheung *et al.*, 2004). Um dieses Dimer innerhalb des lichtaktivierten Proteins PAC $\alpha$  zu exprimieren, wurden die Zyklasedomänen C1 und C2 aus PAC $\alpha$  durch GCY-35 und GCY-36 ersetzt. Dadurch entstanden zwei verschiedene Mutanten: PAC $\alpha$  GCY-35 C1 GCY-36 C2 und PAC $\alpha$  GCY-36 C1 GCY-35 C2.

Die beiden Mutanten wurden jeweils getrennt und zusammen in Oocyten mit CFTR und cGK-II exprimiert. Wie in Abb. 3.13 zu erkennen ist, konnte weder bei der einzelnen Expression der Mutanten, noch deren Koexpression eine Erhöhung des Leitwerts durch Belichtung beobachtet, und somit auch keine Zyklaseaktivität nachgewiesen werden. In allen drei Fällen lag der Leitwert der Oocyten zwischen 2  $\mu\text{S}$  und 5  $\mu\text{S}$ .



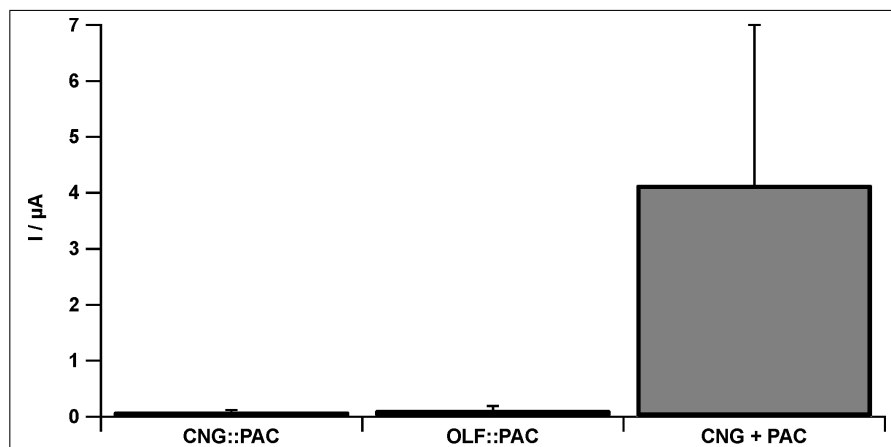
**Abb. 3.13:** Leitwertmessungen an CFTR-exprimierenden Oocyten mit PAC $\alpha$ -Mutanten, deren Zyklasedomänen gegen die Zyklasedomäne aus GCY-35 und aus GCY-36 ersetzt wurde. Es waren jeweils 5 ng RNA der PAC-Mutanten, von cGK-II und von CFTR injiziert. Die Belichtungszeit betrug 4 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

## 3.5 Fusionsprotein aus PAC $\alpha$ und CNGA2

### 3.5.1 N-terminale Fusion von CNGA2 an PAC $\alpha$

Die Fusion des Kanals CNGA2 mit der Photoaktivierten Adenylatzyklase PAC $\alpha$  sollte die Proteine in räumliche Nähe zueinander bringen. Somit sollte die Aktivität des Kanals erhöht und dessen Aktivierung beschleunigt werden. Um quantitative Aussagen über die Effektivität dieser Fusion machen zu können, wurde das Fusionsprotein CNGA2::PAC $\alpha$  mit dem bereits vorhandenen Fusionsprotein OLF::PAC $\alpha$  verglichen. Für die Herstellung dieser Fusionsproteine wurden jeweils Mutanten der Kanäle verwendet, die eine höhere Empfindlichkeit gegenüber cAMP aufwiesen als der Wildtyp. Für CNGA2 war dies die Mutante *C460W E583M* und für OLF die Mutante *T537S*.

Wie in Abb. 3.14 dargestellt, war die Aktivität des neu hergestellten Fusionsproteins CNGA2::PAC $\alpha$  geringer als die des Fusionsproteins OLF::PAC $\alpha$ . So konnte bei CNGA2::PAC $\alpha$  nach einer Belichtung für 16 s mit  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$



**Abb. 3.14:** Vergleich der maximalen lichtinduzierten Ströme in Oocyten mit den Fusionsproteinen CNG::PAC $\alpha$  und OLF::PAC $\alpha$  und den Einzelproteinen CNGA2 und PAC $\alpha$ . Die Messung fand bei -40 mV statt. Belichtet wurde für 16 s mit 34 mmol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Die Menge an injizierter RNA war 20 ng bei Fusionsproteinen und jeweils 10 ng bei Einzelproteinen. Die gezeigten Werte stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung dar,  $n=4$ .

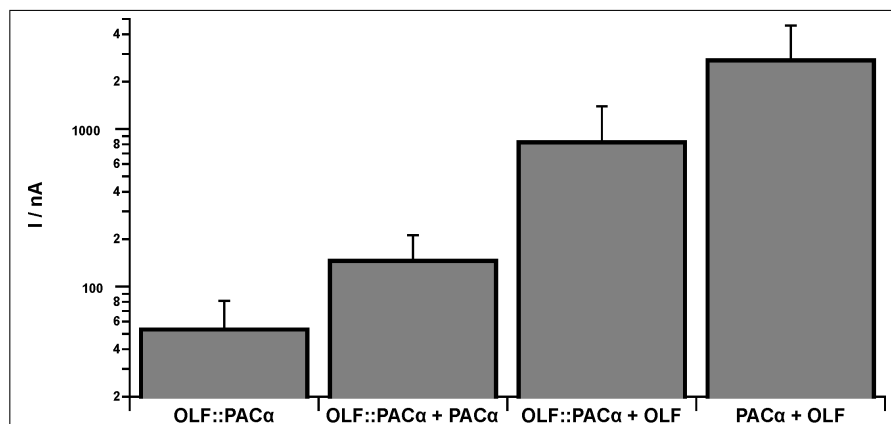
( $8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) nur eine Stromerhöhung um 90 nA gegenüber dem Dunkelstrom beobachtet werden, bei OLF::PAC $\alpha$  waren es 120 nA.

Darüberhinaus wiesen beide Fusionsproteine eine deutlich geringere Aktivität auf als eine Koexpression von PAC $\alpha$  und CNGA2, bei der unter denselben Bedingungen eine Stromerhöhung um  $4,14 \mu\text{A}$  auftrat.

Um zu untersuchen, welcher Teil des Fusionsproteins in seiner Funktion beeinträchtigt war, wurden Koexpressionsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde jeweils das Fusionsprotein OLF::PAC $\alpha$  mit PAC $\alpha$  oder mit OLF koexprimiert. In Abb. 3.15 ist zu sehen, dass die durch die Belichtung ( $16 \text{ s}$ ,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) hervorgerufene Zunahme des Stroms im Fall des Fusionsproteins ohne Koexpression mit 55 nA am geringsten war.

Eine Koexpression mit PAC $\alpha$  steigerte die Stromzunahme auf 150 nA, Koexpression mit OLF auf 847 nA. Die größte lichtinduzierte Stromzunahme mit 2800 nA konnte bei einer Koexpression der beiden Einzelproteine beobachtet werden. Das bedeutet, dass sowohl OLF





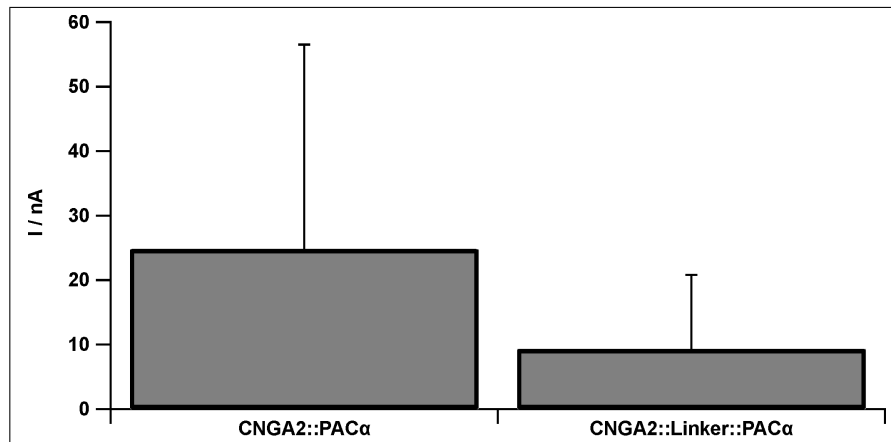
**Abb. 3.15:** Maximaler lichtinduzierter Strom in Oocyten mit dem Fusionsprotein OLF::PAC $\alpha$  in Koexpression mit OLF bzw. PAC $\alpha$ . Die Messung fand bei -40 mV statt. Belichtet wurde für 16 s mit 34 mmol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (8,7 mW  $\text{mm}^{-2}$ ). Die Menge an injizierter RNA war 20 ng bei Fusionsproteinen und jeweils 10 ng bei Einzelproteinen. Die gezeigten Werte stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung dar, n=4.

als auch PAC im Fusionsprotein in ihrer Funktion beeinträchtigt waren, der OLF-Teil aber wesentlich stärker gehemmt war.

### 3.5.2 Einfügen eines Linkerpeptids zwischen CNGA2 und PAC $\alpha$

Die geringe Aktivität des Fusionsproteins gegenüber den einzelnen Proteinen legte nahe, dass beide Proteine sich durch die Fusion gegenseitig sterisch behindern könnten. Um dies zu untersuchen, wurde ein weiteres Fusionsprotein erzeugt, wobei zwischen PAC $\alpha$  und CNGA2 ein Linkerpeptid eingefügt war. Das Linkerpeptid bestand aus 15 Aminosäuren: [GGAAA]<sub>3</sub>.

In Abb. 3.16 ist zu erkennen, dass das Einfügen dieses Linkerpeptids nicht zu der erwarteten Aktivitätssteigerung führte. Im direkten Vergleich der Fusionsproteine CNGA2::PAC $\alpha$  und CNGA2::Linker::PAC $\alpha$  führte die Belichtung (16 s, 34 mmol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) im Fall des Fusionsproteins ohne Linker zu einer Stromzunahme von 25 nA, beim Fusionsprotein mit Linker zu einer Zunahme von 9 nA.



**Abb. 3.16:** Vergleich der maximalen lichtinduzierten Ströme in Oocyten mit den Fusionsproteinen CNG::PAC $\alpha$  und CNG::LINKER::PAC $\alpha$ . Die Messung fand bei -40 mV statt. Belichtet wurde für 16 s mit 34 mmol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (8,7 mW  $\text{mm}^{-2}$ ). Die Menge an injizierter RNA war jeweils 20 ng. Die gezeigten Werte stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung dar,  $n=6$ .

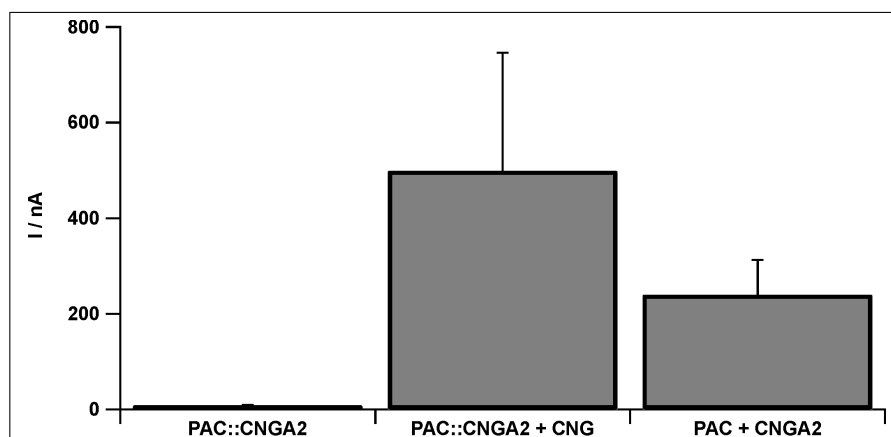
### 3.5.3 C-terminale Fusion von CNGA2 an PAC $\alpha$

Um zu untersuchen, ob eine Änderung der Reihenfolge beider Proteine im Fusionsprotein Einfluss auf dessen Aktivität hat, wurde CNGA2 C-terminal an PAC $\alpha$  fusioniert. Dies brachte nicht die erwünschte Verbesserung. Wie in Abb. 3.17 zu erkennen ist, lag die lichtinduzierte Stromzunahme dieses Fusionsproteins mit 6 nA deutlich unter der Stromzunahme bei einer Koexpression der Einzelproteine mit 240 nA. Bei einer Koexpression des Fusionsproteins mit dem Kanal CNGA2 konnte mit 500 nA eine Stromzunahme gemessen werden, die höher war als bei der Koexpression von PAC $\alpha$  und CNGA2.

## 3.6 Domänen-Deletionsmutanten in PAC $\alpha$ und PAC $\beta$

### 3.6.1 Deletion des C-Terminus

Um mehr über die Funktion der verschiedenen Domänen in PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  zu erfahren, wurden einzelne Proteindomänen deletiert. So wurde bei PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  der C-Terminus



**Abb. 3.17:** Maximaler lichtinduzierter Strom in Oocyten mit dem Fusionsprotein PAC $\alpha$ ::CNGA2 in Koexpression mit CNGA2 bzw. PAC $\alpha$ . Die Messung fand bei -40 mV statt. Belichtet wurde für 8 s mit 34 mmol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (8,7 mW  $\text{mm}^{-2}$ ). Die Menge an injizierter RNA war 20 ng bei Fusionsproteinen und jeweils 10 ng bei Einzelproteinen. Die gezeigten Werte stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung dar, n=5.

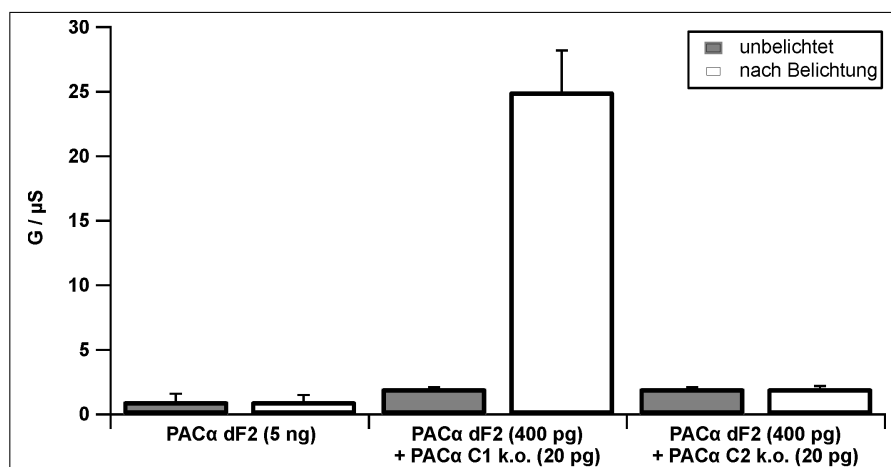
direkt nach dem Ende der zweiten Zyklasedomäne (C2) entfernt (PAC $\alpha$ : 225 AS, Lys767 - Thr991; PAC $\beta$ : 67 AS, Ile750 - Ser816).

Die so entstandenen Mutanten PAC $\alpha$  *dCT* und PAC $\beta$  *dCT* zeigten in elektrophysiologischen Untersuchungen keine Zyklaseaktivität. Wurden diese Mutanten mit CFTR in Oocyten exprimiert, konnte keine Änderung des Leitwerts beobachtet werden.

Die C-Terminus-Deletionsmutanten von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  wurden außerdem jeweils mit C1- und C2-Knockoutmutanten von PAC $\alpha$  und CFTR in Oocyten exprimiert. Auch hierbei war keine lichtinduzierte Leitwertänderung messbar.

### 3.6.2 Deletion der F2-Domäne

Eine weitere Mutante, bei der eine vollständige Domäne deletiert wurde, war PAC $\alpha$  *dF2*. Hier wurde die Photodomäne 2 (93 AS, Leu467 - Thr559) vollständig entfernt. Diese Mutante wurde gemeinsam mit CFTR in *Xenopus* Oocyten exprimiert und deren Zyklaseaktivität elektrophysiologisch bestimmt.



**Abb. 3.18:** Leitwertmessungen CFTR-exprimierenden Oocyten mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten und PAC $\alpha$ -Mutanten, deren FAD-bindende Domäne F2 deletiert wurde. Es waren jeweils 5 ng CFTR-RNA injiziert, die Mengen an injizierter RNA der PAC $\alpha$ -Mutanten ist angegeben. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung, n=3.

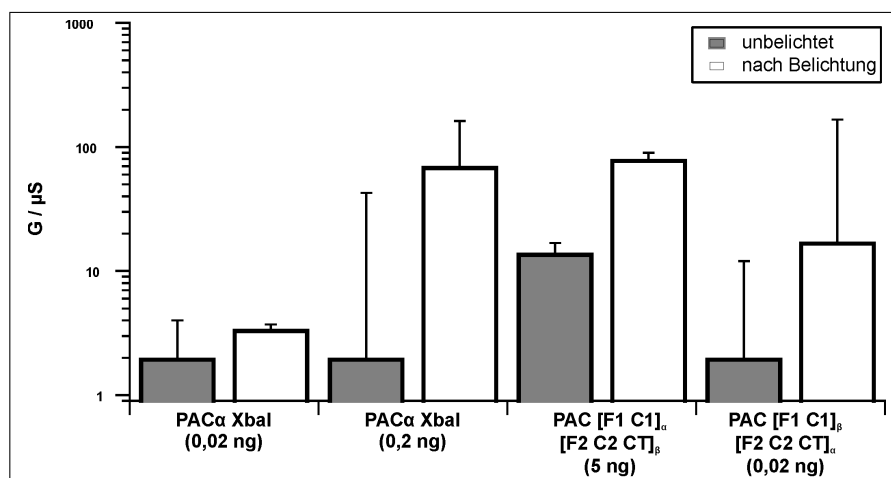
Wie in Abb. 3.18 zu erkennen ist, war bei einer Expression der Mutante *PAC $\alpha$  dF2* alleine keine Zyklaseaktivität nachweisbar. Wurden jedoch Zyklasedomänen-Knockoutmutanten koexprimiert, so konnte eine Leitwerterhöhung in Oocyten beobachtet werden.

Bei einer Koexpression von *PAC $\alpha$  dF2* mit *PAC $\alpha$  C1 k.o.* erhöhte sich der Leitwert nach Belichtung ( $32 \text{ s}$ ,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) von  $2 \mu\text{S}$  auf  $25 \mu\text{S}$ . Im Gegensatz dazu blieb der Leitwert in Oocyten mit *PAC $\alpha$  dF2* und *PAC $\alpha$  C2 k.o.* unverändert bei  $2 \mu\text{S}$ .

### 3.7 PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären

Durch Restriktion und Ligation von pGEM-Vektoren mit PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  wurden PAC-Chimären hergestellt, die aus den F1- und C1-Domänen des einen, und den F2- und C2-Domänen mit C-Terminus des anderen Proteins bestanden (*PAC[F1 C1] $_{\alpha}$  [F2 C2 CT] $_{\beta}$*  und *PAC[F1 C1] $_{\beta}$  [F2 C2 CT] $_{\alpha}$* ).

In elektrophysiologischen Messungen in *Xenopus*-Oocyten wurde die Zyklaseaktivität die-



**Abb. 3.19:** Leitwertmessung in CFTR-exprimierenden Oocyten mit Chimären aus PAC $\alpha$  und PAC $\beta$ . Es waren jeweils 5 ng CFTR-RNA injiziert, die Mengen an injizierter RNA der PAC $\alpha$ -Mutanten ist angegeben. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ .

ser Chimären untersucht. Zum Vergleich wurde die Mutante *PAC $\alpha$  XbaI* verwendet. Sie stellte den Ausgangspunkt für die Herstellung der Chimären dar und enthielt an der Stelle, an der PAC $\alpha$  geschnitten wurde eine XbaI-Schnittstelle.

Wurden 0,02 ng RNA dieser Mutante mit 0,5 ng CFTR-RNA in Oocyten exprimiert, erhöhte sich deren Leitwert durch Belichtung von  $8 \mu\text{S}$  auf  $23 \mu\text{S}$  (siehe Abb. 3.19). Wurde die RNA jeweils in zehnfacher Menge injiziert, lag der Leitwert im Dunkeln bei  $157 \mu\text{S}$  und nach Belichtung ( $32 \text{ s}$ ,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) bei  $974 \mu\text{S}$ .

In Oocyten mit je 5 ng CFTR- und *PAC[F1 C1] $_{\alpha}$  [F2 C2 CT] $_{\beta}$* -RNA erhöhte sich der Leitwert durch Belichtung von  $14 \mu\text{S}$  auf  $80 \mu\text{S}$ . Die Chimäre *PAC[F1 C1] $_{\beta}$  [F2 C2 CT] $_{\alpha}$*  führte bei Expression in Oocyten (0,02 ng, 0,5 ng CFTR) zu einer lichtinduzierten Leitwerterhöhung von  $46 \mu\text{S}$  auf  $305 \mu\text{S}$ .

Somit konnte gezeigt werden, dass diese Chimären aus PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  noch Zykylaseaktivität besaßen. Darüberhinaus ist aus Abb. 3.19 ersichtlich, dass diejenige Chimäre mit den Domänen F2 C2 und dem C-Terminus aus PAC $\alpha$ , also *PAC[F1 C1] $_{\beta}$  [F2 C2 CT] $_{\alpha}$* , eine deutlich höhere Aktivität besitzt als *PAC[F1 C1] $_{\alpha}$  [F2 C2 CT] $_{\beta}$* .

### 3.8 Veränderung der Substratspezifität von PAC $\alpha$

#### 3.8.1 Bestimmung der zu mutierenden Aminosäuren

Tucker *et al.* (1998) beschrieben, wie durch einen Austausch von zwei Aminosäuren aus der membrangebundenen Guanylatzyklase RetGC-1 (*Bos taurus*) eine Adenylatzyklase wurde. Ähnlich zeigten Sunahara *et al.* (1998) die Rolle zweier Aminosäuren bei der Substratspezifität und machten aus einer löslichen Guanylatzyklase (AC2; *Rattus norvegicus*) eine unspezifische Purinnukleotid-Zyklase.

Außerdem konnten Kasahara *et al.* (2001) zeigen, dass aus der Adenylatzyklase CyaG (*Spirulina platensis*) eine Guanylatzyklase werden konnte, wenn drei Aminosäuren ausgetauscht wurden. In Tab. 3.3 sind die erwähnten Mutationen und deren Auswirkungen auf die Substratspezifität dargestellt.

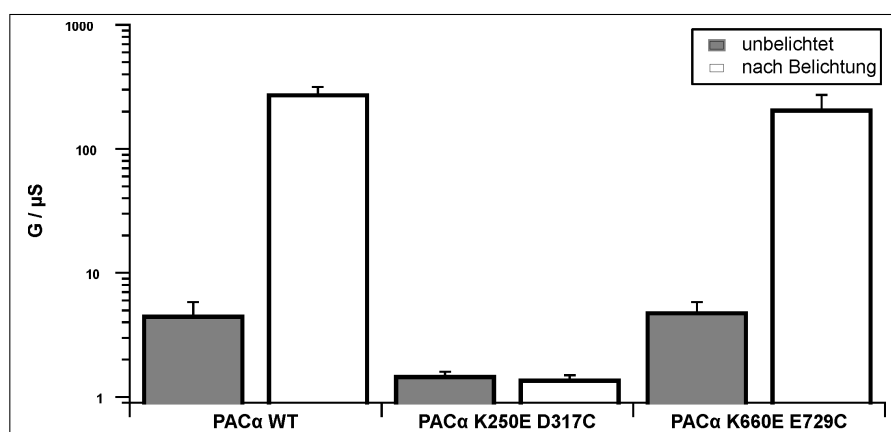
**Tab. 3.3:** Mutationen in Purinnukleotid-Zyklasen mit Auswirkungen auf die Substratspezifität. Die Angaben sind den aufgeführten Arbeiten entnommen.

Autor	Zyklase	Mutationen	Auswirkung
Tucker <i>et al.</i> (1998)	RetGC-1	E925K; C995D	$GC \rightarrow AC$
Sunahara <i>et al.</i> (1998)	VC <sub>1</sub> /IIC <sub>2</sub>	K938E; D1018C	$AC \rightarrow \text{unspezifisch}$
Sunahara <i>et al.</i> (1998)	$\alpha_1\beta_1$	E525K; R592Q; C594D	$GC \rightarrow AC$
Kasahara <i>et al.</i> (2001)	CyaG	K533E; I603R; D605C	$AC \rightarrow GC$

Analog dazu sollte nun aus der Adenylatzyklase PAC $\alpha$  eine Guanylatzyklase (PGC) gemacht werden. Durch einen Sequenzvergleich der oben erwähnten Nukleotidzyklasen mit PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  (siehe Abb. 3.20) wurden die entsprechenden Aminosäuren und die notwendigen Mutationen bestimmt.

Bos taurus Ret GC-1 (GC)	920	D V Y K V E T I G D A	930	992	T M P R Y C L F G D T	1002
Rat alpha_1/beta_1 (GC)	520	D V Y K V E T I G D A	530	589	K M P R Y C L F G D T	599
Rat VC_1/IIC_2 (AC)	933	G V E K I K T I G S T	943	1013	Q K P Q Y D I W G N T	1023
Spirulina CyaG (AC)	528	K L E K I K T I G D A	538	600	K K F I Y D L W G D A	610
PACa C1 (AC)	245	G G Q V A K F I T G I	255	314	R K A D F T L L G D C	324
PACb C1 (AC)	246	G G N I A K F I T G I	256	315	R K S D F T L L G D C	325
PACa C2	655	G G E V I K L I G D C	675	726	G M T E F V V A G E V	736
PACb C2	659	G G E V I K L I G D C	669	730	G L T E Y V V A G A V	740

**Abb. 3.20:** Sequenzvergleich von Teilen der Zyklasedomänen der im Text erwähnten Nukleotidzyklasen mit PAC $\alpha$  und PAC $\beta$ . Gemäß Tab. 3.3 wurden die zu verändernden Aminosäuren identifiziert (eingerahmt).

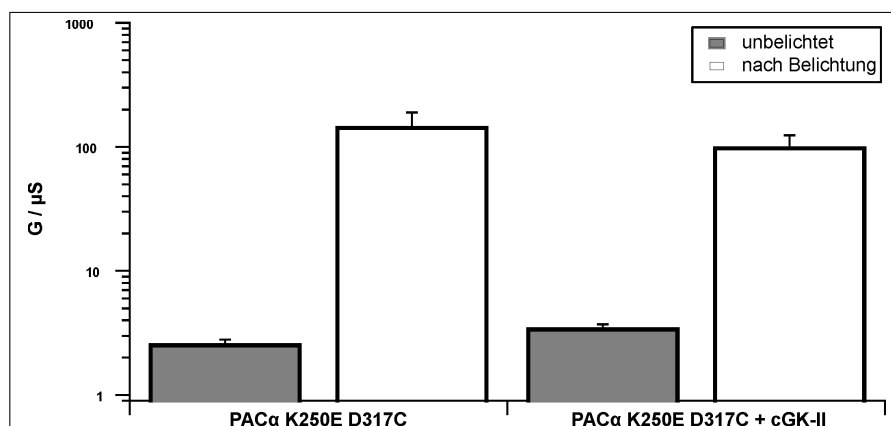


**Abb. 3.21:** Leitwertmessungen in OLF-exprimierenden Oocyten mit PAC $\alpha$  K250E D317C und PAC $\alpha$  K660E E729C. Es waren jeweils 0,5 ng RNA der PAC $\alpha$ -Mutanten und 0,5 ng OLF-RNA injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s (34 mmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>  $\hat{=}$  8,7 mW mm<sup>-2</sup>). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler, n=3.

### 3.8.2 PAC $\alpha$ K250E D317C und PAC $\alpha$ K660E E729C

Zunächst wurden die Mutanten PAC $\alpha$  K250E D317C und PAC $\alpha$  K660E E729C hergestellt. Sie wurden in Oocyten exprimiert, um ihre Zyklaseaktivität zu untersuchen. Hierfür wurden jeweils 0,5 ng der PAC-Mutanten-RNA mit 0,5 ng RNA des CNG-Kanals OLF (Kaupp *et al.*, 1989) in die Oocyten injiziert und die Proteine exprimiert.

Nach vier Tagen wurde der Leitwert der Oocyten elektrophysiologisch bestimmt, und untersucht, wie sich dieser durch Belichtung veränderte. Dabei ergab sich, dass PAC $\alpha$  K660E E729C eine Zyklaseaktivität besitzt, die mit der des Wildtyps von PAC $\alpha$  vergleichbar ist. Der Leitwert der Oocyten, die diese Mutante exprimierten, stieg durch Belichtung (4s,



**Abb. 3.22:** Leitwertmessungen in CFTR- und PACα K250E D317C-exprimierenden Oocyten mit und ohne cGK-II. Die injizierten RNA-Mengen waren jeweils 5 ng CFTR, 10 ng cGK-II und 200 pg der PAC-Mutante. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

$34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) von  $5 \mu\text{S}$  auf über  $200 \mu\text{S}$  an (siehe Abb 3.21). Dass es sich hierbei um eine Adenylatzyklaseaktivität handelt wurde dadurch deutlich, dass sich durch eine zusätzliche Expression von cGK-II keine Steigerung der Aktivität beobachten ließ (ohne Abbildung).

Für die Mutante *PACα K250E D317C* ließ sich nach vier Tagen Koexpression mit OLF keine Zykylaseaktivität nachweisen. In Oocyten mit OLF und der Mutante in oben genannten Mengen lag der Leitwert vor und nach Belichtung um  $2 \mu\text{S}$ .

Wurden  $0,2 \text{ ng}$  der Mutante mit  $5 \text{ ng}$  CFTR-RNA für neun Tage exprimiert, konnte durch lange Belichtungszeiten ( $32 \text{ s}$ ,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) eine Leitwertänderung beobachtet werden. Sie stieg in diesem Fall von  $2,6 \mu\text{S}$  auf  $150 \mu\text{S}$  an (siehe Abb. 3.22).

Auch hierbei handelte es sich um eine Adenylatzyklaseaktivität. Bei einem Vergleich der Leitwertänderung der Oocyten, die CFTR und *PACα K250E D317C* mit und ohne cGK-II exprimierten, konnte keine erhöhte Zunahme durch cGK-II beobachtet werden (siehe Abb. 3.22).

Vergleichbar den Oocyten ohne cGK-II stieg hier der Leitwert von  $3,5 \mu\text{S}$  auf  $100 \mu\text{S}$ . Außer-



dem zeigten immunologische cAMP- und cGMP-Messungen in belichteten Oocyten (siehe 2.6) weder einen erhöhten cGMP- noch cAMP-Gehalt im Vergleich zu nicht-injizierten Kontrollloocyten auf.

So konnte für die Mutanten *PAC $\alpha$  K250E D317C* und *PAC $\alpha$  K660E E729C* keine Guanylatzyklaseaktivität nachgewiesen werden. Beide Mutanten besaßen noch Adenylatzyklaseaktivität, wobei die Aktivität von *PAC $\alpha$  K250E D317C* gegenüber der des Wildtyps deutlich eingeschränkt war.

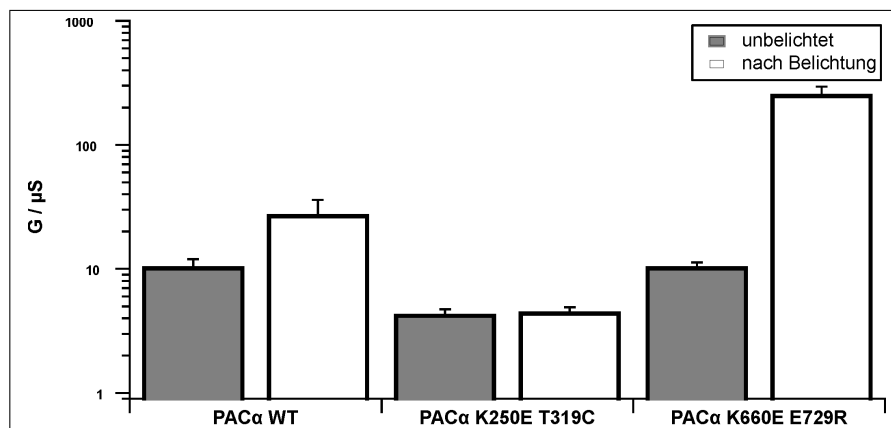
### 3.8.3 PAC $\alpha$ K250E T319C und PAC $\alpha$ K660E E729R

Nachdem die Mutationen aus 3.8.2 (*PAC $\alpha$  K250E D317C* und *PAC $\alpha$  D660E E729C*) nicht zu der erhofften Veränderung der Substratspezifität führten, wurden andere Aminosäuren verändert. Dadurch entstanden die Mutanten *PAC $\alpha$  K250E T319C* und *PAC $\alpha$  D660E E729R*.

Um die Zyklaseaktivität der Mutanten zu untersuchen, wurden jeweils 10 ng RNA der Mutanten mit 10 ng RNA des Kationenkanals OLF in *Xenopus*-Oocyten injiziert. Die Oocyten wurden mit 34 mmol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) für 32 s belichtet und der Leitwert vorher und nachher bestimmt.

Dabei stellte sich heraus, dass die C2-Mutante *PAC $\alpha$  D660E E729R* eine Adenylatzyklaseaktivität besitzt, die mindestens der des Wildtyps entspricht (siehe Abb. 3.23). Während beim PAC $\alpha$ -Wildtyp eine Leitwerterhöhung von 10  $\mu\text{S}$  auf 30  $\mu\text{S}$  zu sehen war, stieg in der Mutante *PAC $\alpha$  D660E E729R* der Leitwert von 10  $\mu\text{S}$  auf 250  $\mu\text{S}$ .

Im Gegensatz dazu zeigte sich für die C1-Mutante *PAC $\alpha$  K250E T319C* keine Leitwertänderung. Der Leitwert der Oocyten lag vor und nach der Belichtung um 4,5  $\mu\text{S}$  (siehe Abb. 3.23). Da der Kanal OLF sowohl auf cAMP als auch auf cGMP durch eine Änderung des Leitwerts reagiert hätte, konnte für diese Mutante keine Zyklaseaktivität nachgewiesen werden.



**Abb. 3.23:** Leitwertmessungen in OLF-exprimierenden Oocyten mit *PACα K250E T319C* und *PACα K660E E729R*. Es waren jeweils 10 ng RNA der *PACα*-Mutanten und 10 ng OLF-RNA injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

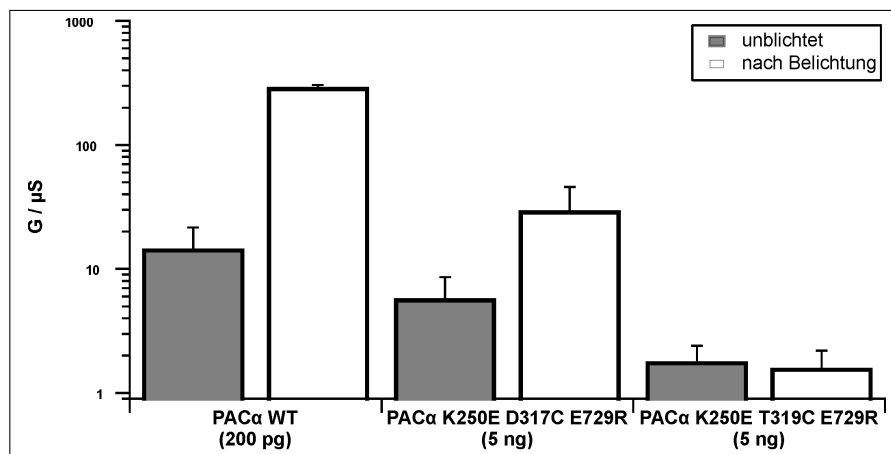
#### 3.8.4 *PACα K250E D317C E729R* und *PACα K250E T319C E729R*

Sowohl Sunahara *et al.* (1998) als auch Kasahara *et al.* (2001) beschrieben, dass es notwendig sein konnte, Mutationen in drei verschiedenen Positionen der Zyklasedomänen vorzunehmen, um die Substratspezifität der Zyklasten zu verändern. Anhand dieser Arbeiten wurden weitere mögliche Punktmutationen ermittelt und die *PACα*-Mutanten *PACα K250E D317C E729R* und *PACα K250E T319C E729R* hergestellt.

Diese Mutanten wurden mit jeweils 5 ng ihrer RNA in *Xenopus*-Oocyten injiziert, gemeinsam mit je 5 ng RNA von CFTR und cGK-II. Die Oocyten wurden nach vier Tagen Expression elektrophysiologisch untersucht, und der Leitwert vor und nach Belichtung mit  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) für 32 s bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass die Mutante *PACα K250E T319C E729R* keinerlei Zyklastenaktivität mehr besaß. Der Leitwert der Oocyten mit dieser Mutante lag mit und ohne Belichtung um die  $1,7 \mu\text{S}$  (siehe Abb. 3.24). Oocyten mit dem Wildtyp von *PACα* hatten einen Dunkelleitwert von  $15 \mu\text{S}$ , der durch Belichtung auf fast  $300 \mu\text{S}$  anstieg.

Im Gegensatz zu *PACα K250E T319C E729R* konnte bei *PACα K250E D317C E729R*



**Abb. 3.24:** Leitwertmessungen in CFTR-exprimierenden Oocyten mit *PAC $\alpha$  K250E D317C E729R* und *PAC $\alpha$  K250E T319C E729R*. Es waren jeweils 5 ng RNA der PAC $\alpha$ -Mutanten und 5 ng CFTR-RNA injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

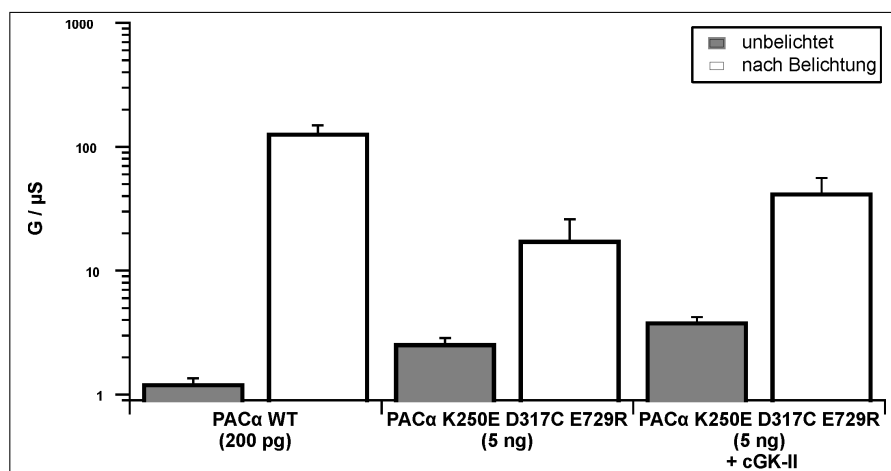
Zyklaseaktivität nachgewiesen werden. Oocyten, die diese Mutante exprimierten, wiesen einen Dunkelleitwert von  $6 \mu\text{S}$ , nach Belichtung  $30 \mu\text{S}$  auf.

Dass es sich bei dieser Mutante um eine Adenylatzyklase handeln musste, zeigt Abb. 3.25. Hier wurden 5 ng RNA dieser Mutante und 5 ng CFTR-RNA in Oocyten mit und ohne cGK-II (5 ng RNA) exprimiert. In beiden Fällen war das Verhältnis von Dunkelleitwert zum maximalen Leitwert nach Belichtung ähnlich groß.

Ohne cGK-II hatten die Oocyten einen Leitwert von  $2,6 \mu\text{S}$ , der sich durch Belichtung ( $32 \text{ s}$ ,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) auf  $18 \mu\text{S}$  erhöhte. Mit cGK-II lag der Dunkelleitwert bei  $3,9 \mu\text{S}$  und stieg nach der Belichtung auf  $42 \mu\text{S}$  an.

### 3.8.5 Tripelmutante PAC $\alpha$ K250E T319G S329Y

Rauch *et al.* (2008) haben die Struktur der Guanylatzyklase Cya2 (*Synechocystis PCC6803*) aufgeklärt und einzelne Aminosäuren in den Zyklasedomänen so verändert, dass sich die Substratspezifität von GTP nach ATP verschob. Anhand dieser Arbeit wurden durch einen Sequenzvergleich von Cya2 mit PAC $\alpha$  die Aminosäuren in PAC $\alpha$  ermittelt, die für eine



**Abb. 3.25:** Leitwertmessungen in CFTR- und *PACα K250E D317C E729R*-exprimierenden Oocyten mit und ohne cGK-II. Es waren jeweils 5 ng RNA von CFTR und cGK-II injiziert, die Mengen der PAC-RNA sind angegeben. Die Belichtungszeit betrug 32 s (34 mmol Photonen  $m^{-2} s^{-1} \cong 8,7 mW mm^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

PACα C1	245	G G Q V A	<b>(T)</b>	K F I T G I	255	314	R K A D F T	<b>(Q)</b>	<b>(T)</b>	L L G D C I N T A S	<b>(T)</b>	R I	331
PACβ C1	246	G G N I A		K F I T G I	256	315	R K S D F T			L L G D C I N T T S		R I	332
Syne. Cya2	483	G G T I D		<b>E</b> F M G D G	493	557	K R T K Y			G V V G A Q V N L T Y		R I	574

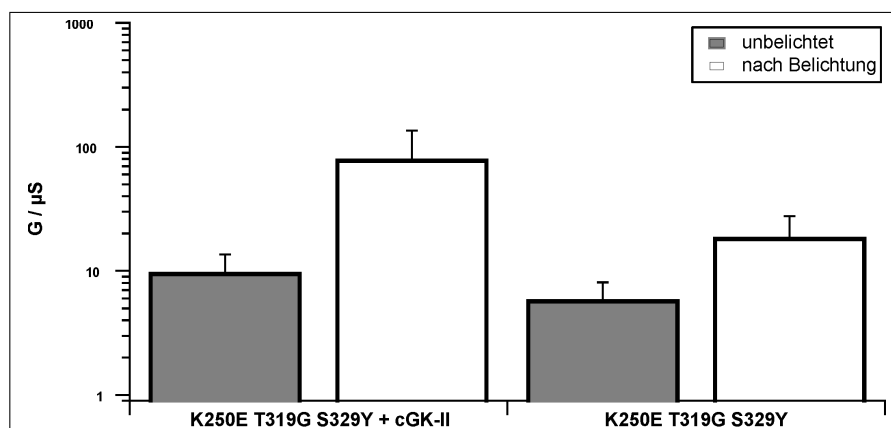
**Abb. 3.26:** Sequenzvergleich von Ausschnitten der Zyklasedomänen aus PACα, PACβ und Cya2 aus *Synechocystis PCC6803*. Die eingerahmten Positionen markieren die Aminosäuren die für die PACα-Tripelmutante (T) bzw. für die Quadrupelmutante (T+Q) mutiert wurden.

Veränderung in Frage kamen (siehe Abb. 3.26).

Zunächst wurden drei Aminosäuren identifiziert und deshalb die Tripelmutante (TM) *PACα K250E T319G S329Y* generiert. Zur Bestimmung der Zyklaseaktivität wurden 5 ng dieser Mutante mit 5 ng CFTR-RNA mit und ohne cGK-II (5 ng) in *Xenopus*-Oocyten exprimiert und die Oocyten elektrophysiologisch untersucht.

In Abb. 3.27 sind die Leitwerte der Oocyten vor und nach Belichtung (32 s, 34 mmol Photonen  $m^{-2} s^{-1} \cong 8,7 mW mm^{-2}$ ) dargestellt. Ohne cGK-II hatten die Oocyten einen Dunkelleitwert von 6  $\mu S$  und nach Belichtung von 19  $\mu S$ .

Mit cGK-II war der Dunkelleitwert mit 10  $\mu S$  etwa doppelt so hoch, der lichtinduzierte maximale Leitwert entsprach mit 80  $\mu S$  dem gut vierfachen Wert der Oocyten ohne cGK-II.



**Abb. 3.27:** Leitwertmessungen in CFTR- und  $PAC\alpha$  *K250E T319G S329Y*-exprimierenden Oocyten mit und ohne cGK-II. Es waren jeweils 5 ng RNA injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

**Tab. 3.4:** Immunologisch bestimmte cAMP- und cGMP-Konzentrationen in Oocyten mit 5 ng RNA der Tripelmutante  $PAC\alpha$  *K250E T319G S329Y*. Gemessen wurde nach vier Tagen Expressionszeit und 1 min Belichtung mit  $10 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $2,6 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Die Werte stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler dar,  $n=4$ .

	[ $\mu\text{M}$ ] cAMP	[ $\mu\text{M}$ ] cGMP
Kontrollzellen	$2,05 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,01$
Tripelmutante	$3,35 \pm 0,23$	$0,14 \pm 0,03$

Dies legte nahe, dass es sich teilweise um eine Guanylatzyklaseaktivität handeln musste. Deshalb wurden immunologische cAMP- und cGMP-Messungen an Oocyten mit der Tripelmutante  $PAC\alpha$  *K250E T319G S329Y* durchgeführt. Hierfür wurden 5 Oocyten 1 min mit  $10 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $2,6 \text{ mW mm}^{-2}$ ) belichtet und direkt danach in 0,1 M HCl homogenisiert.

Hierbei konnten für die Oocyten die die Tripelmutante exprimierten sowohl erhöhte cAMP- als auch erhöhte cGMP-Konzentrationen gegenüber nicht injizierten Kontroll-oocyten gemessen werden. Die Mittelwerte aus vier Messungen, bei denen jeweils fünf Oocyten in einem Ansatz belichtet und auch gemeinsam homogenisiert wurden, sind in Tab. 3.4 aufgeführt. Ein Vergleich von unbelichteten und belichteten Zellen ist in Abb. 3.29 dargestellt.

Demnach war in belichteten Zellen mit der Tripelmutante die cGMP-Konzentration mit  $0,14 \mu\text{M}$  niedriger als die gemessene cAMP-Konzentration von  $3,35 \mu\text{M}$ . Gegenüber Kontrollzellen ( $0,05 \mu\text{M}$  cGMP) war die cGMP-Konzentration auf das Dreifache erhöht.

In einzelnen Messungen an belichteten Oocyten, bei denen die Expressionszeit 10 Tage betrug, wurden bis zu  $12 \mu\text{M}$  cGMP gemessen. Somit konnte für diese Mutante sowohl Adenylat- als auch Guanylatzyklaseaktivität nachgewiesen werden.

### 3.8.6 Quadrupelmutante PAC $\alpha$ K250E D317K T319G S329Y

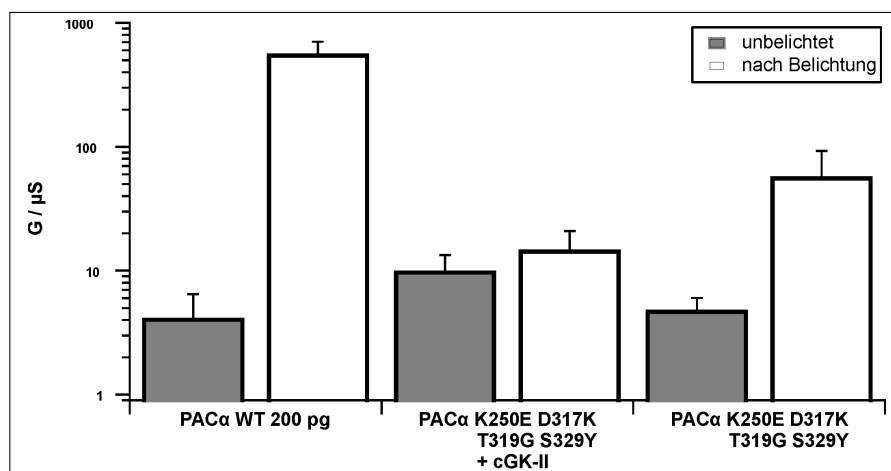
Rauch *et al.* (2008) beschrieben in ihrer Arbeit eine vierte Aminosäure, welche eine Rolle bei der Purinselektivität von Cya2 spielt (siehe Abb. 3.26). So soll Lys560 ( $\rightarrow$  D317K in PAC $\alpha$ ) zwar nicht direkt mit der Purinbase des Nukleotids interagieren, aber an der Stabilisierung von Glu488 ( $\rightarrow$  K250E in PAC $\alpha$ ) beteiligt sein.

Daher wurde die Mutation D317K in die Tripelmutante PAC $\alpha$  K250E T319G S329Y eingeführt und es entstand die Quadrupelmutante (QM) PAC $\alpha$  K250E D317K T319G S329Y. Von dieser Mutante wurden 5 ng RNA gemeinsam mit 5 ng CFTR-RNA in Oocyten mit und ohne cGK-II (5 ng RNA) injiziert und exprimiert.

Ohne cGK-II lag der Dunkelleitwert dieser Oocyten bei  $5 \mu\text{S}$ , nach der Belichtung ( $32 \text{ s}$ ,  $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cong 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ) bei  $58 \mu\text{S}$  (siehe Abb. 3.28). Mit cGK-II hatten die Oocyten mit  $10 \mu\text{S}$  zwar einen höheren Dunkelleitwert, der maximale Leitwert nach Belichtung lag mit  $15 \mu\text{S}$  niedriger als bei den Oocyten ohne cGK-II.

Der erhöhte Dunkelleitwert deutete auf eine Guanylatzyklaseaktivität hin. Um dies genauer zu untersuchen, wurden bei diesen Oocyten immunologische cAMP- und cGMP-Messungen durchgeführt. Hierfür wurden 20 ng RNA der Quadrupelmutante in *Xenopus*-Oocyten injiziert und vier Tage exprimiert. Die Belichtung der Oocyten erfolgte für 1 min mit  $10 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $2,6 \text{ mW mm}^{-2}$ ).

In Tab. 3.5 sind die danach gemessenen cAMP- und cGMP-Konzentrationen dargestellt.



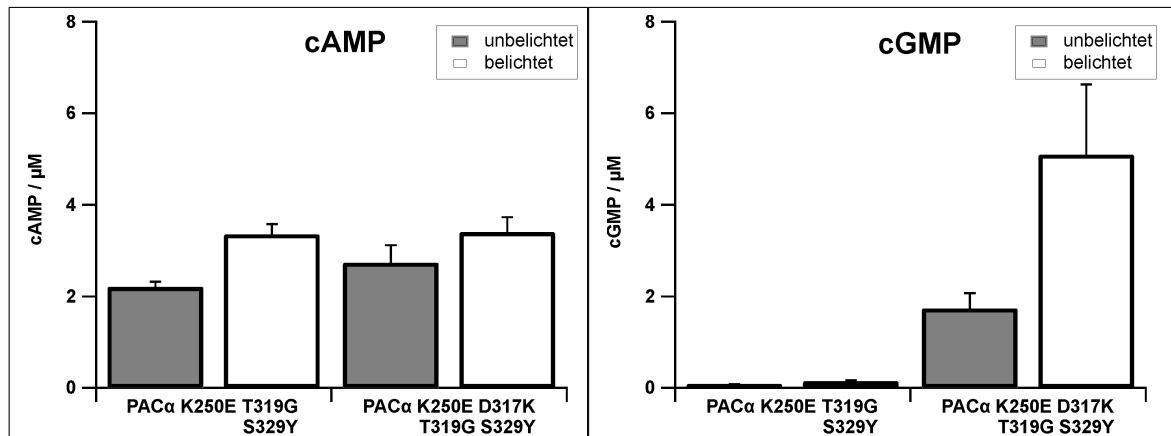
**Abb. 3.28:** Leitwertmessungen in CFTR- und *PACα K250E D317K T319G S329Y*-exprimierenden Oocyten mit und ohne cGK-II. Es waren jeweils 5 ng RNA injiziert. Die Belichtungszeit betrug 32 s ( $34 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1} \hat{=} 8,7 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler,  $n=3$ .

**Tab. 3.5:** Immunologisch bestimmte cAMP- und cGMP-Konzentrationen in Oocyten mit 20 ng RNA der Quadrupelmutante *PACα K250E T319G S329Y*. Gemessen wurde nach vier Tagen Expressionszeit und 1 min Belichtung mit  $10 \text{ mmol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $2,6 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Die Werte stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler dar,  $n=4$ .

	[μM] cAMP	[μM] cGMP
Kontrollzellen	$2,05 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,01$
Quadrupelmutante	$3,40 \pm 0,33$	$5,09 \pm 1,54$

Demnach ist die cAMP-Konzentration in Oocyten, die die Quadrupelmutante exprimierte mit  $3,4 \mu\text{M}$  gegenüber  $2,05 \mu\text{M}$  leicht erhöht. Die cGMP-Konzentration hat sich in den exprimierenden Oocyten mit  $5,09 \mu\text{M}$  gegenüber  $0,05 \mu\text{M}$  in Kontrollzellen ver Hundertfacht. Eine vergleichende Darstellung der immunologisch bestimmten cAMP- und cGMP-Konzentrationen der Tripel- und der Quadrupelmutante in belichteten und unbelichteten Oocyten ist in Abb. 3.29 gezeigt. Die cAMP-Konzentrationen konnten sowohl bei der Tripel- als auch bei der Quadrupelmutante durch Belichtung nur leicht erhöht werden. Sie stiegen von  $2,2 \mu\text{M}$  (TM) bzw.  $2,7 \mu\text{M}$  (QM) auf jeweils  $3,4 \mu\text{M}$ .

Die cGMP-Konzentrationen waren bei der Tripelmutante sowohl unbelichtet ( $0,08 \mu\text{M}$ ) als



**Abb. 3.29:** Immunologische cAMP- und cGMP-Messung an Oocyten mit 20 ng RNA der Tripelmutante *PACα K250E T319G S329Y* bzw. der Quadrupelmutante *PACα K250E D317K T319G S329Y* vier Tage nach der Injektion. Belichtet wurde für 1 min mit 10 mmol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $2,6 \text{ mW mm}^{-2}$ ). Die Werte stellen das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler dar,  $n=4$ .

auch belichtet ( $0,14 \mu\text{M}$ ) sehr niedrig im Vergleich zur Quadrupelmutante. Hier lag die cGMP-Konzentration in unbelichteten Zellen bei  $1,7 \mu\text{M}$ , in belichteten Zellen mit  $5,1 \mu\text{M}$  dreimal höher.

Bei längeren Expressionszeiten (10 Tage) konnte die Aktivität der Quadrupelmutante noch weiter gesteigert werden. In einzelnen Experimenten war bereits in unbelichteten Zellen eine cGMP-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  messbar, nach Belichtung sogar bis  $60 \mu\text{M}$ . Somit hat die Quadrupelmutante eine mit der Tripelmutante vergleichbare Adenylatzyklaseaktivität, aber eine deutlich höhere Guanylatzyklaseaktivität als die Tripelmutante.



## 4 Diskussion

### 4.1 Lichtabhängigkeit und Kinetik von PAC $\alpha$

#### 4.1.1 Abhängigkeit der Zykklaseaktivität von der Lichtintensität

Für die Bestimmung der Zykklaseaktivität von PAC $\alpha$  in Abhängigkeit der Lichtintensität wurden die Oocyten über einen Kunststoff-Lichtleiter in der Messkammer belichtet, da die Bestimmung elektrophysiologisch erfolgte. Aus diesem Grund war die maximale Lichtintensität (Lichtstrom) bei der gemessen wurde 28  $\mu\text{mol}$ . Bei diesen Intensitäten konnte für PAC $\alpha$  keine Sättigung festgestellt werden. Zwischen der Anzahl an Photonen und dem Leitwert bestand ein nahezu linearer Zusammenhang.

Yoshikawa *et al.* (2005) fanden für PAC aus isolierten Paraflagellarkörpern eine Sättigung ab 50-100  $\mu\text{mol Photonen m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Diese Intensitäten wurden bei den elektrophysiologischen Messungen in der Messkammer bei dieser Arbeit nicht erreicht. Außerdem war es in den Messungen an Oocyten nicht möglich, die ganze Oocytenmembran zu belichten. Die vom Lichtleiter abgewandte Seite der Oocyte erhielt nie dieselbe Lichtintensität wie die dem Lichtleiter zugewandte Seite der Oocyte.

Die Abhängigkeit der Zykklaseaktivität von der Belichtungsdauer ergab ebenfalls einen linearen Zusammenhang, was in guter Übereinstimmung mit Yoshikawa *et al.* (2005) steht. Längere Belichtungszeiten als 32 s hätten hier nicht mehr zu einer linearen Erhöhung des Leitwerts geführt, da die Phosphodiesterasen, die in den Oocyten vorhanden waren, durch die erhöhte cAMP-Konzentration eine erhöhte Aktivität besessen hätten, was zu einem beschleunigten Abbau des neu synthetisierten cAMP geführt hätte.

Bei PAC $\alpha$  scheint es sich also um einen Starklichtrezeptor zu handeln, da für einen Schwachlichtrezeptor in dem gemessenen Bereich eine Sättigung hätte messbar sein müssen. Das ist

sinnvoll, da PAC an der photophobischen Reaktion auf einen plötzlichen starken Anstieg der Lichtintensität beteiligt ist. Für PAC $\beta$  wurden diese Messungen noch nicht durchgeführt. Hier bestünde die Möglichkeit, dass PAC $\beta$  andere Werte für die Lichtsättigung aufweist, was bedeuten würde, dass PAC $\beta$  bei der Lichtperzeption bei anderen Intensitäten beteiligt wäre.

#### 4.1.2 Kinetik

In Abb. 3.2 ist dargestellt, wie die Einströme in Oocyten mit PAC $\alpha$  und CFTR bzw. CNGA2 durch Belichtung zunehmen. Eine deutliche Veränderung der Ströme tritt in Oocyten mit CFTR und PAC $\alpha$  bereits wenige Sekunden nach Beginn der Belichtung auf. Noch schneller konnte eine Stromzunahme in Oocyten mit PAC $\alpha$  und CNGA2 beobachtet werden. Hier nahm der Strom bereits 100 ms nachdem die Belichtung begonnen hatte zu. Bei der Messung der Zykklaseaktivität mit CFTR verläuft die Aktivierung des Kanals nicht direkt über cAMP, stattdessen muss cAMP erst die Proteinkinase A (PKA) aktivieren, welche dann den Kanal phosphoryliert, worauf dieser öffnet (siehe 2.4). Das bedeutet, dass zwischen der Zykklaseaktivität von PAC und der Öffnung des Kanals zwei Diffusionsschritte stehen.

Im Gegensatz dazu erfolgt das Öffnen von CNGA2 direkt durch Bindung von cAMP, weshalb hier nur ein Diffusionsschritt notwendig ist. Dies ist eine Erklärung dafür, dass eine Stromzunahme nach Belichtung in Oocyten mit CNGA2 schneller messbar ist als in Oocyten mit CFTR. Da der Einstrom trotz Diffusion bereits nach 100 ms messbar zunimmt, wird die Aktivierungs-Zeitkonstante für PAC $\alpha$  auf  $\leq 20$  ms geschätzt.

Für die Bestimmung der Deaktivierungszeit wurde der Leitwert der Oocyten mit PAC $\alpha$  und CFTR bestimmt, die mit unterbrochenem Licht für insgesamt 4 s belichtet wurden (siehe Abb. 3.3). Hierfür wurden auch Lichtpulse mit 10 ms Länge verwendet, was zu einer signifikanten Erhöhung des Leitwerts führte ( $p=0,01$ ). Dies ergab eine geschätzte

Deaktivierungs-Zeitkonstante von  $\leq 10$  ms.

Yoshikawa *et al.* (2005) verwendeten ebenfalls unterbrochenes Licht, um die Deaktivierungs-Zeitkonstante von isoliertem PAC zu bestimmen. Als kürzesten Puls wählten sie 100 ms und konnten hierfür keine signifikante Leitwerterhöhung messen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wo bei Pulsen von 100 ms Länge ebenfalls keine signifikante Leitwertänderung beobachtet werden konnte.

Diese Methode eignet sich nur zu Bestimmung von Deaktivierungskinetiken, wenn die Aktivierungszeit gleich groß oder kürzer als die Deaktivierungszeit ist. Ansonsten würde bei Pulsen deren Länge der Deaktivierungszeit entspricht, eine Verringerung des Leitwerts auftreten. Im Fall von PAC $\alpha$  ist dies schwierig, da für die Aktivierungszeit noch keine exakten Werte bestimmt wurden.

## 4.2 Knockoutmutanten

Mit den Aminosäuren K250 und G254 in C1 von PAC $\alpha$  bzw. K251 und G255 in C1 von PAC $\beta$  und K660 und D664 in C2 von PAC $\alpha$  bzw. K664 und D668 in C2 von PAC $\beta$  wurden Aminosäuren identifiziert, die für die Funktion von PAC essentiell sind. Da anfangs noch zu wenig über die Funktionen der beiden Zyklasedomänen bekannt war, wurden aus jeder Zyklasedomäne jeweils zwei Aminosäuren zur Mutation ausgewählt.

Die erste Position (K250 / K251 in C1 bzw. K660 / K664 in C2) wurde als homologe Aminosäure zu den Substratspezifität-bestimmenden Aminosäuren in anderen Klasse III Adenylatzyklasen bestimmt (Zhang *et al.*, 1997; Tesmer *et al.*, 1997). Durch eine Veränderung an dieser Position sollte ein korrektes Erkennen des Substrats (ATP) beeinträchtigt oder gar verhindert werden.

An der zweiten Position (G254 / G255 in C1 bzw. D664 / D668 in C2) befindet sich eine der Aminosäuren, die an der Bindung der Metallionen beteiligt ist, die für die katalytische

Umsetzung von ATP in cAMP benötigt werden (Tesmer & Sprang, 1998; Tesmer *et al.*, 1999). Durch die Mutation an beiden Positionen sollte sicher gestellt werden, dass PAC in seiner Funktion deutlich beeinträchtigt, möglicherweise sogar vollständig gehemmt wird. Die elektrophysiologischen Messungen mit den PAC in Oocyten mit CFTR stellen die sensitivste zur Verfügung stehende Methode zum Nachweis von Adenylatzyklaseaktivität dar. Wie die Messungen zeigten, konnte selbst mit dieser Methode für die Mutanten *PAC $\alpha$  K250E G254C/S*, *PAC $\alpha$  K660E D664C/S*, *PAC $\beta$  K251E G255C/S* sowie *PAC $\beta$  K664E D668C/S* keine Licht induzierte Leitwertänderung nachgewiesen werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Knockoutmutanten keine Adenylatzyklaseaktivität mehr besitzen.

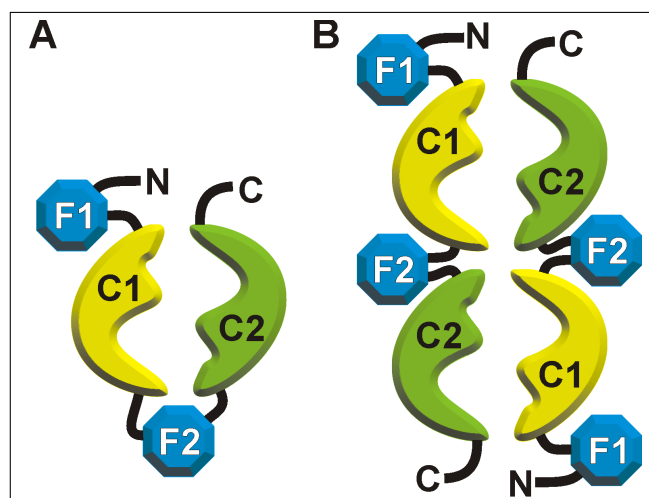
### 4.3 Dimerisierung

In Klasse III Adenylatzyklasen, zu denen auch PAC gehört, müssen für die Bildung eines katalytischen Zentrums zwei Zyklasedomänen dimerisieren. Das katalytische Zentrum befindet sich dann in der Grenzschicht zwischen den beiden Zyklasedomänen (Zhang *et al.*, 1997; Tesmer *et al.*, 1997).

Klasse III Zyklasen aus Säugern besitzen zwei Zyklasedomänen, die ein intramolekulares Dimer bilden (Yan *et al.*, 1996; Whisnant *et al.*, 1996). Pro Dimer entsteht so ein katalytisches Zentrum, bei dem sich die an der Umsetzung beteiligten Aminosäuren nur auf jeweils einer der beiden Domänen befinden.

Im Gegensatz dazu bestehen bakterielle Klasse III Zyklasen nur aus einer Zyklasedomäne, die alle für die Katalyse benötigten Aminosäuren besitzt. Auch hierbei müssen Dimere aus zwei Zyklasedomänen gebildet werden, welche zwei katalytische Zentren besitzen (Hurley, 1998; Guo *et al.*, 2001).

PAC besitzt, wie die Zyklasen aus Säugern, zwei Zyklasedomänen (Iseki *et al.*, 2002),



**Abb. 4.1:** Die Möglichkeiten der Dimerisierung bei PAC. **A:** Um ein C1-C2-Heterodimer auszubilden könnte PAC ein intramolekulares Pseudoheterodimer bilden, wie es in Säuger-Adenylatzyklasen vorkommt. **B:** Eine andere Möglichkeit ist die Bildung eines Dimers aus zwei PAC-Untereinheiten, wobei die C1-C2-Heterodimere intermolekular gebildet werden.

die als Heterodimer (C1 + C2) ein katalytisches Zentrum besitzen. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: intermolekular und intramolekular (siehe Abb. 4.1). Für PAC wurde bisher angenommen, dass es ein intramolekulares C1-C2-Dimer bildet.

Mit den Knockoutmutanten (siehe 3.2), bei denen die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren aus jeweils einer Zyklasedomäne verändert wurden, stand ein Werkzeug zur Verfügung, um die Dimerbildung von PAC genauer zu untersuchen.

Jede der Mutanten für sich zeigte keinerlei Zyklaseaktivität. Zwei verschiedene PAC $\alpha$ -Mutanten in Koexpression konnten wieder cAMP bilden, wenn die Mutationen einmal in C1 und bei der anderen Mutante in C2 vorlagen (siehe Abb. 3.6). Dies zeigt, dass in PAC $\alpha$  die Dimerisierung intermolekular erfolgen muss.

Ein weiterer Beleg dafür sind die Experimente mit den ausgetauschten Zyklasedomänen (siehe 3.4.1). Auch hier war Zyklaseaktivität bei der Koexpression einer Austauschmutante mit einer Knockoutmutante nachweisbar, wenn bei der einen Mutante die Zyklasedomäne C1 und bei der anderen die Zyklasedomäne C2 verändert war (Abb. 3.11). Keine Zyklaseaktivität zeigte sich bei der Koexpression, wenn bei beiden Mutanten dieselbe Zyklasedomäne

betroffen war (Abb. 3.12).

Für PAC $\beta$  konnte auf diese Weise keine Dimerisierung nachgewiesen werden. Dies lag wahrscheinlich an der 100-fach geringeren Aktivität von PAC $\beta$  gegenüber PAC $\alpha$ . Schon bei PAC $\alpha$  war die Aktivität des Dimers aus zwei Knockoutmutanten deutlich geringer als die des Wildtyps.

Die Dimerisierung zwischen PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  konnte hingegen nachgewiesen werden, wenn PAC $\alpha$  eine intakte C2-Domäne zum Dimer beisteuerte. Dies deutet darauf hin, dass eine mögliche Ursache dafür, dass PAC $\alpha$  100-fach aktiver ist als PAC $\beta$ , in der Zyklasedomäne C2 zu suchen ist (siehe 4.7).

Eine funktionelle Einheit besteht in PAC also aus mindestens zwei PAC-Untereinheiten. *In vivo* wurde PAC hingegen als Tetramer identifiziert (Iseki *et al.*, 2002). Für die Bildung eines Tetramers gibt es mehrere Möglichkeiten. Eine davon ist die Zusammenlagerung von zwei PAC-Dimeren als funktionelle Einheit.

Eine andere Möglichkeit ist die Bildung eines Tetramers, bei dem die vier C1-C2 Dimere jeweils aus der C1 der einen Untereinheit und der C2 der nächsten Untereinheit gebildet werden (siehe Abb. 4.2 oben). Mit den hier durchgeführten Experimenten ist eine Unterscheidung dieser beiden Fälle nicht möglich. Wenn davon ausgegangen wird, dass jede Mutante mit jeder anderen mit derselben Wahrscheinlichkeit ein Dimer bzw. Tetramer bildet, ist die daraus resultierende Gesamtaktivität in beiden Fällen dieselbe (siehe Abb. 4.2 unten).

#### 4.4 Austausch der Zyklasedomänen

Mit den Proteinen GCY-35 und GCY-36 aus *C. elegans* wurden zwei Guanylatzyklase-Untereinheiten identifiziert, die miteinander interagieren und so ein funktionelles Heterodimer bilden können (Cheung *et al.*, 2004). Die Zyklasedomänen dieser Proteine sollten die

	Zusammensetzung	Mögliche Kombinationen
	2 x C1 k.o.	1 x
	C1 k.o. + C2 k.o.	1 x
	C2 k.o. + C1 k.o.	1 x
	2 x C2 k.o.	1 x
	4 x C1 k.o.	1 x
	3 x C1 k.o. + 1 x C2 k.o.	4 x
	2 x C1 k.o. + 2 x C2 k.o.	4 x  2 x
	1 x C1 k.o. + 3 x C2 k.o.	4 x
	4 x C2 k.o.	1 x

intakte Zyklasedomäne  
defekte Zyklasedomäne

**Abb. 4.2:** Vergleich der Möglichkeiten zur Ausbildung eines intermolekularen Pseudoheterodimers der Zyklasedomänen von  $PAC\alpha$ . Tabellarisch dargestellt sind alle möglichen Kombinationen für Dimere und Tetramere, die bei einer Koexpression von  $PAC\alpha$  *C1 k.o.* und  $PAC\alpha$  *C2 k.o.* in äquimolarem Verhältnis auftreten können. Für die Berechnung der relativen Aktivität bei einer Dimer- bzw. Tetramerbildung wurde davon ausgegangen, dass ein einzelnes intaktes C1-C2-Pseudoheterodimer 50 % (Dimer) bzw. 25 % (Tetramer) der Gesamtaktivität des Wildtyps besitzt. Als Mittelwert der Zyklaseaktivität ergab sich sowohl für ein Dimer als auch für ein Tetramer 25 %.

Zyklasedomänen in PAC $\alpha$  ersetzen, um so eine Photoaktivierte Guanylatzyklase (PGC) zu schaffen.

Zunächst wurde GCY-35 verwendet und gegen die PAC-Zyklasedomänen ausgetauscht. GCY-35 entspricht der  $\alpha$ -Untereinheit der Säuger-Guanylatzyklasen (Cheung *et al.*, 2004), und sollte die notwendigen Aminosäuren zur katalytischen Umsetzung der Zyklierungsreaktion beisteuern. Diese Aufgabe übernimmt in PAC die Zyklasedomäne C2.

Die drei hergestellten Klone enthielten GCY-35 anstelle von C1, anstelle von C2, und anstelle von C1 und C2. Bei keinem der Klone konnte Zyklaseaktivität nachgewiesen werden. Dies macht Sinn für die Klone *PAC $\alpha$  GCY-35 C1* und *PAC $\alpha$  GCY-35 C1 GCY-35 C2*, da hier die für die korrekte Erkennung des Substrats (ATP/GTP) notwendige Domäne C1 durch eine Zyklasedomäne ersetzt wurde, in der die benötigten Aminosäuren nicht enthalten sind.

Bei einem korrekten Einbau von GCY-35 anstelle von C2 wäre Zyklaseaktivität zu erwarten gewesen. In diesem Fall hätte es sich noch um Adenylatzyklaseaktivität handeln müssen, da die Substrat-bestimmende Domäne C1 spezifisch für ATP gewesen wäre. Dass überhaupt keine Zyklaseaktivität nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.10), deutet darauf hin, dass ein Heterodimer aus GCY-35 und der C1 aus PAC kein funktionelles Zentrum bilden konnten.

Dass die Proteine korrekt translatiert wurden, wurde dadurch bestätigt, dass bei einer Koexpression von PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten mit den Zyklasedomänen-Austauschmutanten eine Leitwertänderung in Oocyten gemessen wurde und somit eine Zyklaseaktivität nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.11).

Mit dem Austausch einer Zyklasedomäne aus PAC gegen die Zyklasedomäne aus GCY-36 wurde eine Domäne verwendet, die über die für die Substratspezifität für GTP benötigten Aminosäuren verfügt. Die beiden Mutanten, die damit hergestellt wurden, enthielten sowohl GCY-35 als auch GCY-36, einmal in Position von C1 und C2, und einmal in Position



von C2 und C1.

Für beide Mutanten konnte weder Adenylat- noch Guanylatzyklaseaktivität nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.13). Für diese Mutanten wurde keine Expression nachgewiesen, da sie keine intakte PAC-Zyklasedomäne mehr besaßen und somit kein funktionelles C1-C2-Dimer mit anderen PAC-Mutanten bilden konnten.

Für die vorliegenden Versuche wurden für die Größe der Zyklasedomänen die Daten der Homologievergleiche von Iseki *et al.* (2002) verwendet. Durch einen Sequenzvergleich von PAC mit GCY-35 und GCY-36 wurden ähnlich große Bereiche in den *C. elegans* Zyklasedomänen zum Austausch ausgewählt. Da weder von PAC noch von GCY-35 und GCY-36 eine Struktur ermittelt wurde, ist es möglich, dass auf diese Weise wichtige strukturbildende Bereiche zerstört wurden, was eine korrekte Faltung nicht mehr möglich machte.

Der Austausch von ganzen Domänen führte in diesem Versuch nicht zu einem funktionierenden Protein mit den gewünschten Eigenschaften. Dennoch wurde zumindest in denjenigen Mutanten, in denen nur eine Zyklasedomäne ausgetauscht wurde, der Rest des Proteins korrekt gefaltet. Dies war unabhängig davon, ob dieser Austausch in C1 oder in C2 erfolgte, was durch die Dimerisierungsexperimente gezeigt werden konnte.

## 4.5 Fusionsprotein PAC CNG

Das Ziel der Fusion von PAC $\alpha$  mit einem CNG-Kanal war es, die beiden Proteine in direkte räumliche Nähe zueinander zu bringen. Dadurch sollte das von PAC $\alpha$  gebildete cAMP schneller zu den cAMP-Bindestellen des CNG-Kanals diffundieren, und die cAMP-Konzentration an den CNG-Kanälen höher sein, als das bei einer Koexpression von nicht fusionierten Einzelproteinen der Fall wäre.

Das von Saskia Schröder-Lang hergestellte Fusionsprotein OLF::PAC $\alpha$  wurde ebenso wie das in dieser Arbeit hergestellte CNGA2::PAC $\alpha$  auf seine Fähigkeit zur lichtinduzierten

Leitwertänderung hin untersucht (siehe Abb. 3.14). Im Vergleich zu den einzeln exprimierten Proteinen zeigten beide Fusionsproteine eine deutlich verminderte Leitwertänderung durch Belichtung. Bei CNGA2::PAC $\alpha$  war die Leitwertänderung sogar noch geringer als bei OLF::PAC $\alpha$ , obwohl der Kanal CNGA2 (C460W/E583M) mit einem  $K_m$  von 1  $\mu$ M (Rich *et al.*, 2001) empfindlicher gegenüber cAMP ist, als der Kanal OLF T537S mit einem  $K_m$  von 14  $\mu$ M (Altenhofen *et al.*, 1991).

Ein möglicher Grund dafür, dass die Fusionsproteine zu einer im Vergleich zu den Einzelproteinen geringeren Leitwertänderung in Oocyten führen, könnte darin liegen, dass CNG-Kanäle *in vivo* Tetramere bilden (Liu *et al.*, 1996). Ebenso wurde für PAC angenommen, dass es *in vivo* ein Tetramer aus zwei PAC $\alpha$ - und zwei PAC $\beta$ -Untereinheiten bildet (Iseki *et al.*, 2002). Diese Tetramerisierung könnte durch die Fusion der beiden Proteine aus sterischen Gründen erschwert sein.

Um diese sterische Hinderung zu verringern, wurde ein Linkerpeptid zwischen CNGA2 und PAC $\alpha$  eingefügt, was aber nicht zu dem erwünschten Effekt führte. Die lichtinduzierte Stromantwort war daraufhin eher kleiner, als im Fusionsprotein ohne Linkerpeptid (Abb. 3.16). Außerdem wurde untersucht, welches der beiden fusionierten Proteine in seiner Funktion stärker gehemmt war. Zu diesem Zweck wurden die Fusionsproteine jeweils mit einem der beiden Einzelproteine koexprimiert.

Dabei ergab sich, dass jeweils der Kanal am stärksten gehemmt war. Zwar konnte auch durch eine Koexpression des Fusionsproteins mit PAC $\alpha$  eine Steigerung der lichtinduzierten Leitwerterhöhung um den Faktor drei erreicht werden (siehe Abb. 3.15). Aber eine Koexpression des Fusionsproteins mit dem jeweiligen CNG-Kanal führte zu einer Steigerung um den Faktor 17. Folglich war der Kanal der Teil des Fusionsproteins, der in seiner Funktion am stärksten gehemmt war.

Bei den CNG-Kanälen befinden sich sowohl N- als auch C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Die cNMP-Bindedomäne befindet sich auf der C-terminalen

Seite der Transmembrandomänen. Da PAC $\alpha$  in den Fusionsproteinen auf die C-terminale Seite der CNG-Kanäle fusioniert wurde, könnte dadurch die cNMP-Bindedomäne für die zyklischen Nukleotide schlecht zugänglich sein.

Daher wurde ein weiteres Fusionsprotein hergestellt, bei dem PAC $\alpha$  an die N-terminale Seite des CNG-Kanals fusioniert wurde. Auch hierbei zeigte sich nicht die erwünschte Verbesserung (siehe Abb. 3.17). Interessant an dieser Messung war, dass eine Koexpression des Fusionsproteins PAC $\alpha$ ::CNGA2 mit CNGA2 eine stärkere lichtinduzierte Leitwertänderung zur Folge hatte, als eine Koexpression von PAC $\alpha$  als Einzelprotein mit CNGA2.

Dies könnte bedeuten, dass PAC $\alpha$  im Fusionsprotein PAC $\alpha$ ::CNGA2 nur sehr geringe Funktionsverluste aufweist. Außerdem führt eine Fusion von PAC $\alpha$  an den Kanal zu einer Lokalisation von PAC $\alpha$  in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran. Durch diese räumliche Nähe von PAC $\alpha$  zu den nicht fusionierten CNG-Kanälen würde die lokale cAMP-Konzentration gegenüber der Expression von PAC $\alpha$  im Zytoplasma erhöht sein, was zu dem höheren Leitwert in diesem Fall führen würde.

PAC $\alpha$  eignet sich gut für die Herstellung von Fusionsproteinen, egal ob sich PAC $\alpha$  auf der N- oder auf der C-terminalen Seite des Fusionsproteins befindet. Für die CNG-Kanäle gilt dies nicht; sowohl auf N- als auch auf C-terminaler Seite in den hergestellten Fusionsproteinen waren sie in ihrer Funktion deutlich beeinträchtigt.

## 4.6 Domänen-Deletionsmutanten

### 4.6.1 Deletion der F2-Domäne

BLUF-Domänen besitzen zur Interaktion mit FAD ein hochkonserviertes Tyrosin (Gomelsky & Klug, 2002; Iseki *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2006). In PAC $\alpha$  ist dies das Tyr60 in F1 und das Tyr472 in F2 (Looser *et al.*, 2009). Wurden diese Tyrosine in PAC $\alpha$  zu einem Phenylalanin mutiert, ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse, je nachdem, ob die Mutation

in F1 oder in F2 durchgeführt wurde.

Die Mutante *PAC $\alpha$  Y60F* zeigt die für *PAC $\alpha$*  Wildtyp bekannte Dunkelaktivität. Durch Belichtung kann diese aber nicht weiter erhöht werden, wie dies im Wildtyp der Fall wäre. Im Gegensatz dazu zeigt die Mutante *PAC $\alpha$  Y472F* dasselbe Verhalten wie der Wildtyp. Die Dunkelaktivität ist vorhanden, kann aber durch Belichtung um ein Vielfaches gesteigert werden (Looser *et al.*, 2009).

Dies könnte bedeuten, dass die F2-Domäne für die Lichtperzeption nicht zwingend notwendig ist. Vielmehr könnte F2 als zusätzlicher Lichtsensor dienen, der die Energie des absorbierten Photons an F1 weitergibt, aber die Zyklase nicht direkt aktivieren kann. Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine Mutante von *PAC $\alpha$*  hergestellt, bei der die BLUF-Domäne 2 vollständig entfernt wurde (93 AS, Leu467 - Thr559).

Die so erhaltene Mutante zeigte keinerlei Zyklaseaktivität mehr, weder im Dunkeln, noch nach Belichtung (siehe Abb. 3.18). Das Protein wurde aber translatiert, was durch Koexpressionsexperimente mit *PAC $\alpha$  C1-* bzw. *C2-Knockoutmutanten* gezeigt werden konnte. Hierbei konnte Zyklaseaktivität für den Fall nachgewiesen werden, in dem *PAC $\alpha$  dF2* zusammen mit *PAC $\alpha$  C1 k.o.* exprimiert wurde, nicht aber bei Koexpression mit *PAC $\alpha$  C2 k.o.*

Dies deutet darauf hin, dass zumindest die N-terminale Hälfte von *PAC $\alpha$  dF2* korrekt gefaltet wird und sich so ein funktionelles Heterodimer zwischen der C1-Domäne von *PAC $\alpha$  dF2* und der C2-Domäne von *PAC $\alpha$  C1 k.o.* ausbilden kann. Möglicherweise wurde die Struktur der C-terminalen Hälfte von *PAC $\alpha$  dF2* durch die Deletion einer ganzen Domäne so stark verändert, dass sich die C2-Domäne nicht mehr korrekt falten konnte.

Oder sie war korrekt gefaltet, konnte durch ihre veränderte räumliche Orientierung aber kein korrektes Dimer mit der C1-Domäne einer anderen PAC-Untereinheit bilden, weshalb bei der Koexpression mit *PAC $\alpha$  C2 k.o.* keine Leitwertänderung auftrat. Eine andere Möglichkeit ist, dass die F2-Domäne doch direkt an der Lichtperzeption beteiligt ist. So

haben Ito *et al.* (2005) gezeigt, dass in rekombinanten GST-F2 Fusionsproteinen durch die Mutation Y472F die Lichtantwort unterbunden wurde und keine Verschiebung im Absorptionsspektrum nach Belichtung beobachtet werden konnte.

Die Deletion einer vollständigen Domäne eines Proteins stellt eine sehr große Veränderung des gesamten Proteins dar. Daher ist diese Methode zur Untersuchung der Funktion einer einzelnen Domäne im Fall von PAC nicht gut geeignet.

#### 4.6.2 Deletion des C-Terminus

Über die Funktion des C-Terminus von PAC ist noch wenig bekannt. Um mehr darüber zu erfahren, wurden Mutanten von PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ -Mutanten hergestellt, bei denen der C-Terminus, also der Bereich nach der C2-Domäne, entfernt wurde. So fehlten in der Mutante PAC $\alpha$  *dCT* 225 AS (Lys767 - Thr991) und in PAC $\beta$  *dCT* fehlten 67 AS (Ile750 - Ser816).

Die Mutanten zeigten in Einzelexpression in Oocyten weder Dunkelaktivität noch konnte nach Belichtung Zyklaseaktivität gemessen werden. Auch bei Koexpression mit C1- und C2-Knockoutmutanten war keine Zyklaseaktivität nachweisbar. Dies könnte bedeuten, dass das Protein nicht korrekt translatiert wurde. Es könnte aber auch darauf hin deuten, dass der C-Terminus für die korrekte Funktion von PAC benötigt wird.

Der C-Terminus von PAC $\alpha$  enthält eine LRR-Region (*Leucine-rich repeats*), die zur Ribonukleaseinhibitor-ähnlichen Unterfamilie gehört. Diese 20-29 AS umfassende Region ist in vielen Proteinen enthalten und dort an der Protein-Protein-Interaktion beteiligt. Für PAC $\alpha$  könnte dies bedeuten, dass diese Region für die Dimerisierung zweier PAC-Untereinheiten benötigt wird.

In PAC $\beta$  fehlt diese Region und der C-Terminus ist um 150 AS kürzer. Nach der Entdeckung von PAC wurde davon ausgegangen, dass die funktionelle Einheit *in vivo* ein  $\alpha_2\beta_2$  Tetramer ist (Iseki *et al.*, 2002). Dann könnte der C-Terminus von PAC $\alpha$  für die Bildung

dieses Tetramers verantwortlich sein.

Messungen an heterolog exprimiertem PAC in Oocyten ergaben, dass eine funktionelle Einheit auch ausschließlich aus mehreren PAC $\alpha$ - bzw. mehreren PAC $\beta$ -Untereinheiten bestehen kann (Schröder-Lang *et al.*, 2007). Dies bedeutet für PAC $\beta$ , dass es auch ohne den LRR-Bereich mit anderen PAC-Untereinheiten interagieren und eine funktionelle Einheit bilden kann.

Ähnlich der Deletion der F2-Domäne (siehe 4.6.1) stellt die vollständige Entfernung des C-Terminus einen großen Eingriff in die Topologie des Proteins dar. Es gibt Proteine, wie das Channelrhodopsin 2, die zumindest in heterologer Expression nach einer solchen Deletion unverändert gut funktionieren (Nagel *et al.*, 2003). Weitere Experimente könnten dazu dienen, den funktionell wichtigen Teil auf PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  zu identifizieren.

## 4.7 PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären

In ihrer Funktion unterscheiden sich PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  nach bisherigen Untersuchungen nur in der Höhe ihrer Zykklaseaktivität. So musste von PAC $\beta$  die 100-fache Menge an RNA im Vergleich zu PAC $\alpha$  in Oocyten injiziert werden, um dieselbe lichtinduzierte Leitwertänderung hervorzurufen (Schröder-Lang *et al.*, 2007).

In 3.3 wurde beschrieben, dass PAC $\alpha$  ein funktionelles Heterodimer mit PAC $\beta$  bilden kann. Hierfür wurden C1- und C2-Knockoutmutanten miteinander koexprimiert. Eine Dimerisierung von PAC $\alpha$  mit PAC $\beta$  konnte nur nachgewiesen werden, wenn *PAC $\alpha$  C1 k.o.* mit *PAC $\beta$  C2 k.o.* koexprimiert wurde.

Das heißt, dass in diesem Dimer die intakte C1-Domäne von PAC $\beta$  mit der intakten C2-Domäne von PAC $\alpha$  interagiert. Dieses Dimer zeigte eine Zykklaseaktivität, die höher war, als die des PAC $\beta$ -Wildtyps (siehe 3.8). Folglich ist eine mögliche Ursache der erhöhten Zykklaseaktivität von PAC $\alpha$  gegenüber PAC $\beta$  in der C-terminalen Hälfte von PAC (F2,

C2, CT) zu suchen. Zu diesem Zweck wurden PAC-Chimären hergestellt, die jeweils die N-terminale Seite der einen PAC-Untereinheit besaßen (NT, F1, C1) und die C-terminale Seite der anderen Untereinheit (F2, C2, CT).

Beide so hergestellten Chimären waren dabei noch funktionell. Diejenige Chimäre, die den C-terminalen Teil von PAC $\alpha$  besaß ( $PAC/F1\ C1$ ] <sub>$\beta$</sub>  [ $F2\ C2\ CT$ ] <sub>$\alpha$</sub> ), hatte sogar eine Zyklaseaktivität, die mit der des PAC $\alpha$ -Wildtyps vergleichbar war. Dies bestätigte die Vermutung, dass in der C-terminalen Seite von PAC $\alpha$  die Ursache für die erhöhte Zyklaseaktivität gegenüber PAC $\beta$  zu finden ist.

Wie in 4.6.2 beschrieben, ist der größte Unterschied zwischen PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  die Länge des C-Terminus. Beide Proteine sind von der N-terminalen Seite bis zum Ende der C2-Domäne zu 75 % identisch in ihrer Aminosäuresequenz. Danach besitzt PAC $\alpha$  einen C-terminalen Teil mit einer Länge von  $\sim 250$  AS, während dieser Teil in PAC $\beta$  nur  $\sim 100$  AS lang ist.

Somit läge es nahe, die Ursache für die unterschiedlich starke Zyklaseaktivität auf der C-terminalen Seite zu suchen. Hierfür wären weitere PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ -Chimären erforderlich. Denkbar wäre ein Austausch der C2-Domäne mit und ohne den C-Terminus. Interessant wäre auch eine Chimäre, die nur F1, C1, F2, C2 von PAC $\alpha$  besitzt, aber den C-Terminus von PAC $\beta$ .

## 4.8 Veränderung der Substratspezifität

In Purin-Nukleotidzyklasen gibt es bestimmte Aminosäuren, die für die Erkennung des Nukleotids zuständig sind. Für Guanylatzyklasen wurden diese bereits gut charakterisiert. So ist es möglich, durch Mutation der zwei Aminosäuren Glu925 und Cys995 in Lys und Asp, aus der Guanylatzyklase RetGC-1 (*Bos taurus*) eine Adenylatzyklase zu machen (Tucker *et al.*, 1998).

Sunahara *et al.* (1998) konnten durch Mutation dieser zwei Aminosäuren in umgekehrte Richtung (Lys938Glu, Asp1018Cys) aus einer Adenylatzyklase eine unspezifische Purin-Nukleotidzyklase machen. Später gelang es Kasahara *et al.* (2001) durch Mutation von drei Aminosäuren (Lys533Glu, Ile603Arg, Asp605Cys), eine Adenylatzyklase in eine Guanylatzyklase zu verändern. Anhand dieser Vorlagen sollten die entsprechenden Mutationen in PAC $\alpha$  vorgenommen werden, um die Substratspezifität von ATP nach GTP zu verschieben.

Auch in diesem Fall gelang dies nicht durch die Mutation von nur zwei Aminosäuren. Für die Mutanten PAC $\alpha$  K660E E729C und PAC $\alpha$  K660E E729R stellte sich heraus, dass ihre Zyklaseaktivität der des PAC $\alpha$ -Wildtyps entsprach. Dies macht Sinn, da sich bei einem Sequenzvergleich der PAC-Zyklasedomänen mit anderen Zyklasedomänen ergab, dass die C2-Domäne aus PAC keinen Einfluss auf die Substratspezifität haben kann, sondern lediglich an der katalytischen Umsetzung des Triphosphats in ein zyklisches Phosphat beteiligt ist.

Folglich mussten die Substrat-bestimmenden Aminosäuren in der katalytischen Domäne C1 zu finden sein. Über die Mutation K250E bestand kein Zweifel, da sich in allen oben erwähnten Arbeiten an dieser Position ein Lysin für Adenylatzyklaseaktivität und ein Glutamat für Guanylatzyklaseaktivität befand.

Als eine weitere beteiligte Aminosäure wurde D317 identifiziert. Wurde dieses Aspartat zu einem Cystein mutiert, so war die Adenylatzyklaseaktivität deutlich beeinträchtigt (siehe Abb. 3.21), aber noch vorhanden (siehe Abb. 3.22). Ebenso spielte die Aminosäure T319 eine wichtige Rolle. Die Mutation T319C führte zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins (siehe Abb. 3.23).

Da mit Doppelmutanten keine Veränderung der Substratspezifität möglich war, wurden Tripelmutanten hergestellt, bei denen außer den als wichtig identifizierten Aminosäuren in C1 K250, D317 und T319 an Position 729 in C2 das Glutamat gegen ein Arginin aus-



getauscht wurde (*PAC $\alpha$  K250E D317C E729R* und *PAC $\alpha$  K250E T319C E729R*). Diese dritte Mutation führte zu keiner Veränderung gegenüber den Doppelmutanten (siehe Abb. 3.24). Dies bestätigt die Annahme, dass die Zyklasedomäne C2 nicht an der Purinspezifität beteiligt ist.

Nachdem es Rauch *et al.* (2008) gelang, die Struktur der Guanylatzyklase Cya2 aus *Synechocystis PCC6803* aufzuklären, wurde deutlich, dass ein Tyrosin und ein Glycin bei der Substratbindung in Guanylatzyklasen weitere Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen, die in Adenylatzyklasen nicht vorkommen. Mit diesem Wissen wurde die Tripelmutante *PAC $\alpha$  K250E T319G S329Y* hergestellt.

Für diese Mutante konnte Zyklaseaktivität nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.27), die Unterscheidung zwischen Guanylat- und Adenylatzyklaseaktivität war in elektrophysiologischen Messungen jedoch nicht möglich. Aber immunologische Messungen an Oocyten ergaben, dass die cGMP-Konzentration durch Belichtung erhöht werden konnte. Die gemessene cAMP-Konzentration war im Vergleich zu Kontrollzellen kaum erhöht.

In Kontrollzellen lag diese Konzentration bei um 2  $\mu$ M, was aber einen systematischen Fehler darstellt: Der Antikörper gegen cAMP bindet ATP zwar etwa 800 $\times$  schwächer als cAMP, doch liegt ATP in der Zelle in einer sehr viel höheren Konzentration als cAMP vor. Das bedeutet, dass cAMP-Konzentrationen unter 2  $\mu$ M mit dieser Methode nur schwer gemessen werden können.

In Wirklichkeit müsste die cAMP-Konzentration in Kontrollzellen unter 100 nM liegen. Dies ist der  $K_m$  der Proteinkinase A für cAMP. Läge die cAMP-Konzentration höher, so müsste die Proteinkinase A permanent aktiv sein, der Kanal CFTR wäre permanent geöffnet, was cAMP-Messungen mit CFTR unmöglich machen würde. Dies ist aber nicht der Fall.

Um die Guanylatzyklase-Eigenschaften der Tripelmutante *PAC $\alpha$  K250E T319G S329Y* noch weiter zu verbessern, wurde noch eine vierte Mutation eingeführt. An der bereits als wichtig identifizierten Position 317 wurde das Aspartat gegen ein Lysin ausgetauscht. In

Cya2 dient das Lysin der Stabilisierung des Glutamats, welches in der PAC-Mutante an Position 250 sitzt (Rauch *et al.*, 2008).

Die daraus entstandene Quadrupelmutante *PAC $\alpha$  K250E D317K T319G S329Y* zeigte in elektrophysiologischen Messungen Zyklaseaktivität. Hierbei konnte nur festgestellt werden, dass es sich sowohl um Adenylat- als auch um Guanylatzyklaseaktivität handelte, nicht aber in welchem Verhältnis (siehe Abb. 3.28).

Aus diesem Grund wurden ebenfalls immunologische cAMP- und cGMP-Messungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass diese Mutante eine mit der Tripelmutante vergleichbare Adenylatzyklaseaktivität besaß und eine gegenüber der Tripelmutante erhöhte Guanylatzyklaseaktivität aufwies (siehe Abb. 3.29). Die gemessene Konzentration an cGMP lag in den belichteten Oocyten beinahe doppelt so hoch wie die cAMP-Konzentration.

Um die Adenylatzyklaseaktivität der Tripelmutante *PAC $\alpha$  K250E T319G S329Y* und der Quadrupelmutante *PAC $\alpha$  K250E D317K T319G S329Y* gegenüber der des PAC $\alpha$ -Wildtyps abschätzen zu können, müssen verschiedene Punkte berücksichtigt werden. Zunächst waren in den Messungen des Wildtyps nur 3 ng RNA injiziert (Schröder-Lang *et al.*, 2007), während bei den Messungen mit den Mutanten 20 ng injiziert waren.

Die Oocyten mit dem Wildtyp hatten im Dunkeln 25  $\mu$ M cAMP, nach 5 min Belichtung 250  $\mu$ M. Sowohl für die Tripel- als auch für die Quadrupelmutante wurden nach der Belichtung 3,4  $\mu$ M cAMP gemessen. Der tatsächliche Wert muss niedriger sein, da wegen der Kreuzreaktion mit ATP im Immunoassay der geringste messbare Wert bei ca. 2  $\mu$ M liegt (siehe 2.6). Er wird daher auf ca. 1  $\mu$ M geschätzt.

Im Dunkeln lag der gemessene Wert bei 2,2  $\mu$ M (TM) und 2,7  $\mu$ M (QM), muss aber wegen oben genannter Gründe in Wahrheit niedriger sein. Der Wert muss im Bereich von 0,1  $\mu$ M liegen, da dies der  $K_m$ -Wert für die PKA ist und bereits mit 5 ng RNA eine erhöhte Leitfähigkeit in unbelichteten Oocyten gemessen werden konnte (siehe Abb. 3.27 und Abb. 3.28). Somit ergibt sich für die Dunkelaktivität des PAC $\alpha$ -Wildtyps ein Wert von 8,3  $\mu$ M cAMP

$(\text{ng RNA})^{-1}$ , während die PGC-Mutanten einen Wert von  $0,005 \mu\text{M cAMP} (\text{ng RNA})^{-1}$  aufweisen. Die Dunkelaktivität der PGC-Mutanten entspricht folglich  $0,06\%$  der Dunkelaktivität des Wildtyps.

Nach der Belichtung ergaben sich die Werte von  $17 \mu\text{M cAMP} (\text{ng RNA} \cdot \text{min})^{-1}$  für PAC $\alpha$ -Wildtyp und  $0,05 \mu\text{M cAMP} (\text{ng RNA} \cdot \text{min})^{-1}$ . Demnach ist die Lichtaktivität der PGC-Mutanten  $0,3\%$  der Lichtaktivität des Wildtyps.

Die in dieser Arbeit erzeugte PAC-Quadrupelmutante PAC $\alpha$  K250E D317K T319G S329Y zeigte, dass es auch für PAC möglich ist, die Substratspezifität durch Mutation einzelner Aminosäuren zu verändern. Aber wie bei den Versuchen von Sunahara *et al.* (1998) konnte aus einer Adenylatzyklase keine reine Guanylatzyklase hergestellt werden, sondern es war immer noch Adenylatzyklaseaktivität vorhanden.

Die cGMP-Konzentration in unbelichteten Oocyten mit der Quadrupelmutante lag mit  $1,7 \mu\text{M}$  ca. 30-fach über der unbelichteter Kontrollzellen ( $0,05 \mu\text{M}$ ). Durch Belichtung wurde dieser Wert auf  $5 \mu\text{M}$  verdreifacht. Diese Mutante hat daher im Dunkeln eine Guanylatzyklaseaktivität von  $0,09 \mu\text{M cGMP} (\text{ng RNA})^{-1}$  und im Licht von  $0,25 \mu\text{M cGMP} (\text{ng RNA} \cdot \text{min})^{-1}$ .

Die Guanylatzyklaseaktivität dieser Mutante liegt folglich im Dunkeln ca. 18-fach und im Licht ca. 5-fach über ihrer Adenylatzyklaseaktivität. Diese Werte sind lediglich Abschätzungen, da die Phosphodiesterasen bei der cAMP-Homöostase maßgeblich beteiligt sind, und deren cNMP-abhängige Aktivität hierbei nicht berücksichtigt wurde.

Somit konnte mit der Quadrupelmutante PAC $\alpha$  so weit verändert werden, dass es eine höhere Guanylat- als Adenylatzyklaseaktivität besitzt. Es ist denkbar, dass durch die Mutation weiterer Aminosäuren die Spezifität weiter in Richtung GTP verschoben werden könnte. Ebenso könnten weitere Mutationen dazu führen, dass die Aktivität insgesamt weiter zunimmt.

## 5 Zusammenfassung

Die Photoaktivierte Adenylatzyklase PAC ist in *E. gracilis* an der Phototaxis beteiligt und besteht aus den zwei unterschiedlich großen Proteinen PAC $\alpha$  und PAC $\beta$ . Beide besitzen jeweils zwei FAD bindende (BLUF) Domänen F1 und F2 sowie zwei Zyklasedomänen C1 und C2. An den Zyklasedomänen findet die Umsetzung von ATP in cAMP statt und die BLUF-Domänen werden für die Lichtaktivierung benötigt. Für diese Arbeit wurde PAC und Mutanten davon heterolog in Oocyten von *Xenopus laevis* exprimiert.

PAC besitzt bereits im Dunkeln Adenylatzyklaseaktivität, die durch Belichtung erhöht werden kann. Die Zunahme der Aktivität erfolgt mit einer Zeitkonstante von unter 100 ms, die Abnahme nach der Belichtung hat eine Zeitkonstante im Bereich von 10 ms.

Das für die katalytische Umsetzung in allen Klasse III Nukleotidzyklasen benötigte Dimer zweier Zyklasedomänen ist in PAC das Dimer aus C1 und C2. Durch Messungen mit PAC-Mutanten, bei denen jeweils eine Zyklasedomäne defekt war, konnte gezeigt werden, dass diese Dimerisierung in PAC $\alpha$  intermolekular auftritt. Ebenso wurde gezeigt, dass ein solches Dimer aus Zyklasedomänen von PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  bestehen kann.

Der Austausch der Zyklasedomänen von PAC $\alpha$  durch Zyklasedomänen der Guanylatzyklasen GCY35 und GCY36 aus *C. elegans* führte zu einem Verlust der Zyklaseaktivität. Die Proteine wurden aber zumindest teilweise korrekt gefaltet, was durch Dimerbildung mit Knockoutmutanten von PAC $\alpha$  in Koexpressionsexperimenten gezeigt werden konnte.

Die Fusionsproteine aus PAC $\alpha$  und den CNG-Kanälen CNGA2 und OLF führten in Oocyten zu einer deutlich geringeren Leitwertänderung als eine Expression der Einzelproteine. Sowohl bei einer N-terminalen Fusion des Kanals an PAC $\alpha$  als auch bei der C-terminalen Fusion war es jeweils der Kanal, der im Fusionsprotein stark gehemmt war.

Eine Deletion des C-Terminus von PAC $\alpha$  führte zu einem nicht funktionsfähigen Protein, das auch in Koexpression mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten keine messbare Adenylatzyklase-

aktivität zeigte. Wurde die F2-Domäne deletiert, so verlor PAC $\alpha$  ebenfalls seine Zyklaseaktivität vollständig. Die C1-Domäne war aber korrekt gefaltet, was durch eine Koexpression mit PAC $\alpha$ -Mutanten gezeigt werden konnte, die in einer ihrer Zyklasedomänen defekt waren.

Beide Chimären aus PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  besaßen Adenylatzyklaseaktivität. Diese war bei der Chimäre mit dem C-terminalen Teil von PAC $\alpha$  deutlich höher als bei der Chimäre mit dem C-terminalen Teil von PAC $\beta$ , was darauf hindeutet, dass im C-terminalen Teil von PAC der Grund für den Aktivitätsunterschied zwischen PAC $\alpha$  und PAC $\beta$  liegt.

Für die Veränderung der Substratspezifität von einer Adenylat- zu einer Guanylatzyklase waren Mutationen an mindestens drei Aminosäuren erforderlich. Die ebenfalls hergestellten Einzel- und Doppelmутanten verhielten sich wie der Wildtyp oder hatten eine deutlich eingeschränkte Adenylatzyklaseaktivität. Bei der Tripelmutante PAC $\alpha$  K250E T319G S329Y war Guanylatzyklaseaktivität nachweisbar, die aber geringer war als die noch vorhandene Adenylatzyklaseaktivität.

Die Quadrupelmutante PAC $\alpha$  K250E D317K T319G S329Y zeigte ebenfalls lichtinduzierbare Adenylatzyklaseaktivität, die ca. 0,3% der Aktivität der Wildtyp-PAC $\alpha$  entsprach. Die Guanylatzyklaseaktivität dieser Mutante war ca. dreifach höher als deren Adenylatzyklaseaktivität. Somit konnte gezeigt werden, dass sich durch die Mutation weniger einzelner Aminosäuren die Substratspezifität von PAC $\alpha$  von ATP nach GTP verschieben lässt.

## 6 Summary

The photoactivated adenylyl cyclase PAC is involved in phototaxis in *E. gracilis*. It consists of two subunits of different size which are called PAC $\alpha$  and PAC $\beta$ . Both of them harbour two FAD-binding domains (F1, F2) and two cyclase domains (C1, C2). PAC and mutants of PAC have been heterologously expressed in Oocytes of *Xenopus laevis*.

Already in darkness PAC shows a basal level of adenylyl cyclase activity, which can be increased by illumination. The increase in cyclase activity occurs with a time constant lower than 100 ms, whereas the decrease after illumination has a time constant around 10 ms.

The dimer of two cyclase domains, which is necessary for catalytic conversion in all class III cyclases, is formed of C1 and C2 in PAC. In electrophysiological experiments with PAC mutants which were defective in either of the cyclase domains it has been shown, that this dimer in PAC occurs intermolecularly. Furthermore it has been shown, that this dimer can occur between PAC $\alpha$  and PAC $\beta$ .

Mutants of PAC $\alpha$  where the cyclase domains have been substituted by the cyclase domains of the guanylyl cyclases GCY35 and GCY36 from *C. elegans* lost their ability to produce cAMP. However coexpression experiments with PAC $\alpha$  knockout mutants indicated correct translation of the substitution mutants.

Expression of fusion proteins of PAC $\alpha$  with the CNG channels CNGA2 and OLF showed less light-inducible conductance changes than the expression of the single protein. In both the N-terminal and C-terminal fusion of the channel to PAC $\alpha$  it was the channel which was the most affected part of the fusion protein.

Deletion of the C-terminus of PAC $\alpha$  results in a non-functional protein, which in coexpression with PAC $\alpha$  knockout mutants shows no measurable cyclase activity. When deleting the F2-domain, PAC $\alpha$  also loses its cyclase activity completely. However, the C1-domain was transcribed correctly, which could be shown by coexpression with a C1-knockout mu-

tant.

Both PAC $\alpha$ -PAC $\beta$  chimeras showed adenylyl cyclase activity. Whereas the activity in the chimera with the C-terminal part of PAC $\beta$  showed little cyclase activity, the chimera possessing the C-terminal part of PAC $\alpha$  showed adenylyl cyclase activity, which was comparable to the wildtype of PAC $\alpha$ . This indicates that the part of PAC which is responsible for the difference in cyclase activity between PAC $\alpha$  and PAC $\beta$  must be present in the C-terminal half of PAC.

For altering PAC $\alpha$ 's substrate specificity it was necessary to mutate at least three amino acids. The single and double mutants of PAC $\alpha$  which were generated resulted in wildtype-like behaviour or reduced adenylyl cyclase activity. The triple mutant *PAC $\alpha$  K250E T319G S329Y* showed guanylyl cyclase activity which was lower than its remaining adenylyl cyclase activity.

The quadruple mutant *PAC $\alpha$  K250E D317K T319G S329Y* also showed adenylyl cyclase activity, which was about 0.3% of the activity in PAC $\alpha$  wildtype. The guanylyl cyclase activity of this mutant was about threefold higher than its adenylyl cyclase activity. Thus, it could be shown, that by mutating few single amino acids the substrate specificity of PAC $\alpha$  was shifted from ATP to GTP.

## Literatur

- ALTENHOFEN, W., LUDWIG, J., EISMANN, E., KRAUS, W., BONIGK, W. & KAUPP, U. (1991). Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(21), 9868–9872.
- ASSMANN, S. M. (1995). Cyclic AMP as a second messenger in higher plants (status and future prospects). *Plant Physiol* **108**(3), 885–889.
- BARTLETT, C. J., WALNE, P. L., SCHWARZ, O. J. & BROWN, D. H. (1972). Large scale isolation and purification of eyespot granules from euglena gracilis var. bacillaris. *Plant Physiol* **49**(6), 881–885.
- BATRA, P. P. & TOLLIN, G. (1964). Phototaxis in euglena. i. isolation of the eye-spot granules and identification of the eye-spot pigments. *Biochim Biophys Acta* **79**, 371–378.
- BOTSFORD, J. L. & HARMAN, J. G. (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* **56**(1), 100–122.
- BRIDGES, D., FRASER, M. E. & MOORHEAD, G. B. G. (2005). Cyclic nucleotide binding proteins in the arabidopsis thaliana and oryza sativa genomes. *BMC Bioinformatics* **6**, 6.
- BÂRZU, O. & DANCHIN, A. (1994). Adenylyl cyclases: a heterogeneous class of ATP-utilizing enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **49**, 241–283.
- CARRÉ, I. A. & EDMUNDS, L. N. (1992). cAMP-dependent kinases in the algal flagellate euglena gracilis. *J Biol Chem* **267**(4), 2135–2137.
- CARRÉ, I. A. & EDMUNDS, L. N. (1993). Oscillator control of cell division in euglena: cyclic AMP oscillations mediate the phasing of the cell division cycle by the circadian clock. *J Cell Sci* **104** ( Pt 4), 1163–1173.
- CASAS-FLORES, S., RIOS-MOMBERG, M., ROSALES-SAAVEDRA, T., MARTINEZ-HERNANDEZ, P., OLMEDO-MONFIL, V. & HERRERA-ESTRELLA, A. (2006). Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot Cell* **5**(3), 499–506.
- CHENG, S. H., RICH, D. P., MARSHALL, J., GREGORY, R. J., WELSH, M. J. & SMITH, A. E. (1991). Phosphorylation of the r domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* **66**(5), 1027–1036.
- CHENNA, R., SUGAWARA, H., KOIKE, T., LOPEZ, R., GIBSON, T. J., HIGGINS, D. G. & THOMPSON, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**(13), 3497–3500.
- CHEUNG, B. H. H., ARELLANO-CARBAJAL, F., RYBICKI, I. & DE BONO, M. (2004). Soluble guanylate cyclases act in neurons exposed to the body fluid to promote *C. elegans* aggregation behavior. *Curr Biol* **14**(12), 1105–1111.



- COTTA, M. A., WHITEHEAD, T. R. & WHEELER, M. B. (1998). Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol Lett* **164**(2), 257–260.
- COUSSON, A. (2001). Pharmacological evidence for the implication of both cyclic GMP-dependent and -independent transduction pathways within auxin-induced stomatal opening in *Commelina communis* (L.). *Plant Sci* **161**(2), 249–258.
- DHALLAN, R. S., YAU, K. W., SCHRADER, K. A. & REED, R. R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* **347**(6289), 184–187.
- DIEHN, B. (1969). Action spectra of the phototactic responses in euglena. *Biochim Biophys Acta* **177**(1), 136–143.
- FINKEL, A. & REDMAN, S. (1985). Optimal voltage clamping with single microelectrode. In: *Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes* (WILLIAMS & WILKINS, eds.). Baltimore, pp. 95–120.
- GOMELSKY, M. & KLUG, G. (2002). BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci* **27**(10), 497–500.
- GUO, Y., SEEBACHER, T., KURZ, U., LINDER, J. & SCHULTZ, J. (2001). Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *EMBO J* **20**(14), 3667–3675.
- HURLEY, J. (1998). The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Curr Opin Struct Biol* **8**(6), 770–777.
- ISEKI, M., MATSUNAGA, S., MURAKAMI, A., OHNO, K., SHIGA, K., YOSHIDA, K., SUGAI, M., TAKAHASHI, T., HORI, T. & WATANABE, M. (2002). A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* **415**(6875), 1047–1051.
- ITO, S., MURAKAMI, A., SATO, K., NISHINA, Y., SHIGA, K., TAKAHASHI, T., HIGASHI, S., ISEKI, M. & WATANABE, M. (2005). Photocycle features of heterologously expressed and assembled eukaryotic flavin-binding BLUF domains of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor in *Euglena gracilis*. *Photochem Photobiol Sci* **4**(9), 762–769.
- KANDEL, E. R. & SCHWARTZ, J. H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* **218**(4571), 433–443.
- KASAHARA, M., UNNO, T., YASHIRO, K. & OHMORI, M. (2001). CyaG, a novel cyanobacterial adenylyl cyclase and a possible ancestor of mammalian guanylyl cyclases. *J Biol Chem* **276**(13), 10564–10569.

- KAUPP, U. B., NIIDOME, T., TANABE, T., TERADA, S., BÖNIGK, W., STÜHMER, W., COOK, N. J., KANGAWA, K., MATSUO, H. & HIROSE, T. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**(6251), 762–766.
- KEREM, B., ROMMENS, J. M., BUCHANAN, J. A., MARKIEWICZ, D., COX, T. K., CHAKRAVARTI, A., BUCHWALD, M. & TSUI, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**(4922), 1073–1080.
- KIRSCHNER, L. S., YIN, Z., JONES, G. N. & MAHONEY, E. (2009). Mouse models of altered protein kinase a signaling. *Endocr Relat Cancer* **16**(3), 773–793.
- KRUPA, A., ANAMIKA & SRINIVASAN, N. (2006). Genome-wide comparative analyses of domain organisation of repertoires of protein kinases of arabidopsis thaliana and oryza sativa. *Gene* **380**(1), 1–13.
- LEBERT, M. & HADER, D. P. (1997). Behavioral mutants of euglena gracilis: functional and spectroscopic characterization. *J Plant Physiol* **151**(2), 188–195.
- LINDER, J. (2006). Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol Life Sci* **63**(15), 1736–1751.
- LINDER, J. & SCHULTZ, J. (2003). The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal.* **15**(12), 1081–1089.
- LIU, D. T., TIBBS, G. R. & SIEGELBAUM, S. A. (1996). Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* **16**(5), 983–990.
- LIU, Y., RUOHO, A. E., RAO, V. D. & HURLEY, J. H. (1997). Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25), 13414–13419.
- LOOSER, J., SCHRÖDER-LANG, S., HEGEMANN, P. & NAGEL, G. (2009). Mechanistic insights in light-induced cAMP production by photoactivated adenylyl cyclase alpha (PAC $\alpha$ ). *Biol Chem* **390**(11), 1105–1111.
- LUDIDI, N. & GEHRING, C. (2003). Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **278**(8), 6490–6494.
- MAATHUIS, F. J. & SANDERS, D. (2001). Sodium uptake in arabidopsis roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol* **127**(4), 1617–1625.
- MAATHUIS, F. J. M. (2006). cGMP modulates gene transcription and cation transport in arabidopsis roots. *Plant J* **45**(5), 700–711.
- MARTINEZ-ATIENZA, J., INGELGEM, C. V., ROEF, L. & MAATHUIS, F. J. (2007). Plant cyclic nucleotide signalling: facts and fiction. *Plant Signal Behav* **2**(6), 540–543.

- MENZEL, R. & MÜLLER, U. (1996). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* **19**, 379–404.
- MOHABIR, G. & EDMUNDS, L. N. (1999). Circadian clock regulation of the bimodal rhythm of cyclic AMP in wild-type euglena. *Cell Signal* **11**(2), 143–147.
- MOUTINHO, A., HUSSEY, P. J., TREWAVAS, A. J. & MALHÓ, R. (2001). cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18), 10481–10486.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263–273.
- NAGAHAMA, T., SUZUKI, T., YOSHIKAWA, S. & ISEKI, M. (2007). Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) into aplysia sensory neurons. *Neurosci Res* **59**(1), 81–88.
- NAGEL, G., SZELLAS, T., HUHN, W., KATERIYA, S., ADEISHVILI, N., BERTHOLD, P., OLLIG, D., HEGEMANN, P. & BAMBERG, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24), 13940–13945.
- NAIRN, A. C., HEMMINGS, H. C. & GREENGARD, P. (1985). Protein kinases in the brain. *Annu Rev Biochem* **54**, 931–976.
- NEWTON, R. P. & SMITH, C. J. (2004). Cyclic nucleotides. *Phytochemistry* **65**(17), 2423–2437.
- NTEFIDOU, M., ISEKI, M., WATANABE, M., LEBERT, M. & HADER, D. (2003). Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate euglena gracilis. *Plant Physiol* **133**(4), 1517–1521.
- NTEFIDOU, M., LUDTKE, T., AHMAD, M. & HADER, D. (2006). Heterologous expression of photoactivated adenylyl cyclase (PAC) genes from the flagellate euglena gracilis in insect cells. *Photochem Photobiol* **82**(6), 1601–1605.
- PHARMAWATI, M., BILLINGTON, T. & GEHRING, C. A. (1998). Stomatal guard cell responses to kinetin and natriuretic peptides are cGMP-dependent. *Cell Mol Life Sci* **54**(3), 272–276.
- PICCINI, E. & MAMMI, M. (1978). Motor apparatus of euglena gracilis: ultrastructure of the basal portion of the flagellum and the paraflagellar body. *Boll Zool* **45**, 405–414.
- RAUCH, A., LEIPELT, M., RUSSWURM, M. & STEEGBORN, C. (2008). Crystal structure of the guanylyl cyclase Cya2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(41), 15720–15725.
- RICH, T., TSE, T., ROHAN, J., SCHAACK, J. & KARPEN, J. (2001). In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* **118**(1), 63–78.

- RIORDAN, J., ROMMENS, J., KEREM, B., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., ZIELENSKI, J., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J. & . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**(4922), 1066–1073.
- ROMMENS, J. M., IANNUZZI, M. C., KEREM, B., DRUMM, M. L., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J. L., KENNEDY, D. & HIDAKA, N. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**(4922), 1059–1065.
- SCHRÖDER-LANG, S., SCHWÄRZEL, M., SEIFERT, R., STRÜNKER, T., KATERIYA, S., LOOSER, J., WATANABE, M., KAUPP, U., HEGEMANN, P. & NAGEL, G. (2007). Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo. *Nat Methods* **4**(1), 39–42.
- SCHWARTZ, J. H. & GREENBERG, S. M. (1987). Molecular mechanisms for memory: second-messenger induced modifications of protein kinases in nerve cells. *Annu Rev Neurosci* **10**, 459–476.
- SISMEIRO, O., TROTOT, P., BIVILLE, F., VIVARES, C. & DANCHIN, A. (1998). *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol* **180**(13), 3339–3344.
- STEEGBORN, C., LITVIN, T. N., LEVIN, L. R., BUCK, J. & WU, H. (2005). Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol* **12**(1), 32–37.
- SUNAHARA, R., BEUVE, A., TESMER, J., SPRANG, S., GARBERS, D. & GILMAN, A. (1998). Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem* **273**(26), 16332–16338.
- SUNAHARA, R. K., DESSAUER, C. W. & GILMAN, A. G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 461–480.
- SZMIDT-JAWORSKA, A., JAWORSKI, K., TRETYN, A. & KOPCEWICZ, J. (2003). Biochemical evidence for a cGMP-regulated protein kinase in *pharbitis nil*. *Phytochemistry* **63**(6), 635–642.
- TESMER, J. J., DESSAUER, C. W., SUNAHARA, R. K., MURRAY, L. D., JOHNSON, R. A., GILMAN, A. G. & SPRANG, S. R. (2000). Molecular basis for p-site inhibition of adenylyl cyclase. *Biochemistry* **39**(47), 14464–14471.
- TESMER, J. J. & SPRANG, S. R. (1998). The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol* **8**(6), 713–719.
- TESMER, J. J., SUNAHARA, R. K., GILMAN, A. G. & SPRANG, S. R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with  $G_{sa}\cdot GTP\gamma S$ . *Science* **278**(5345), 1907–1916.

- TESMER, J. J., SUNAHARA, R. K., JOHNSON, R. A., GOSSELIN, G., GILMAN, A. G. & SPRANG, S. R. (1999). Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science* **285**(5428), 756–760.
- THEVELEIN, J. M. & DE WINDE, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase pathway in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**(5), 904–918.
- TÉLLEZ-SOSA, J., SOBERÓN, N., VEGA-SEGURA, A., TORRES-MÁRQUEZ, M. E. & CEVALLOS, M. A. (2002). The rhizobium *etli* *cyaC* product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J Bacteriol* **184**(13), 3560–3568.
- TONG, J. & EDMUNDS, L. N. (1993). Role of cyclic GMP in the mediation of circadian rhythmicity of the adenylate cyclase-cyclic AMP-phosphodiesterase system in euglena. *Biochem Pharmacol* **45**(10), 2087–2091.
- TUCKER, C., HURLEY, J., MILLER, T. & HURLEY, J. (1998). Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11), 5993–5997.
- TYSON, J. J. & MURRAY, J. D. (1989). Cyclic AMP waves during aggregation of dictyostelium amoebae. *Development* **106**(3), 421–426.
- VAANDRAGER, A. B., EDIXHOVEN, M., BOT, A. G., KROOS, M. A., JARCHAU, T., LOHMANN, S., GENIESER, H. G. & DE JONGE, H. R. (1997). Endogenous type ii cgmp-dependent protein kinase exists as a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type i isoforms. *J Biol Chem* **272**(18), 11816–11823.
- VAANDRAGER, A. B., EHLERT, E. M., JARCHAU, T., LOHMANN, S. M. & DE JONGE, H. R. (1996). N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cgmp-dependent protein kinase type ii. *J Biol Chem* **271**(12), 7025–7029.
- VOLOTOVSKI, SOKOLOVSKY, MOLCHAN & KNIGHT (1998). Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. *Plant Physiol* **117**(3), 1023–1030.
- WHISNANT, R. E., GILMAN, A. G. & DESSAUER, C. W. (1996). Interaction of the two cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13), 6621–6625.
- WOLKEN, J. J. (1977). Euglena: the photoreceptor system for phototaxis. *J Protozool* **24**(4), 518–522.
- YAN, S. Z., HAHN, D., HUANG, Z. H. & TANG, W. J. (1996). Two cytoplasmic domains of mammalian adenylyl cyclase form a gs alpha- and forskolin-activated enzyme in vitro. *J Biol Chem* **271**(18), 10941–10945.
- YOSHIKAWA, S., SUZUKI, T., WATANABE, M. & ISEKI, M. (2005). Kinetic analysis of the activation of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), a blue-light receptor for photomovements of euglena. *Photochem Photobiol Sci* **4**(9), 727–731.

- YUAN, H., ANDERSON, S., MASUDA, S., DRAGNEA, V., MOFFAT, K. & BAUER, C. (2006). Crystal structures of the synechocystis photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling. *Biochemistry* **45**(42), 12687–12694.
- ZHANG, G., LIU, Y., RUOHO, A. & HURLEY, J. (1997). Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* **386**(6622), 247–253.
- ZHOU, C., YANG, Y. & JONG, A. Y. (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**(2), 172–173.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Flagellaten <i>Euglena gracilis</i> . . . . .	1
1.2	Eine Adenylatzyklase katalysiert die Umsetzung von ATP in cAMP, eine Phosphodiesterase die Umsetzung von cAMP in AMP. . . . .	6
1.3	Vergleich der beiden Möglichkeiten zur Bildung eines Dimers. . . . .	8
1.4	Alignment von Ausschnitten der Zyklasedomänen von PAC mit den im Text erwähnten Säuger-Zyklasedomänen vom Typ V und Typ II. . . . .	9
1.5	Übersicht über die Topologie der Proteine PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ . . . . .	11
1.6	Die Möglichkeiten der Dimerisierung bei PAC. . . . .	13
1.7	Die Möglichkeiten der Tetramerbildung bei PAC. . . . .	14
2.1	DNA-Marker $\lambda$ -PstI. . . . .	20
2.2	Schematische Darstellung eines Transkriptionsvektors . . . . .	24
2.3	Schematische Darstellung der DEVC-Technik . . . . .	35
2.4	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus . . . . .	38
2.5	Elektrophysiologische Bestimmung der Guanylatzyklase-Aktivität in Oocyten. . . . .	39
2.6	Typischer Verlauf einer elektrophysiologischen Messung der Zyklaseaktivität von PAC . . . . .	40
2.7	Beispiel einer Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration der zyklischen Nukleotide mit den <i>cyclic AMP/GMP Complete EIA Kits</i> . . . . .	42
3.1	Leitwert von PAC $\alpha$ - und OLF-exprimierenden Oocyten in Abhängigkeit der Lichtintensität und Beleuchtungsdauer . . . . .	43
3.2	Stromzunahme in Oocyten mit PAC $\alpha$ und CFTR oder CNGA2 . . . . .	44
3.3	Deaktivierungskinetik: Mittlere Leitwerte in Oocyten mit PAC $\alpha$ und CFTR nach Belichtung in Pulsen . . . . .	45

---

3.4	Sequenzvergleich der Zyklasedomänen von PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ mit den Zyklasedomänen aus anderen Nukleotidzyklasen. . . . .	47
3.5	Mögliche Dimerisierungen in PAC . . . . .	49
3.6	Koexpressionsexperimente mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten. . . . .	49
3.7	Koexpressionsexperimente mit PAC $\beta$ -Knockoutmutanten. . . . .	50
3.8	Koexpressionsexperimente mit Knockoutmutanten von PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ . .	51
3.9	Koexpressionsexperimente mit Knockoutmutanten von PAC $\alpha$ und der PAC $\alpha$ Y60F. . . . .	52
3.10	Leitwertmessungen an CFTR-exprimierenden Oocyten mit PAC $\alpha$ -Mutanten, deren Zyklasedomänen gegen die Zyklasedomäne aus GCY-35 ersetzt wurde. . . . .	54
3.11	Koexpressionsexperimente mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten und PAC $\alpha$ -Mutanten, deren Zyklasedomänen gegen die Zyklasedomäne aus GCY-35 ersetzt wurde. . . . .	55
3.12	Koexpressionsexperimente mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten und PAC $\alpha$ -Mutanten, deren Zyklasedomänen gegen die Zyklasedomäne aus GCY-35 ersetzt wurde. . . . .	56
3.13	Leitwertmessungen an CFTR-exprimierenden Oocyten mit PAC $\alpha$ -Mutanten, deren Zyklasedomänen gegen die Zyklasedomänen aus GCY-35 und aus GCY-36 ersetzt wurde. . . . .	57
3.14	Vergleich der maximalen lichtinduzierten Ströme in Oocyten mit den Fusionsproteinen CNG::PAC $\alpha$ und OLF::PAC $\alpha$ und den Einzelproteinen CN-GA2 und PAC $\alpha$ . . . . .	58
3.15	Koexpressionsexperimente in Oocyten mit dem Fusionsprotein OLF::PAC $\alpha$ und OLF bzw. PAC $\alpha$ . . . . .	59



---

3.16 Vergleich der maximalen lichtinduzierten Ströme in Oocyten mit den Fusionsproteinen CNG::PAC $\alpha$ und CNG::LINKER::PAC $\alpha$ . . . . .	60
3.17 Vergleich der maximale lichtinduzierten Ströme in Oocyten mit dem Fusionsprotein PAC $\alpha$ ::CNGA2 in Koexpression mit CNGA2 bzw. PAC $\alpha$ . . .	61
3.18 Koexpressionsexperimente mit PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten und PAC $\alpha$ -Mutanten, deren FAD-bindende Domäne F2 deletiert wurde. . . . .	62
3.19 Leitwertmessung in CFTR-exprimierenden Oocyten mit Chimären aus PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ . . . . .	63
3.20 Sequenzvergleich von Teilen der Zyklasedomänen verschiedener Nukleotidzyklasen mit PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ . . . . .	65
3.21 Leitwertmessungen in OLF-exprimierenden Oocyten mit <i>PAC<math>\alpha</math> K250E D317C</i> und <i>PAC<math>\alpha</math> K660E E729C</i> . . . . .	65
3.22 Leitwertmessungen in CFTR- und PAC $\alpha$ K250E D317C-exprimierenden Oocyten mit und ohne cGK-II. . . . .	66
3.23 Leitwertmessungen in OLF-exprimierenden Oocyten mit <i>PAC<math>\alpha</math> K250E T319</i> und <i>PAC<math>\alpha</math> K660E E729R</i> . . . . .	68
3.24 Leitwertmessungen in CFTR-exprimierenden Oocyten mit <i>PAC<math>\alpha</math> K250E D317C E729R</i> und <i>PAC<math>\alpha</math> K250E T319C E729R</i> . . . . .	69
3.25 Leitwertmessungen in CFTR- und <i>PAC<math>\alpha</math> K250E D317C E729R</i> -exprimierenden Oocyten mit und ohne cGK-II . . . . .	70
3.26 Sequenzvergleich von Ausschnitten der Zyklasedomänen aus PAC $\alpha$ , PAC $\beta$ und Cya2 aus <i>Synechocystis PCC6803</i> . . . . .	70
3.27 Leitwertmessungen in CFTR- und <i>PAC<math>\alpha</math> K250E T319G S329Y</i> -exprimierenden Oocyten mit und ohne cGK-II . . . . .	71
3.28 Leitwertmessungen in CFTR- und <i>PAC<math>\alpha</math> K250E D317K T319G S329Y</i> -exprimierenden Oocyten mit und ohne cGK-II . . . . .	73

---

3.29 Immunologische cAMP- und cGMP-Messung in Oocyten mit <i>PAC<math>\alpha</math> K250E</i> <i>T319G S329Y</i> bzw. <i>PAC<math>\alpha</math> K250E D317K T319G S329Y</i> . . . . .	74
4.1 Die Möglichkeiten der Dimerisierung bei PAC. . . . .	79
4.2 Vergleich der Möglichkeiten zur Ausbildung eines intermolekularen Pseudo- heterodimers der Zyklasedomänen von PAC $\alpha$ . . . . .	81

## Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammensetzung von LB- und SOC-Medium . . . . .	16
2.2	Zusammensetzung von TE- und TENS-Puffer . . . . .	17
2.3	Ansatz eines Restriktionsverdau . . . . .	19
2.4	Ansatz einer DNA-Ligation . . . . .	19
2.5	Zusammensetzung der DNA-Probenpuffer . . . . .	21
2.6	Zusammensetzung von 10× TBE und 10× MEN . . . . .	21
2.7	Ansatz einer PCR: die eingesetzte Menge an DNA-Template hängt ebenso wie die Annealingtemperatur von der Anwendung ab. . . . .	22
2.8	Ansatz einer <i>in vitro</i> -Mutagenese . . . . .	24
2.9	Übersicht über die verwendeten Vektoren, Transkriptionspromotoren und Linearisierungsschnittstellen. . . . .	25
2.10	Ansatz einer <i>in vitro</i> Transkription nach AmpliCap-Max <sup>TM</sup> von EPICEN- TRE <sup>TM</sup> . . . . .	25
2.11	Oligos zur Herstellung der PAC $\alpha$ -Knockoutmutanten . . . . .	26
2.12	Oligos zur Herstellung der PAC $\beta$ Knockoutmutanten . . . . .	26
2.13	Oligos zum Einfügen von Schnittstellen zur Herstellung von Fusionsprotei- nen aus PAC $\alpha$ und CNGA2 . . . . .	28
2.14	Oligos zum Einfügen von Schnittstellen zur Herstellung von PAC $\alpha$ -PAC $\beta$ - Chimären . . . . .	29
2.15	Oligos zur Herstellung der PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ -Deletionsmutanten . . . . .	30
2.16	Oligos zur Herstellung der Zyklasedomänen-Austauschmutanten . . . . .	30
2.17	Oligos zur Veränderung der Substratspezifität von PAC $\alpha$ . . . . .	31
2.18	Zusammensetzung ND96- und Standard ORi-Lösung . . . . .	32

---

2.19	Zusammensetzung der für die elektrophysiologischen Messungen verwendeten Lösungen . . . . .	37
2.20	Exprimierte Ionenkanäle und dazugehörige Halbsättigungswerte für cAMP	38
3.1	Aminosäuren aus den Zyklasedomänen von PAC $\alpha$ und PAC $\beta$ und ihre Rolle während der Umsetzung von ATP in cAMP . . . . .	48
3.2	PAC $\alpha$ - und PAC $\beta$ -Knockoutmutanten . . . . .	48
3.3	Mutationen in Purinnukleotid-Zyklasen mit Auswirkungen auf die Substratspezifität. . . . .	64
3.4	Immunologische cAMP- und cGMP-Messung in Oocyten mit PAC $\alpha$ <i>K250E T319G S329Y</i> . . . . .	71
3.5	Immunologische cAMP- und cGMP-Messung in Oocyten mit PAC $\alpha$ <i>K250E D317K T319G S329Y</i> . . . . .	73

## Abkürzungen

A	Adenin
AC	Adenylatzyklase (engl.: adenylyl cyclase)
AMP	Adenosinmonophosphat
as	antisense (Primer)
BLUF	FAD bindende Photodomäne (engl.: sensor of blue light using FAD)
bp	Basenpaar
C	Cytosin
C1/C2	Katalytische Domänen in PAC
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
cGK-II	cGMP-abhängige Kinase II
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cRNA	komplementäre RNA (engl.: complementary RNA)
CNB	zyklische Nukleotid Bindedomäne (engl.: cyclic nucleotide binding)
CNG	Ionenkanal, der durch die Bindung von zyklischen Nukleotiden geöffnet wird (engl.: cyclic nucleotide gated)
cNMP	zyklisches Nucleosidmonophosphat
CT	C-Terminus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEVClamp	Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Technik (engl.: double electrode voltage clamp)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: acid)
dNTP	desoxy Nucleosidtriphosphate

---

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
F1/F2	BLUF-Domänen in PAC
fwd	Vorwärts (engl.: forward)
G	Guanin
GC	Guanylatzyklase (engl.: guanylyl cyclase)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin-G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaeliskonstante
LED	Leuchtdiode (engl.: light emitting diode)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
mosmol/L	Milli-Osmol pro Liter (Einheit der Osmolarität)
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger-RNA)
NMG	N-Methyl-(D)-Glucamin
n.n.	nicht nachweisbar
OLF	an der olfaktorischen Wahrnehmung beteiligter CNG-Kanal
PAC	Photoaktivierte Adenylatzyklase
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PGC	Photoaktivierte Guanylatzyklase
PKA	Proteinkinase A
PMMA	Polymethylmentaacrylat

---

PVC	Polyvinylchlorid
QM	Quadrupelmutante
rev	rückwärts (engl.: reverse)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: -acid)
RNase	Ribonuklease
s	sense (Primer)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TENS	TE-NaOH-SDS-Puffer
TM	Tripelmutante
U	Unit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp

## Nukleotidsequenzen

Die dargestellten Nukleotidsequenzen beinhalten die vollständige CDS der angegebenen Klone in 5'→3'-Richtung. Auf der 5'-Seite sind noch die zur Klonierung verwendeten Schnittstellen enthalten und auf der 3'-Seite reicht die Sequenz bis zur Poly-(A)-Sequenz. Alle aufgeführten Klone sind im Vektor pGEM-HE.

Die Nummer in Klammern hinter den Klontenamen bezieht sich auf die Position in der Klontenliste der AG-Nagel. Außerdem sind die Start- und Stopcodons jeweils eingerahmt, und die Schnittstellen, die zur Herstellung der Fusionsproteine verwendet wurden, sind unterstrichen.

### PAC $\alpha$ K250E D317K T319G S329Y (356)

```

1 TCAATTCCCC GGGGATCCAT GGCCGCGGGA TTCATGTACA TCCTTGTTTG GAAAGAAGGC CAGCAGATCA
71 GGA1CTTTCCA AGATTTGGAG GAGTGTGGGC AGTTC2CAAAC TGCATCCAAT ATAACAGATG GTCAGATATT
141 CAGTATCAAT GTCACACCCA CCATGAGCAA GGGAGGAGAA ACCGGAGAGA CGCAACTCCG GCGGCTCATG
211 TATCTCTCCG CATCAACTGA GCCAGAAAAA TGCAATGCTG AGTACCTTGC TGATATGGCG CACGTTGCAA
281 CTCTCAGGAA CAAACAAATT GGTGTCAGCG GCTTCTTGTT GTACAGTTCC CCTTTCTTTT TCCAAGTTAT
351 TGAAGGAACT GACGAAGACC TGGACTTCCT TTTTCGAAAA ATCTCTGCTG ATCCGAGACA TGAGAGATGT
421 ATTGTGCTTG CAAATGGTCC CTGTACAGGG CGCATGTATG GGGAGTGGCA CATGAAAGAC TCCCACATTG
491 ACAACATAAC GAAGCACCCA GCCATTAAGA CCATCCTCTT CCAAATTGCA AGGTCATTCT CCAGCATGTG
561 GTCCTACCTG CCAAAGAATG CGGCGAACAT GTTGCTTCTC GGAAGAACC CAAACAAGCA AGCCCCTGAA
631 CCCATGAGTG TGGTGGTCAC TTTCATCTAT CTGGTGGAGT TCTCTTCCAT TTTGGCCCAC CCTGGACTGA
701 CTGAGCAGTG TGCAGACATC CTTGCTGCGT TTGTGGACGC CTGTGTTTCG AACGTCGAAG GTACAGGGGG
771 CCAAGTGGCA GAGTTCATCA CTGGGATTTG CATGGCGTAT TGGCCAATAA ACAGGGCCGA AGATGCTCTG
841 GTCGGGTTGC AGCAACTGTC GGAGGACTTG GCCGAGCTGC GCAGCCAGCA ACCTCCTGGA TCTGCGCTGT
911 CCCTGATTTA CTCCCGGTGT GGAGTGCATT ACGGTCGAGC TTTGCTGTGC AATGCTGGTT TCCGAAAGGC
981 TAAGTTCGGC CTCCTTGGCG ACTGCATCAA CACTGCCTAT CGGATCACCT CGTTGTCCGT CAAACTCAAG
1051 GTGCCACTTC TCCTTTCTTT CGAAGTGAGG TGCCTTCTGG GTGATGAAAT GCGAGAGGAG CTTGAAAGTT
1121 CTGGGCTGCA CAAGTGAAA GGCCGTGACA AGCCTGTGCA AGTGTACCAA TTCAATGCTC CAGAGCTGGA
1191 CAGCGCGATG GTTCGTGCGA AGATTGAGCA GTTCAACCCT GGAAGGTACA GGGCATTGTG CCCAGTCAAG
1261 CCGTATGAGA GTTTGCACCC AGCTCAGAGA CCACCAATCT TTGATGACAC CCCACGAGAG AACCAGCCAA
1331 AACTCAGCCA AGTTCAGCGA CGCGACAGCC TTGTGGATCG CCTCAGCTTG ATTGCAAAGC TTGCTTTCCC
1401 TTCGAGCATG ATGGCAGGTG GTGAAGGCCA GCTCATCACA TTGACATAA TTTCCCAAGC AGCCCATCCC
1471 ATGTCCCGTT TGGATTGGC ATCAATCCAG AGGATTGCAT TTGCTCGGAA TGAATCCTCA AATATCACAG

```



1541 GCTCATTGCT TTATGTGAGC GGTTTGTGTTG TACAGACATT GGAAGGTCCC AAGGGCGCTG TGGTTTCCCT  
 1611 GTATCTCAAG ATCAGGCAAG ACAAGCGACA CAAAGATGTG GTTGCGGTCT TCATGGCCCC CATCGATGAA  
 1681 CGGGTGTATG GCAGTCCCTT GGATATGACC TCCGCCACTG AGGAAATGTT GGCCACCTTC CCACCCCTGC  
 1751 AGGACGTGCT CTCGCAGCTG GCCAAGTCGT TCATCTCCCT CGAGACCTAT GTCCCTCCA CGGTGGTGCG  
 1821 CTACCTCACC GCCGGCAACA ATCCCGCAA TCTGCAACCT GTTTCGGTGG AAGTTGTCAT GCTTGCCACT  
 1891 GACATCTGCA GCTTCACTCC ACTGTCCGAG AAGTGTTCCT TGACAGAGGT GTGGACCATT TGCAACACCT  
 1961 TCATTGACGC CTGCACCAGT GCCATCTGCA ATGAAGGTGG GGAGTCATT AAATTGATTG GTGATTGTGT  
 2031 GACAGCATAT TTCCCCCGA CAGGTGCCGA CAACGCTGTC CATGCATGCC AGGAGATCGT CAGCTTCTGT  
 2101 GCTCAGCTGC GAGATGCCTT CCACGACGTC TTGGACTGCC GGTCTGTGGT GGCTTGTGGG GTGGGGCTGG  
 2171 ACTTCGGGCA GGTTCATCATG GCCCAGTCCG GCAGTTTGGG GATGACAGAG TTTGTGGTGG CTGGGGAGGT  
 2241 CAGCGCTCGT GTGATGGAGG TTGAAGCCCT CACGCGCGAG GCAGGGCGTG CGATCGTCAT CACCGAACCA  
 2311 GTTGCGGATC GACTGTCTCC CAAACTGCGT GACACGGGCA TCGTCCCTG CCAGGAAGGA GTGGACGGCG  
 2381 TCCCTTGCTA TGGAACTCTG GGCCTGAAT GGAATTTGGA TGTGGCAACC ATCAAGAAGA ACATTTACGG  
 2451 GTTCCACGAC GCCCGGGCCC TGGCCGCCAT GAAGAAGGTG GACGACGGCA CCAACGCCCC GGGCCGGGGC  
 2521 GCCCCGCGG GGGGCATCCC CTCCTCCCC AAGTTTCGAC CACCAGGCCG CACCAATTCA GTGTCCAGCT  
 2591 ACACCCCTGA CCCCAATGAG GCACTGGATC CTCGGATGGC GGAATCGGTG TTTCTTGACA TGTGTCATCA  
 2661 GCGGGGAGAT ACCGCCAACA ACTCCATCGC CGTCAAATG CGGCAGGCGG CCAACGACGA TCGGTTGGAC  
 2731 CTGGGCAGGA TGTGCAAGG GCCACACGAG CTCATGCCTG TGATGCAGGC CATCAAGCAC CTGACCAACC  
 2801 TGCGAATGCT CAATATGAGC GACAATTTCC TGGATGACAA CAACGTTGGA GAACTTGTGG AATCGTGCAT  
 2871 TCCAATGCGT TCGTTACAGG TGTGGACTT GTCCAACAAC CCTGGCTTGA CGAAGGTCAT CGCCCTGAAG  
 2941 CGCCTCATCA AGCATAACAC CCAGGTCCGG GAGATCCTTC TGAACGGCAC CCGCATCGCC CCAACCGAGC  
 3011 AAAAGCTGAT CTCGGAGGAG GACCTGAAG GTTCGCACAA ATATGAACAT TAA|CGATACG GCGAATCACT  
 3081 AGTGCGGCCG CGTCGACAAG CTTGATCTGG TTACCACTAA ACCAGCCTCA AGAACACCCG AATGGAGTCT  
 3151 CTAAGCTACA TAATACCAAC TTACACTTTA CAAAATGTTG TCCCCAAAA TGTAGCCATT CGTATCTGCT  
 3221 CCTAATAAAA AGAAAGTTTC TTCACATTCT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAACCCCCC CCCCCCCC

## CNGA2::PAC $\alpha$ (300)

1 ATCAATTCCC CGGGGATCCA TGGCGATGAT GACCGAAAAA TCCA|ATG|GTG TGAAAAGCTC TCCAGCTAAT  
 71 AACATAACC ATCATCTCC TCCTTCTATC AAGGCCAATG GCAAAGATGA CCACAGGGCA GGAAGCAGAC  
 141 CACAGTCTGT GGCAGCTGAT GATGACACTT CTCCAGAACT ACAAAGGCTG GCAGAGATGG ATACCCCTCG  
 211 GAGGGGGAGG GGTGGCTTCC AAAGGATTGT TCGCCTGGTG GGGGTCATCA GGGACTGGGC CAACAAGAAAT  
 281 TTCCGTGAAG AGGAACCAAG GCCTGACTCC TTCCTAGAGC GTTTCGGTGG GCCAGAATC CAGACTGTGA  
 351 CAACCCATCA GGGGGATGAC AAAGGCGGCA AGGACGGCGA GGGAAAGGGC ACCAAAAAGA AATTTGAACT  
 421 GTTTGTTTTG GACCCAGCCG GAGACTGGTA TTACCGTTGG TTGTTTGTCA TTGCCATGCC TGTTCCTTAC  
 491 AACTGGTGCC TGTGGTGGC CAGAGCCTGC TTCAGTGATC TACAGAGAAA CTATTTTGTG GTATGGCTGG  
 561 TGCTGGAATA CTTCTCAGAC ACTGTCTATA TCGCAGACCT CATCATTCGG CTGCGCACAG GCTTCCTAGA  
 631 ACAGGGGCTC TTGGTCAAAG ATCCCAAGAA ATTGCGAGAC AACTATATTC AACTTTGCA GTTCAAATTG  
 701 GATGTGGCTT CTATCATTCC CACTGACCTT ATCTATTTTG CTGTGGGTAT CCACAGCCCT GAGGTACGCT  
 771 TCAACCGTCT ATTACACTTT GCCCGTATGT TTGAGTTCTT TGACCGCACT GAGACACGCA CCAGCTACCC  
 841 CAACATCTTC CGAATCAGCA ATCTGGTCCT TTACATCTTG GTCATCATCC ACTGGAATGC TTGTATTTAT  
 911 TATGTTATTT CTAAGTCCAT TGGCTTTGGA GTTGACACCT GGGTTTACCC CAACATTACT GACCCTGAAT  
 981 ATGGCTACCT GGCTAGAGAG TACATTTACT GTCTTTACTG GTCCACACTG ACCCTCACCA CCATTGGAGA  
 1051 GACACCACC CCTGTAAAGG ATGAGGAGTA CCTATTTGTC ATCTTTGACT TCTTGATTGG TGTCTCATC  
 1121 TTTGCCACTA TTGTGGGAAA TGTGGGCTCC ATGATCTCCA ACATGAATGC CACACGAGCA GAGTTCAGG  
 1191 CCAAGATTGA TGCTGTCAA CACTACATGC AGTTCGAAA GGTGAGAAA GACATGGAAG CCAAGGTCAT  
 1261 CAAATGGTTT GACTACTTGT GGACCAATAA GAAGACAGTA GATGAACGAG AAGTCTCAA GAACCTGCCA  
 1331 GCAAAGCTCA GGGCTGAGAT AGCCATTAAT GTTCACTTGT CCACTCTGAA GAAAGTGGCG ATATTCAGG  
 1401 ATTGTGAAGC TGGCCTACTG GTGGAAGTGG TACTGAAGCT TCGTCTCAG GTCTTTAGTC CTGGAGATTA

1471 TATTTGCCGT AAGGGGGACA TTGGCAAGGA AATGTACATC ATCAAGGAGG GCAAGTTGGC AGTGGTAGCT  
1541 GATGATGGCG TGA CT CAGTA TGCCTTGCTC TCAGCTGGGA GCTGCTTTGG TGAGATTAGT ATCCTTAACA  
1611 TTAAGGGTAG CAAAATGGGC AATCGACGTA CTGCTAATAT CCGTAGCCTG GGCTACTCAG ATCTCTTCTG  
1681 CTTGTCCAAG GACGATCTTA TGG AAGCTGT AACTGAGTAT CCTGATGCCA AGAAGGTCCT GGAGGAACGG  
1751 GGTAGGGAGA TCCTGATGAA GGAAGGTCTA CTGGATGAGA ATGAAGTGGC AGCTAGTATG GAGGTAGATG  
1821 TTCAGGAGAA GCTGGAACAG TTGGAGACAA ACATGGATAC CTTGTACACT CGCTTTGCCC GCCTGCTGGC  
1891 TGAGTACACT GGGGCCAGC AGAAGCTCAA GCAACGCATC ACAGTGCTAG AGACCAAGAT GAAACAGAAC  
1961 CATGAGGATG ATTATCTATC AGATGGGATA AACACTCTG AGCCAACTGC TGCTGAATTC CCATCCGCGG  
2031 GATTCATGTA CATCCTTGTT TGGAAAGAAG GCCAGCAGAT CAGGACTTTC CAAGATTTGG AGGAGTGTGG  
2101 GCAGTTCCAA ACTGCATCCA ATATAACAGA TGGTCAGATA TTCAGTATCA ATGTCACACC CACCATGAGC  
2171 AAGGGAGGAG AAACCGGAGA GACGCAACTC CGGCGGCTCA TGTATCTCTC CGCATCAACT GAGCCAGAAA  
2241 AATGCAATGC TGAGTACCTT GCTGATATGG CGCACGTTGC AACTCTCAGG AACAAACAAA TTGGTGTGAG  
2311 CGGCTTCTTG TTGTACAGTT CCCCTTTCTT TTTCCAAGTT ATTGAAGGAA CTGACGAAGA CCTGGACTTC  
2381 CTTTTCGCAA AAATCTCTGC TGATCCGAGA CATGAGAGAT GTATTGTGCT TGCAAATGGT CCCTGTACAG  
2451 GGCGCATGTA TGGGGAGTGG CACATGAAAG ACTCCCACAT TGACAACATA ACGAAGCACC CAGCCATTAA  
2521 GACCATCCTC TTCCAAATTG CAAGGTCATT CTCCAGCATG TGGTCCTACC TGCCAAAGAA TGCGGCGAAC  
2591 ATGTTGCTTC TCGGGAAGAA CCCAAACAAG CAAGCCCCTG AACCCATGAG TGTGGTGGTC ACTTTCATCT  
2661 ATCTGGTGGG GTTCTCTTCC ATTTTGGCCC ACCCTGGACT GACTGAGCAG TGTGCAGACA TCCTTGCTGC  
2731 GTTTGTGGAC GCCTGTGTTT GCAACGTCGA AGGTACAGGG GGCCAAGTGG CAAAGTTCAT CACTGGGATT  
2801 TGCATGGCGT ATTGGCCAAT AAACAGGGCC GAAGATGCTC TGGTCGGGTT GCAGCAACTG TCGGAGGACT  
2871 TGGCCGAGCT GCGCAGCCAG CAACCTCCTG GATCTGCGCT GTCCCTGATT TACTCCCGGT GTGGAGTGCA  
2941 TTACGGTCGA GCTTTGCTGT GCAATGCTGG TTTCCGAAAG GCTGATTTCA CCCTCCTTGG CGACTGCATC  
3011 AACACTGCCT CTCGGATCAC CTCGTTGTCC GTCAAACCTCA AGGTGCCACT TCTCCTTTCT TTCGAAGTGA  
3081 GGTGCCTTCT GGGTATGAA ATGCGAGAGG AGCTTGAAAG TTCTGGGCTG CACAAGGTGA AAGGCCGTGA  
3151 CAAGCCTGTG CAAGTGATACC AATCAATGC TCCAGAGCTG GACAGCGCGA TGTTTCGTGC GAAGATTGAG  
3221 CAGTTCAACC CTGGAAGGTA CAGGGCATTG TGCCCAGTCA AGCCGTATGA GAGTTTGCAC CCAGCTCAGA  
3291 GACCACCAAT CTTTGATGAC ACCCCACGAG AGAACCAGCC AAAACTCAGC CAAGTTCAGC GACGCGACAG  
3361 CCTTGTGGAT CGCCTCAGCT TGATTGCAAA GCTTGCTTTC CCTTCGAGCA TGATGGCAGG TGGTGAAGGC  
3431 CAGCTCATCA CATTGACATA CATTTCCCAA GCAGCCCATC CCATGTCCCG TTTGGATTTG GCATCAATCC  
3501 AGAGGATTGC ATTTGCTCGG AATGAATCCT CAAATATCAC AGGCTCATTG CTTTATGTGA GCGGTTTGT  
3571 TGTACAGACA TTGGAAGGTC CCAAGGGCGC TGTGGTTTCC CTGTATCTCA AGATCAGGCA AGACAAGCGA  
3641 CACAAAGATG TGGTTGCGGT CTCATGGCC CCCATCGATG AACGGGTGTA TGGCAGTCCC TTGGATATGA  
3711 CCTCCGCCAC TGAGGAAATG TTGGCCACCT TCCCACCCCT GCAGGACGTG CTCTCGCAGC TGGCCAAGTC  
3781 GTTCATCTCC CTCGAGACCT ATGTCCCCTC CACGGTGGTG CGCTACCTCA CCGCCGGCAA CAATCCCCGC  
3851 AATCTGCAAC CTGTTTCGGT GGAAGTTGTC ATGCTTGCCA CTGACATCTG CAGCTTCACT CCACTGTCCG  
3921 AGAAGTGTTC CCTGACAGAG GTGTGGACCA TTTGCAACAC CTTCATTGAC GCCTGCACCA GTGCCATCTG  
3991 CAATGAAGGT GGGGAGGTCA TTA AATTGAT TGGTGATTGT GTGACAGCAT ATTTCCCCC GACAGGTGCC  
4061 GACAACGCTG TCCATGCATG CCAGGAGATC GTCAGCTTCT GTGCTCAGCT GCGAGATGCC TTCCACGAGC  
4131 TCTTGGACTG CCGGTCTGTG GTGGCTTGTG GGGTGGGGCT GACTTCGGG CAGGTATCA TGGCCCAGTG  
4201 CGGCAGTTT GGGATGACAG AGTTTGTGGT GGCTGGGGAG GTCAGCGCTC GTGTGATGGA GGTGGAAGCC  
4271 CTCACGCGCG AGGCAGGGCG TCGATCGTC ATCACCGAAC CAGTTGCGGA TCGACTGTCT CCCAAACTGC  
4341 GTGACACGGG CATCGTCCCC TGCCAGGAAG GAGTGGACGG CGTCCCTTGC TATGGAATCC TGGGCCCTGA  
4411 ATGGGAATTG GATGTGGCAA CCATCAAGAA GAACATTTAC GGGTTCCAG ACGCCCGGGC CCTGGCCGCC  
4481 ATGAAGAAGG TGGACGACGG CACCAACGCC CCGGGCCGGG GCGCCCCGC CGGGGCATC CCCTCCTCCC  
4551 CCAAGGTTTC ACCACCAGGC CGCACCAATT CAGTGTCCAG CTACACCCT GACCCCAATG AGGCACTGGA  
4621 TCCTCGGATG GCGGAATCGG TGTTTCTTGA CATGTGTGAT CAGCGGGGAG ATACCGCAA CAACTCCATC  
4691 GCCGTCAAAT TGCGGACAGC GGCCAACGAC GATCGGTTGG ACCTGGGCAG GATGTTGCAA GGGCCACAGC  
4761 AGCTCATGCC TGTGATGCAG GCCATCAAGC ACCTGACCAA CCTGCGAATG CTCAATATGA GCGACAATTT  
4831 CGTGGATGAC AACAACGTTG GAGAACTTGT GGAATCGTGC ATTTCAATGC GTTCGTTACA GGTGTTGGAC  
4901 TTGTCCAACA ACCCTGGCTT GACGAAGGTC ATCGCCCTGA AGCGCTCAT CAAGCATAAC ACCCAGGTCC  
4971 GGGAGATCCT TCTGAACGGC ACCCGCATCG CCCCAACCGA GCAAAGCTG ATCTCGGAGG AGGACCTGAA

5041 GGGTTTCGCAC AAATATGAAC ATTAACGATA CGGCGAATCA CTAGTGCGGC CGCGTCGACA AGCTTGATCT  
 5111 GGTTACCACT AAACCAGCCT CAAGAACACC CGAATGGAGT CTCTAAGCTA CATAATACCA ACTTACACTT  
 5181 TACAAAATGT TGTCCCCAA AATGTAGCCA TTCGTATCTG CTCCTAATAA AAAGAAAGTT TCTTCACATT  
 5251 CTAAAAAATA AAAAAAATA AAAAAACCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCTGCA GGCATGCAAG

## CNGA2::Linker::PAC $\alpha$ (301)

1 CAATTCCCCG GGGATCCATG GCGATGATGA CCGAAAAATC CAATGCTGTG AAAAGCTCTC CAGCTAATAA  
 71 CCATAACCAT CATCTCCTC CTCTATCAA GGCCAATGGC AAAGATGACC ACAGGGCAGG AAGCAGACCA  
 141 CAGTCTGTGG CAGCTGATGA TGACACTTCT CCAGAACTAC AAAGCTGGC AGAGATGGAT ACCCCTCGGA  
 211 GGGGGAGGGG TGGCTTCCAA AGGATTGTTT GCCTGGTGGG GGTCATCAGG GACTGGGCCA ACAAGAATTT  
 281 CCGTGAAGAG GAACCAAGGC CTGACTCCTT CCTAGAGCGT TTCCGTGGGC CAGAACTCCA GACTGTGACA  
 351 ACCCATCAGG GGGATGACAA AGGCGGCAAG GACGGCGAGG GAAAGGGCAC CAAAAAGAAA TTTGAACTGT  
 421 TTGTTTTGGA CCCAGCCGGA GACTGGTATT ACCGTTGGTT GTTTGTCTATT GCCATGCCTG TTCTTTACAA  
 491 CTGGTGCCTG TTGGTGGCCA GAGCCTGCTT CAGTGATCTA CAGAGAAACT ATTTTGTGGT ATGGCTGGTG  
 561 CTGGACTACT TCTCAGACAC TGTCTATATC GCAGACCTCA TCATTCCGGT GCGCACAGGC TTCCTAGAAC  
 631 AGGGGCTCTT GGTCAAAGAT CCCAAGAAAT TGCGAGACAA CTATATTCAC ACTTTGCAGT TCAAATTGGA  
 701 TGTGGCTTCT ATCATTCCCA CTGACCTTAT CTATTTTGCT GTGGGTATCC ACAGCCCTGA GGTACGCTTC  
 771 AACCGTCTAT TACACTTTGC CCGTATGTTT GAGTTCCTTG ACCGCACTGA GACACGCACC AGCTACCCCA  
 841 ACATCTTCCG AATCAGCAAT CTGGTCCTTT ACATCTTGGT CATCATCCAC TGAATGCTT GTATTTATTA  
 911 TGTTATTTCT AAGTCCATTG GCTTTGGAGT TGACACCTGG GTTTACCCCA ACATTACTGA CCCTGAATAT  
 981 GGCTACCTGG CTAGAGAGTA CATTACTGT CTTTACTGGT CCACACTGAC CCTCACCACC ATTGGAGAGA  
 1051 CACCACCCC TGTAAGGAT GAGGAGTACC TATTTGTCTAT CTTTGACTTC TTGATTGGTG TCCTCATCTT  
 1121 TGCCACTATT GTGGGAAATG TGGGCTCCAT GATCTCCAAC ATGAATGCCA CACGAGCAGA GTTCCAGGCC  
 1191 AAGATTGATG CTGTCAAACA CTACATGCAG TTCCGAAAGG TCAGCAAAGA CATGGAAGCC AAGGTATCA  
 1261 AATGGTTTGA CTACTTGTGG ACCAATAAGA AGACAGTAGA TGAACGAGAA GTCCTCAAGA ACCTGCCAGC  
 1331 AAAGCTCAGG GCTGAGATAG CCATTAATGT TCACCTGTCC ACTCTGAAGA AAGTGCGCAT ATTCCAGGAT  
 1401 TGTGAAGCTG GCCTACTGGT GGAAGTGGTA CTGAAGCTTC GTCCCTCAGG CTTTAGTCCT GGAGATTATA  
 1471 TTTGCCGTAA GGGGGACATT GGCAAGGAAA TGTACATCAT CAAGGAGGGC AAGTTGGCAG TGGTAGCTGA  
 1541 TGATGGCGTG ACTCAGTATG CCTTGCTCTC AGCTGGGAGC TGCTTTGGTG AGATTAGTAT CCTTAACATT  
 1611 AAGGGTAGCA AAATGGGCAA TCGACGTACT GCTAATATCC GTAGCCTGGG CTAATCAGAT CTCTTCTGCT  
 1681 TGTCCAAGGA CGATCTTATG GAAGCTGTAA CTGAGTATCC TGATGCCAAG AAGGTCTCTG AGGAACGGGG  
 1751 TAGGGAGATC CTGATGAAGG AAGGTCTACT GGATGAGAAT GAAGTGGCAG CTAGTATGGA GGTAGATGTT  
 1821 CAGGAGAAGC TGAACAGATT GGAGACAAAC ATGGATACCT TGTACACTCG CTTTGCCCGC CTGCTGGCTG  
 1891 AGTACACTGG GGCCAGCAG AAGCTCAAGC AACGCATCAC AGTGCTAGAG ACCAAGATGA AACAGAACCA  
 1961 TGAGGATGAT TATCTATCAG ATGGGATAAA CACTCCTGAG CCAACTGCTG CTGAATTCGG TGGAGGTGCT  
 2031 GCAGGAGGTG GAGCAGCTGG AGGAGGTGCA GCTCTAGATA CCGCGGGATT CATGTACATC CTTGTTTGGGA  
 2101 AAGAAGGCCA GCAGATCAGG ACTTTCCAAG ATTTGGAGGA GTGTGGGCAG TTCCAAACTG CATCCAATAT  
 2171 AACAGATGGT CAGATATTCA GTATCAATGT CACACCCACC ATGAGCAAGG GAGGAGAAAC CGGAGAGACG  
 2241 CAACTCCGGC GGCTCATGTA TCTCTCCGCA TCAACTGAGC CAGAAAAATG CAATGCTGAG TACCTTGCTG  
 2311 ATATGGCGCA CGTTGCAACT CTCAGGAACA AACAAATTGG TGTGAGCGGC TTCTTGTTGT ACAGTCCCCC  
 2381 TTTCTTTTTT CAAGTTATTG AAGGAACTGA CGAAGACCTG GACTTCCTTT TCGCAAAAAT CTCTGCTGAT  
 2451 CCGAGACATG AGAGATGTAT TGTGCTTGCA AATGGTCCCT GTACAGGGCG CATGTATGGG GAGTGGCACA  
 2521 TGAAAGACTC CCACATTGAC AACATAACGA AGCACCAGC CATTAAAGACC ATCCTCTTCC AAATTGCAAG  
 2591 GTCATTCTCC AGCATGTGGT CCTACCTGCC AAAGAATGCG GCGAACATGT TGCTTCTCGG GAAGAACCCA  
 2661 AACAAGCAAG CCCCTGAACC CATGAGTGTG GTGGTCACTT TCATCTATCT GGTGGAGTTC TCTTCCATTT  
 2731 TGGCCACCC TGGACTGACT GAGCAGTGTG CAGACATCCT TGCTGCGTTT GTGGACGCCT GTGTTCCGAA  
 2801 CGTCAAGGT ACAGGGGGCC AAGTGGCAAA GTTCATCACT GGGATTTGCA TGGCGTATTG GCCAATAAAC  
 2871 AGGGCCGAAG ATGCTCTGGT CGGGTTGCAG CAACTGTCGG AGGACTTGGC CGAGCTGCGC AGCCAGCAAC  
 2941 CTCCTGGATC TGCCTGTGCC CTGATTTACT CCCGGTGTGG AGTGCATTAC GGTGAGCTT TGCTGTGCAA

```

3011 TGCTGGTTTC CGAAAGGCTG ATTCACCCT CTTGGCGAC TGCATCAACA CTGCCTCTCG GATCACCTCG
3081 TTGTCCGTCA AACTCAAGGT GCCACTTCTC CTTTCTTTCG AAGTGAGGTG CCTTCTGGGT GATGAAATGC
3151 GAGAGGAGCT TGAAAGTTCT GGGCTGCACA AGGTGAAAGG CCGTGACAAG CCTGTGCAAG TGTACCAATT
3221 CAATGCTCCA GAGCTGGACA GCGCGATGGT TCGTGCGAAG ATTGAGCAGT TCAACCCTGG AAGGTACAGG
3291 GCATTGTGCC CAGTCAAGCC GTATGAGAGT TTGACCCAG CTCAGAGACC ACCAATCTTT GATGACACCC
3361 CACGAGAGAA CCAGCCAAAA CTCAGCCAAG TTCAGCGACG CGACAGCCTT GTGGATCGCC TCAGCTTGAT
3431 TGCAAAGCTT GCTTTCCTT CGAGCATGAT GGCAGTGGT GAAGGCCAGC TCATCACATT GACATACATT
3501 TCCCAAGCAG CCCATCCCAT GTCCCCTTTG GATTTGGCAT CAATCCAGAG GATTGCATTT GCTCGGAATG
3571 AATCCTCAA TATCACAGG TCATTGCTTT ATGTGAGCGG TTTGTTTGT CAGACATTGG AAGGTCCCAA
3641 GGGCGCTGTG GTTTCCTGT ATCTCAAGAT CAGGCAAGAC AAGCGACACA AAGATGTGGT TGGGTCTTC
3711 ATGGCCCCCA TCGATGAACG GGTGTATGGC AGTCCCTTGG ATATGACCTC CGCCACTGAG GAAATGTTGG
3781 CCACCTTCCC ACCCTGCAG GACGTGCTCT CGCAGCTGGC CAAGTCGTTT ATCTCCCTCG AGACCTATGT
3851 CCCCTCCACG GTGGTGCCT ACCTCACCGC CGGCAACAAT CCCCCTCAAT TGCAACCTGT TTCGGTGGAA
3921 GTTGTTCATG TTGCCACTGA CATCTGCAGC TTCACTCCAC TGTCCGAGAA GTGTTCCCTG ACAGAGGTGT
3991 GGACCATTG CAACACCTT ATTGACGCT GCACCAGTGC CATCTGCAAT GAAGGTGGGG AGGTCATTAA
4061 ATTGATTGGT GATTGTGTGA CAGCATATTT CCCCCGACA GGTGCCGACA ACGCTGTCCA TGCATGCCAG
4131 GAGATCGTCA GCTTCTGTGC TCAGCTGCGA GATGCCTTCC ACGACGTCTT GGAAGTGGG TCTGTGGTGG
4201 CTTGTGGGGT GGGGTGGAC TTCGGGCAG TCATCATGGC CCAGTGGCGC AGTTTGGGGA TGACAGAGTT
4271 TGTGGTGGCT GGGGAGTCA GCGCTCGTGT GATGGAGGTT GAAGCCCTCA CGCGGAGGC AGGGCGTGG
4341 ATCGTCATCA CCGAACCAAG TGGGATCGA CTGTCTCCCA AACTGCGTGA CACGGGCATC GTCCCCTGCC
4411 AGGAAGGAGT GGACGGCGTC CCTTGCTATG GAATCCTGGG CCCTGAATGG GAATTGGATG TGGCAACCAT
4481 CAAGAAGAAC ATTTACGGT TCCACGACGC CCGGGCCCTG GCCCATGA AGAAGGTGGA CGACGGCACC
4551 AACGCCCCGG GCCGGGGCG CCCCCTGGG GGCATCCCCT CCTCCCCAA GGTTCGACCA CCAGGCCGA
4621 CCAATTCAGT GTCCAGTAC ACCCTGACC CCAATGAGG ACTGGATCCT CGGATGGCGG AATCGGTGT
4691 TCTTGACATG TGTCATCAG GGGGAGATAC CGCCAACAAC TCCATCGCG TCAAATTGCG GCAGGCGGCC
4761 AACGACGATC GGTGACCT GGGCAGGATG TTGCAAGGG CACACGAGCT CATGCCTGTG ATGCAGGCCA
4831 TCAAGCACCT GACCAACCTG CGAATGCTCA ATATGAGCGA CAATTCGTG GATGACAACA ACGTTGAGAG
4901 ACTTGTGGAA TCGTGCATTC CAATGCGTTC GTTACAGGTG TTGACTTGT CCAACAACCC TGGCTTGAGC
4971 AAGGTCATCG CCCTGAAGCG CCTCATCAAG CATAACACCC AGGTCCGGGA GATCCTTCTG AACGGCACCC
5041 GCATCGCCCC AACCGAGCAA AAGCTGATCT CGGAGGAGGA CCTGAAGGT TCGACAAAT ATGAACATTA
5111 ACGATACGGC GAATCACTAG TGGGCGCGC TCGACAAGCT TGATCTGGT ACCACTAAAC CAGCCTCAAG
5181 AACACCCGAA TGGAGTCTCT AAGCTACATA ATACCAACTT ACACTTTACA AAATGTTGTC CCCCCAAATG
5251 TAGCCATTCG TATCTGCTCC TAATAAAAAG AAAGTTTCTT CACATTCTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
5321 ACCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCTGCAGGCA TGCAAGCTAG CTTGAGTATT CTATAGTGTC

```

## PAC $\alpha$ ::CNGA2 (309)

```

1 TTCCCCGGGG ATCCATGGGCC GCGGGATTCA TGTACATCCT TGTTTGGAAA GAAGGCCAGC AGATCAGGAC
71 TTTCCAAGAT TTGGAGGAGT GTGGGCAGTT CCAAACCTGCA TCCAATATAA CAGATGGTCA GATATTCAGT
141 ATCAATGTCA CACCCACCAT GAGCAAGGGA GGAGAAACCG GAGAGACGCA ACTCCGGCGG CTCATGTATC
211 TCTCCGCATC AACTGAGCCA GAAAAATGCA ATGCTGAGTA CCTTGTGAT ATGGCGCAGC TTGCAACTCT
281 CAGGAACAAA CAAATTGGTG TCAGCGGCTT CTTGTTGTAC AGTTCCCTT TCTTTTTCCA AGTTATTGAA
351 GGAACCTGACG AAGACCTGGA CTTCTTTTC GCAAAAATCT CTGCTGATCC GAGACATGAG AGATGTATTG
421 TGCTTGCAAA TGGTCCCTGT ACAGGGCGCA TGTATGGGGA GTGGCACATG AAAGACTCCC ACATTGACAA
491 CATAACGAAG CACCCAGCCA TTAAGACCAT CCTCTTCCAA ATTGCAAGGT CATTCTCCAG CATGTGGTCC
561 TACCTGCCAA AGAATGCGGC GAACATGTTG CTTCTCGGGA AGAACCCAAA CAAGCAAGCC CCTGAACCCA
631 TGAGTGTGGT GGTCACTTTC ATCTATCTGG TGGAGTTCTC TTCCATTTG GCCCACCCTG GACTGACTGA
701 GCAGTGTGCA GACATCCTTG CTGCGTTTGT GGACGCTGT GTTCGCAACG TCGAAGGTAC AGGGGGCCAA
771 GTGGCAAAGT TCATCACTGG GATTTGCATG GCGTATTGGC CAATAAACAG GGCCGAAGAT GCTCTGGTGC

```

841 GGTTGCAGCA ACTGTGCGAG GACTTGGCCC AGCTGCGCAG CCAGCAACCT CCTGGATCTG CGCTGTCCCT  
911 GATTTACTCC CGGTGTGGAG TGCATTACGG TCGAGCTTTG CTGTGCAATG CTGGTTTCCG AAAGGCTGAT  
981 TTCACCCTCC TTGGCGACTG CATCAACACT GCCTCTCGGA TCACCTCGTT GTCCGTCAAA CTCAAGGTGC  
1051 CACTTCTCCT TTCTTTCGAA GTGAGGTGCC TTCTGGGTGA TGAAATGCGA GAGGAGCTTG AAAGTTCTGG  
1121 GCTGCACAAG GTGAAAGGCC GTGACAAGCC TGTGCAAGTG TACCAATTCA ATGCTCCAGA GCTGGACAGC  
1191 GCGATGGTTC GTGCGAAGAT TGAGCAGTTC AACCCCTGAA GGTACAGGGC ATTGTGCCCA GTCAAGCCGT  
1261 ATGAGAGTTT GCACCCAGCT CAGAGACCAC CAATCTTTGA TGACACCCCA CGAGAGAACC AGCCAAAACCT  
1331 CAGCCAAGTT CAGCGACGCG ACAGCCTTGT GGATCGCCTC AGCTTGATTG CAAAGCTTGC TTTCCCTTCG  
1401 AGCATGATGG CAGGTGGTGA AGGCCAGCTC ATCACATTGA CATACATTTT CCAAGCAGCC CATCCCATGT  
1471 CCCGTTTGGG TTTGGCATCA ATCCAGAGGA TTGCATTTGC TCGGAATGAA TCCTCAAATA TCACAGGCTC  
1541 ATTGCTTTAT GTGAGCGGTT TGTTTGTACA GACATTGGAA GGTTCCCAAG GCGCTGTGGT TTCCCTGTAT  
1611 CTCAAGATCA GGCAAGACAA GCGACACAAA GATGTGGTTG CGGTCTTCAT GGCCCCATC GATGAACGGG  
1681 TGTATGGCAG TCCCTTGGAT ATGACCTCCG CCACTGAGGA AATGTTGGCC ACCTTCCCAC CCCTGCAGGA  
1751 CGTGCTCTCG CAGCTGGCCA AGTCGTTTCT CTCCCTCGAG ACCTATGTCC CCTCCACGGT GGTGCGCTAC  
1821 CTCACCGCCG GCAACAATCC CCGCAATCTG CAACCTGTTT CGGTGGAAGT TGTATGCTT GCCACTGACA  
1891 TCTGCAGCTT CACTCCACTG TCCGAGAAGT GTTCCCTGAC AGAGGTGTGG ACCATTTGCA ACACCTTCAT  
1961 TGACGCCTGC ACCAGTGCCA TCTGCAATGA AGGTGGGGAG GTCATTAAT TGATTGGTGA TTGTGTGACA  
2031 GCATATTTCC CCCCACAGG TGCCGACAAC GCTGTCCATG CATGCCAGGA GATCGTCAGC TTCTGTGCTC  
2101 AGCTGCGAGA TGCCTTCCAC GACGTCTTGG ACTGCCGGTC TGTGGTGGCT TGTGGGGTGG GGCTGGACTT  
2171 CGGGCAGGTC ATCATGGCCC AGTGCGGCAG TTTGGGGATG ACAGAGTTTG TGGTGGCTGG GGAGTTCAGC  
2241 GCTCGTGTGA TGGAGTTGA AGCCCTCACG CGCGAGGCAG GCGGTGCGAT CGTCATCACC GAACCAGTTG  
2311 CGGATCGACT GTCTCCAAA CTGCGTGACA CGGGCATCGT CCCCTGCCAG GAAGGAGTGG ACGGCGTCCC  
2381 TTGCTATGGA ATCCTGGGCC CTGAATGGGA ATTGGATGTG GCAACCATCA AGAAGAACAT TTACGGGTTT  
2451 CACGACGCC CCGCCCTGGC CGCCATGAAG AAGGTGGACG ACGGCACCAA CGCCCCGGGC CGGGGCGCCC  
2521 CCGCCGGGG CATCCCTCC TCCCCAAGG TTCGACCACC AGGCCGCACC AATTCAGTGT CCAGCTACAC  
2591 CCCTGACCCC AATGAGGCAC TGGATCCTCG GATGGCGGAA TCGGTGTTTCT TTGACATGTG TCATCAGCGG  
2661 GGAGATACCG CCAACAACCT CATCGCCGTC AAATTGCGGC AGGCGGCCAA CGACGATCGG TTGGACCTGG  
2731 GCAGGATGTT GCAAGGGCCA CACGAGCTCA TGCCTGTGAT GCAGGCCATC AAGCACCTGA CCAACCTGCG  
2801 AATGCTCAAT ATGAGCGACA ATTCGTGGA TGACAACAAC GTTGGAGAAC TTGTGGAATC GTGCATTCCA  
2871 ATGCGTTCTG TACAGGTGTT GGACTTGTCC AACAACCCTG GCTTGACGAA GGTTCATCGC CTGAAGCGCC  
2941 TCATCAAGCA TAACACCCAG GTCCGGGAGA TCCTTCTGAA CGGCACCCGC ATCGCCCCAA CCGAGCAAAA  
3011 GCTGATCTCG GAGGAGGACC TGAAGGGTTC GCACAAATAT GAACATGAAT TCACATGGAT GATGACCGAA  
3081 AAATCCAATG GTGTGAAAAG CTCTCCAGCT AATAACCATA ACCATCATCC TCCTCCTTCT ATCAAGGCCA  
3151 ATGGCAAAGA TGACCACAGG GCAGGAAGCA GACCACAGTC TGTGGCAGCT GATGATGACA CTTCTCCAGA  
3221 ACTACAAAGG CTGGCAGAGA TGGATACCCC TCGGAGGGGG AGGGTGGCT TCAAAGGAT TGTTCCGCTG  
3291 GTGGGGGTCA TCAGGACTG GGCCAACAAG AATTTCCGTG AAGAGGAACC AAGGCCTGAC TCCTTCTAG  
3361 AGCGTTTCCG TGGGCCAGAA CTCCAGACTG TGACAACCCA TCAGGGGGAT GACAAAGGCG GCAAGGACGG  
3431 CGAGGGAAAAG GGCACCAAAA AGAAATTTGA ACTGTTTGTG TTGGACCCAG CCGGAGACTG GTATTACCGT  
3501 TGGTTGTTG TCATTGCCAT GCCTGTTCTT TACAACCTGG GCCTGTTGGT GGCCAGAGCC TGCTTACAGT  
3571 ATCTACAGAG AAACATTTT GTGGTATGGC TGGTGCTGGA CTACTTCTCA GACTGTCT ATATCGCAGA  
3641 CCTCATCATT CGGCTGCGCA CAGGCTTCCCT AGAACAGGG CTCTTGGTCA AAGATCCCAA GAAATTGCGA  
3711 GACAACATA TTCACACTTT GCAGTTCAAA TTGGATGTGG CTTCTATCAT TCCCACTGAC CTTATCTATT  
3781 TTGCTGTGGG TATCCACAGC CCTGAGGTAC GCTTCAACCG TCTATTACAC TTTGCCCGTA TGTTTGGATT  
3851 CTTTGACCGC ACTGAGACAC GCACCAGCTA CCCCACATC TTCCGAATCA GCAATCTGGT CCTTTACATC  
3921 TTGGTCATCA TCCACTGGAA TGCTTGTATT TATTATGTTA TTTCTAAGTC CATTGGCTTT GGAGTTGACA  
3991 CCTGGGTTTA CCCCACATT ACTGACCCTG AATATGGCTA CCTGGCTAGA GAGTACATTT ACTGTCTTTA  
4061 CTGGTCCACA CTGACCCTCA CCACCATTGG AGAGACACCA CCCCCTGTAA AGGATGAGGA GTACCTATTT  
4131 GTCATCTTTG ACTTCTTGAT TGGTGTCCCT ATCTTTGCCA CTATTGTGGG AAATGTGGGC TCCATGATCT  
4201 CCAACATGAA TGCCACACGA GCAGAGTTCC AGGCCAAGAT TGATGCTGTC AAACACTACA TGCAGTTCCG  
4271 AAAGTTCAGC AAAGACATGG AAGCCAAGGT CATCAAATGG TTTGACTACT TGTGGACCAA TAAGAAGACA  
4341 GTAGATGAAC GAGAAGTCTT CAAGAACCTG CCAGCAAAGC TCAGGGCTGA GATAGCCATT AATGTTCACT

4411 TGTCCACTCT GAAGAAAGTG CGCATATTCC AGGATTGTGA AGCTGGCCTA CTGGTGGAAC TGGTACTGAA  
 4481 GCTTCGTCCT CAGGTCTTTA GTCCTGGAGA TTATATTTGC CGTAAGGGGG ACATTGGCAA GGAAATGTAC  
 4551 ATCATCAAGG AGGGCAAGTT GGCAGTGGTA GCTGATGATG GCGTGACTION GTATGCCTTG CTCTCAGCTG  
 4621 GGAGCTGCTT TGGTGAGATT AGTATCCTTA ACATTAAGGG TAGCAAAATG GGCAATCGAC GTACTGCTAA  
 4691 TATCCGTAGC CTGGGCTACT CAGATCTCTT CTGCTTGTCC AAGGACGATC TTATGGAAGC TGTAAGTGAAG  
 4761 TATCCTGATG CCAAGAAGGT CCTGGAGGAA CGGGGTAGGG AGATCCTGAT GAAGGAAGGT CTACTGGATG  
 4831 AGAATGAAGT GGCAGCTAGT ATGGAGGTAG ATGTTCCAGGA GAAGCTGGAA CAGTTGGAGA CAAACATGGA  
 4901 TACCTTGTAC ACTCGCTTTG CCCGCCTGCT GGCTGAGTAC ACTGGGGCCC AGCAGAAGCT CAAGCAACGC  
 4971 ATCACAGTGC TAGAGACCAA GATGAAACAG AACCATGAGG ATGATTATCT ATCAGATGGG ATAAACTCTC  
 5041 CTGAGCCAAC TGCTGCTGAA TAACCATAAG TGACTATCCA GCCTTGGTCT GACTCCAGGG CGGCCGCGTC  
 5111 GACAAGCTTG ATCTGGTTAC CACTAAACCA GCCTCAAGAA CACCCGAATG GAGTCTCTAA GCTACATAAT  
 5181 ACCAACTTAC ACTTTACAAA ATGTTGTCCC CCAAAATGTA GCCATTCGTA TCTGCTCCTA ATAAAAAGAA  
 5251 AGTTTCTTCA CATTCTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC

### PAC $\alpha$ GCY35 C1 GCY35 C2 (327)

1 AGATCAATTC CCCGGGGATC CATGGCCGCG GGATTCATGT ACATCCTTGT TTGGAAGAA GGCCAGCAGA  
 71 TCAGGACTTT CCAAGATTTG GAGGAGTGTG GGCAGTCCA AACTGCATCC AATATAACAG ATGGTCAGAT  
 141 ATTCAAGTATC AATGTCACAC CCACCATGAG CAAGGGAGGA GAAACCGGAG AGACGCAACT CCGGCGGCTC  
 211 ATGTATCTCT CCGCATCAAC TGAGCCAGAA AAATGCAATG CTGAGTACCT TGCTGATATG GCGCAGCTTG  
 281 CAACTCTCAG GAACAAACAA ATTGGTGTCA GCGGCTTCTT GTTGTACAGT TCCCCTTTCT TTTTCCAAGT  
 351 TATTGAAGGA ACTGACGAAG ACCTGGACTT CTTTTTCGCA AAAATCTCTG CTGATCCGAG ACATGAGAGA  
 421 TGTATTGTGC TTGCAAAATG TCCCTGTACA GGGCGCATGT ATGGGGAGTG GCACATGAAA GACTCCCACA  
 491 TTGACAACAT AACGAAGCAC CCAGCCATTA AGACCATCCT CTCCAAATT GCAAGGTCAT TCTCCAGCAT  
 561 GTGGTCCTAC CTGCCAAAGA ATGCGGCGAA CATGTTGCTT CTCGGGAAGA ACCCAAACAA GCAAGCCCTC  
 631 GAACCCATGA GTGTGGAGCT GCTCTGTGAG CTCATGCCAG CCTCCGTTGC CGATAGTTTG AGAAGCGGGA  
 701 AGGCAATGGA TGCAAAAGAG TTCGCGGATT GCACATTGCT CTTCACCGAC ATCGTAACAT TCACCAATAT  
 771 CTGTGCAATG TGTACCCCGT ATGACGTTGT TACCCTGCTC AATGACCTTT ATCTTCGTTT TGACAGACTT  
 841 GTCGGATTGC ATGACGCGTA CAAAGTTGAG ACAATCGGTG ATGCCTATAT GATTGTGGGC GGAGTCCCGG  
 911 AGCGTTGTGA GAATCATGCA GAGCGAGTTC TCAATATTTT AATCGGAATG CTCATGGAAT CCAAGCTTGT  
 981 TTTGTCTCCA ATCACCATA AACCTATTAA AATTTCGTTT GGCGTTCACT GTGGTCCCCT TGTAGCTGGA  
 1051 GTTGTCCGGA TTAAGATGCC AAGGACTACT CTCTTCGGTG AACTGTGTTA CGTGGCGAAC AAAATGGAAT  
 1121 CCAACGGTAT TCAATGCAAA ATTCACGTCA GCGAATTCAA TGCTCCAGAG CTGGACAGCG CGATGGTTCCG  
 1191 TGCGAAGATT GAGCAGTTCA ACCCTGGAAG GTACAGGGCA TTGTGCCAG TCAAGCCGTA TGAGAGTTTG  
 1261 CACCCAGCTC AGAGACCACC AATCTTTGAT GACACCCAC GAGAGAACCA GCCAAAACCTC AGCCAAGTTC  
 1331 AGCGACGCGA CAGCCTTGTG GATCGCCTCA GCTTGATTGC AAAGCTTGCT TTCCTTTCGA GCATGATGGC  
 1401 AGGTGGTGAA GGCCAGCTCA TCACATTGAC ATACATTTCC CAAGCAGCCC ATCCCATGTC CCGTTTGGAT  
 1471 TTGGCATCAA TCCAGAGGAT TGCATTGCTC CGGAATGAAT CCTCAAATAT CACAGGCTCA TTGCTTTATG  
 1541 TGAGCGGTTT GTTTGTACAG ACATTGGAAG GTCCCAAGGG CGCTGTGGTT TCCCTGTATC TCAAGATCAG  
 1611 GCAAGACAAG CGACACAAAG ATGTGGTTGC GGTCTTCATG GCCCCATCG ATGAACGGGT GTATGGCAGT  
 1681 CCCTTGATA TGACCTCCGC CACTGAGGAA ATGTTGGCCA CCTTCCCACC CCTGCAGGAC GTGCTCTCGC  
 1751 AGCTGGCCAA GTCGTTTCATC TCCCTCGAGA AGCCCATGAG TGTGGAGCTG CTCTGTGAGC TCATGCCAGC  
 1821 CTCCGTTGCC GATAGTTTGA GAAGCGGGAA GGCAATGGAT GCAAAAAGAG TCGCGGATTG CACATTGCTC  
 1891 TTCACCGACA TCGTAAACATT CACCAATATC TGTGCAATGT GTACCCCGTA TGACGTTGTT ACCCTGCTCA  
 1961 ATGACCTTTA TCTTCGTTTT GACAGACTTG TCGGATTGCA TGACGCGTAC AAAGTTGAGA CAATCGGTGA  
 2031 TGCCTATATG ATTGTGGGCG GAGTTCGCGA GCGTTGTGAG AATCATGCAG AGCGAGTTCT CAATATTTCA  
 2101 ATCGGAATGC TCATGGAATC CAAGCTTGTT TTGTCTCCAA TCACCCATAA ACCTATTTAA ATTTCGTTGG  
 2171 GCGTTCACTG TGGTCCCCTT GTAGCTGGAG TTGTCCGGAT TAAGATGCCA AGGACTGTCT TCTTCGGTGA  
 2241 CACTGTTAAC GTGGCGAACA AAATGGAATC CAACGGTATT CAATGCAAAA TTCACGTCTC CGAATTTCCC  
 2311 AAAGTCCGTT ACACGGGCAT CGTCCCCTGC CAGGAAGGAG TGGACGGCGT CCCTTGCTAT GGAATCTCTG

2381 GCCCTGAATG GGAATTGGAT GTGGCAACCA TCAAGAAGAA CATTACGGG TTCCACGACG CCCGGGCCCT  
 2451 GGCCGCCATG AAGAAGGTGG ACGACGGCAC CAACGCCCCG GGCCGGGGCG CCCC GCCG GGGCATCCCC  
 2521 TCCTCCCCCA AGGTTGAC ACCAGGCCG ACCAATTCAG TGTCCAGTA CACCCTGAC CCAATGAGG  
 2591 CACTGGATCC TCGGATGGCG GAATCGGTGT TTCTTGACAT GTGTCATCAG CGGGGAGATA CCGCCAACAA  
 2661 CTCCATCGCC GTCAAATTGC GGCAGGCCG CAACGACGAT CGGTGGACC TGGGCAGGAT GTTGCAAGGG  
 2731 CCACACGAGC TCATGCCTGT GATGCAGGCC ATCAAGCACC TGACCAACCT GCGAATGCTC AATATGAGCG  
 2801 ACAATTTCTG GGATGACAAC AACGTTGGAG AACTTGTGGA ATCGTGCATT CCAATGCGTT CGTTACAGGT  
 2871 GTTGGACTTG TCCAACAACC CTGGCTTGAC GAAGGTCATC GCCCTGAAGC GCCTCATCAA GCATAACACC  
 2941 CAGGTCCGGG AGATCCTTCT GAACGGCACC CGCATCGCCC CAACCGAGCA AAAGCTGATC TCGGAGGAGG  
 3011 ACCTGAAGGG TTCGCACAAA TATGAACATT AACGATACGG CGAATCACTA GTGCGGCCG GTCGACAAGC  
 3081 TTGATCTGGT TACCACTAAA CCAGCCTCAA GAACACCCGA ATGGAGTCTC TAAGCTACAT AATACCAACT  
 3151 TACACTTTAC AAAATGTTGT CCCCCAAAAT GTAGCCATTC GTATCTGCTC CTAATAAAAA GAAAGTTTCT  
 3221 TCACATTCTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACCCCCCCC CCCCCCCC CCCCCCCC CCCTGCAGGC

### PAC $\alpha$ GCY35 C1 GCY36 C2 (335)

1 ATTCCCCGGG GATCCATGGC CGCGGGATTC ATGTACATCC TTGTTTGAA AGAAGGCCAG CAGATCAGGA  
 71 CTTTCCAAGA TTTGGAGGAG TGTGGGCAGT TCCAAACTGC ATCCAATATA ACAGATGGTC AGATATTCAG  
 141 TATCAATGTC ACACCCACCA TGAGCAAGGG AGGAGAAACC GGAGAGACGC AACTCCGGCG GCTCATGTAT  
 211 CTCTCCGCAT CAACTGAGCC AGAAAAATGC AATGCTGAGT ACCTTGCTGA TATGGCGCAC GTTGCAACTC  
 281 TCAGGAACAA ACAAATTGGT GTCAGCGGCT TCTTGTGTA CAGTTCCCCT TTCTTTTCC AAGTTATTGA  
 351 AGGAAGTAC GAAGACCTGG ACTTCCTTTT CGCAAAAATC TCTGCTGATC CGAGACATGA GAGATGTATT  
 421 GTGCTTGCAA ATGGTCCCTG TACAGGGCGC ATGTATGGGG AGTGGCACAT GAAAGACTCC CACATTGACA  
 491 ACATAACGAA GCACCCAGCC ATTAAGACCA TCCTCTTCCA AATTGCAAGG TCATTCTCCA GCATGTGGTC  
 561 CTACCTGCCA AAGAATGCGG CGAACATGTT GCTTCTCGGG AAGAACCCAA ACAAGCAAGC CCCTGAACCC  
 631 ATGAGTGTGG AGCTGCTCTG TGAGCTCATG CCAGCCTCCG TTGCCGATAG TTTGAGAAGC GGAAGGCAA  
 701 TGGATGCAAA AGAGTTCGCG GATTGCACAT TGCTCTTAC CGACATCGTA ACATTACCA ATATCTGTGC  
 771 AATGTGTACC CCGTATGACG TTGTTACCCT GCTCAATGAC CTTTATCTTC GTTTTGACAG ACTTGTCCGA  
 841 TTGCATGACG CGTACAAAGT TGAGACAATC GGTGATGCCT ATATGATTGT GGGCGGAGTT CCGGAGCGTT  
 911 GTGAGAAATCA TGCAGAGCGA GTTCTCAATA TTTCAATCGG AATGCTCATG GAATCCAAGC TTGTTTTGTC  
 981 TCCAATCACC CATAAACCTA TAAAAATTCG TTTGGGCGTT CACTGTGGTC CCGTTGTAGC TGGAGTTGTC  
 1051 GGGATTAAGA TGCCAAGGTA CTGTCTTTC GGTGACACTG TTAACGTGGC GAACAAAATG GAATCCAACG  
 1121 GTATTCAATG CAAAATTCAC GTCAGCGAAT TCAATGCTCC AGAGCTGGAC AGCGGATGG TTCGTGCCAA  
 1191 GATTGAGCAG TTCAACCCTG GAAGGTACAG GGCATTGTGC CCAGTCAAGC CGTATGAGAG TTTGCACCCA  
 1261 GCTCAGAGAC CACCAATCTT TGATGACACC CCACGAGAGA ACCAGCCAAA ACTCAGCCAA GTTCAGCGAC  
 1331 GCGACAGCCT TGTGGATCGC CTCAGCTTGA TTGCAAAGCT TGCTTCCCT TCGAGCATGA TGGCAGGTGG  
 1401 TGAAGGCCAG CTCATCACAT TGACATACAT TTCCCAAGCA GCCCATCCCA TGTCCTGTT GGATTTGGCA  
 1471 TCAATCCAGA GGATTGCATT TGCTCGGAAT GAATCCTCAA ATATCACAGG CTCATTGCTT TATGTGAGCG  
 1541 GTTTGTTTGT ACAGACATTG GAAGGTCCCA AGGGCGCTGT GGTTCCTCTG TATCTCAAGA TCAGGCAAGA  
 1611 CAAGCGACAC AAAGATGTGG TTGCGGTCTT CATGGCCCCC ATCGATGAAC GGGTGTATGG CAGTCCCTTG  
 1681 GATATGACCT CCGCCACTGA GGAAATGTTG GCCACCTCC CACCCTGCA GGACGTGCTC TCGCAGCTGG  
 1751 CCAAGTCGTT CATCTCCCTC GAGAAGGCCA TGAGTGTGGC TTTGCTCCGA GAAATGCTAC CACCATCGGT  
 1821 TGCTCAGCAA TTGAAGCAAG GGTTAAGCGT TGAAGCGCGA GAATACGAAG AAGCCACAGT GATGTTCACT  
 1891 GATGTTCCCA CCTTCCAACA GATTGTTCCA CTTTGTACAC CCAAGGATAT TGTTCAATTTG CTCAATGAGC  
 1961 TATTCACCAA ATTTGATCGG TTGATTGGAA TCCAAAAAGC ATATAAAGTG GAAACAGTTG GTGACAGTTA  
 2031 CATGTCAGTC GGAGGGATTC CTGACTTGGT GGATGATCAT TGTGAAGTGA TCTGCCATTT GGCCCTCGGA  
 2101 ATGGTCATGG AAGCTCGGAC CGTTTGTGAT CCCATAACCA ACACCCTCT TCATATTCGT GCAGGAATAC  
 2171 ATTCGGGGCC AGTTGTAGCA GGTGTTGTTG GCGCGAAAAT GCCGAGATAC TGCTTGTTCG GTGATACAGT  
 2241 GAATACTTCC TCCAGAATGG AGAGTCATAG TCCAATTGGA CGTATTCATT GTTCGGAATT CCCCCAACTG  
 2311 CGTGACACGG GCATCGTCCC CTGCCAGGAA GGAGTGGACG GCGTCCCTTG CTATGGAATC CTGGGCCCTG

2381 AATGGGAATT GGATGTGGCA ACCATCAAGA AGAACATTTA CGGGTTCCAC GACGCCCGGG CCCTGGCCGC  
 2451 CATGAAGAAG GTGGACGACG GCACCAACGC CCCGGGCCCG GCGGCCCCCG CCGGGGGCAT CCCCTCCTCC  
 2521 CCAAGGTTTC GACCACCAGG CCGCACCAAT TCAGTGTCCA GCTACACCCC TGACCCCAAT GAGGCACTGG  
 2591 ATCCTCGGAT GCGGGAATCG GTGTTTCTTG ACATGTGTCA TCAGCGGGGA GATACCGCCA ACAACTCCAT  
 2661 CGCCGTCAAA TTGCGGCAGG CGGCCAACGA CGATCGGTTG GACCTGGGCA GGATGTTGCA AGGGCCACAC  
 2731 GAGCTCATGC CTGTGATGCA GGCCATCAAG CACCTGACCA ACCTGCGAAT GCTCAATATG AGCGACAATT  
 2801 TCGTGGATGA CAACAACGTT GGAGAACTTG TGGAATCGTG CATTCCAATG CGTTCGTTAC AGGTGTTGGA  
 2871 CTTGTCCAAC AACCTGGCT TGACGAAGGT CATCGCCCTG AAGCGCCTCA TCAAGCATAA CACCCAGGTC  
 2941 CGGGAGATCC TTCTGAACGG CACCCGCATC GCCCAACCG AGCAAAAGCT GATCTCGGAG GAGGACCTGA  
 3011 AGGGTTCGCA CAAATATGAA CATTAACGAT ACGGCGAATC ACTAGTGGG CCGCGTCGAC AAGCTTGATC  
 3081 TGGTTACCAC TAAACCAGCC TCAAGAACAC CCGAATGGAG TCTCTAAGCT ACATAATACC AACTTACTACT  
 3151 TTACAAAATG TTGTCCCCCA AAATGTAGCC ATTCGTATCT GCTCCTAATA AAAAGAAAGT TTCTTCACAT  
 3221 TCTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAACCCC CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC CCCCCCTGC AGGCATGCAA

### PAC $\alpha$ GCY36 C1 GCY35 C2 (334)

1 TCAATCCCC GGGGATCCAT GGCCGCGGGA TTCATGTACA TCCTTGTTTG GAAAGAAGGC CAGCAGATCA  
 71 GGAATTTCCA AGATTGGAG GAGTGTGGGC AGTTCCAAAC TGCATCCAAT ATAACAGATG GTCAGATATT  
 141 CAGTATCAAT GTCACACCCA CCATGAGCAA GGGAGGAGAA ACCGGAGAGA CGCAACTCCG GCGGCTCATG  
 211 TATCTCTCCG CATCAACTGA GCCAGAAAAA TGCAATGCTG AGTACCTTGC TGATATGGCG CACGTTGCAA  
 281 CTCTCAGGAA CAAACAAATT GGTGTCAGCG GCTTCTTGTT GTACAGTTCC CCTTTCTTTT TCCAAGTTAT  
 351 TGAAGGAACT GACGAAGACC TGGACTTCCT TTTCGCAAAA ATCTCTGCTG ATCCGAGACA TGAGAGATGT  
 421 ATTGTGCTTG CAAATGGTCC CTGTACAGGG CGCATGTATG GGGAGTGGCA CATGAAAGAC TCCCACATTG  
 491 ACAACATAAC GAAGCACCCA GCCATTAAGA CCATCCTCTT CCAAATTGCA AGGTCATTCT CCAGCATGTG  
 561 GTCCTACCTG CCAAAGAATG CGGCGAACAT GTTGCTTCTC GGAAGAACC CAAACAAGCA AGCCCCTGAA  
 631 CCCATGAGTG TGGCTTTGCT CCGAGAAATG CTACCACCAT CGGTTGCTCA GCAATTGAAG CAAGGGTTAA  
 701 GCGTTGAAGC GCGAGAATAC GAAGAAGCCA CAGTGATGTT CACTGATGTT CCCACCTTCC AACAGATTGT  
 771 TCCACTTTGT ACACCCAAGG ATATTGTTCA TTTGCTCAAT GAGCTATTCA CCAAATTTGA TCGGTTGATT  
 841 GGAATCCAAA AAGCATATAA AGTGGAACA GTTGGTGACA GTTACATGTC AGTCGGAGGG ATTCCTGACT  
 911 TGGTGGATGA TCATTGTGAA GTGATCTGCC ATTTGGCCCT CGGAATGGTC ATGGAAGCTC GGACCGTTTG  
 981 TGATCCCATATA ACCAACACCC CTCTTCATAT TCGTGCAGGA ATACATTCGG GGCCAGTTGT AGCAGGTGTT  
 1051 GTTGGCGCGA AAATGCCGAG ATACTGCTTG TTCGGTGATA CAGTGAATAC TTCCTCCAGA ATGGAGAGTC  
 1121 ATAGTCCAAT TGGACGTATT CATTGTTCGG AATTCAATGC TCCAGAGCTG GACAGCGCGA TGTTTCGTGC  
 1191 GAAGATTGAG CAGTTCAACC CTGGAAGGTA CAGGGCATTG TGCCCAGTCA AGCCGTATGA GAGTTTGAC  
 1261 CCAGCTCAGA GACCACCAAT CTTTGATGAC ACCCCACGAG AGAACAGCC AAAACTCAGC CAAGTTCAGC  
 1331 GACGCGACAG CCTTGTTGGAT CGCCTCAGCT TGATTGCAAAA GCTTGCTTTC CCTTCGAGCA TGATGGCAGG  
 1401 TGGTGAAGGC CAGCTCATCA CATTGACATA CATTTCCTCAA GCAGCCATC CCATGTCCCG TTTGGATTTG  
 1471 GCATCAATCC AGAGGATTGC ATTTGCTCGG AATGAATCCT CAAATATCAC AGGCTCATTG CTTTATGTGA  
 1541 GCGGTTTGTG TGTACAGACA TTGGAAGGTC CCAAGGGCGC TGTGGTTTCC CTGTATCTCA AGATCAGGCA  
 1611 AGACAAGCGA CACAAAGATG TGGTTGCGGT CTTTCATGGCC CCCATCGATG AACGGGTGTA TGGCAGTCCC  
 1681 TTGGATATGA CCTCCGCCAC TGAGGAAATG TTGGCCACCT TCCCACCCCT GCAGGACGTG CTCTCGCAGC  
 1751 TGGCCAAGTC GTTCATCTCC CTCGAGAAGC CCATGAGTGT GGAGCTGCTC TGTGAGCTCA TGCCAGCCTC  
 1821 CGTTGCCGAT AGTTTGAGAA GCGGGAAGGC AATGGATGCA AAAGAGTTCG CGGATTGCAC ATTGCTCTTC  
 1891 ACCGACATCG TAACATTCAC CAATATCTGT GCAATGTGTA CCCCCTATGA CGTTGTTACC CTGCTCAATG  
 1961 ACCTTTATCT TCGTTTTGAC AGACTTGTGC GATTGCATGA CGCGTACAAA GTTGAGACAA TCGGTGATGC  
 2031 CTATATGATT GTGGGCGGAG TTCCGGAGCG TTGTGAGAAT CATGCAGAGC GAGTTCTCAA TATTTCAATC  
 2101 GGAATGCTCA TGGAATCCAA GCTTGTTTTG TCTCCAATCA CCCATAAACC TATTTAAATC CGTTTGGGCG  
 2171 TTCACTGTGG TCCCCTGTGA GCTGGAGTTG TCGGGATTAA GATGCCAAGG TACTGTCTCT TCGGTGACAC  
 2241 TGTTAACGTG GCGAACAAAA TGGAAATCCAA CGGTATTCAA TGCAAAATTC ACGTCAGCGA ATTCCCCAAA  
 2311 CTGCGTGACA CGGGCATCGT CCCCTGCCAG GAAGGAGTGG ACGGCGTCCC TTGCTATGGA ATCCTGGGCC



2381 CTGAATGGGA ATTGGATGTG GCAACCATCA AGAAGAACAT TTACGGGTTC CACGACGCCC GGGCCCTGGC  
2451 CGCCATGAAG AAGGTGGACG ACGGCACCAA CGCCCCGGGC CGGGGCGCCC CCGCCGGGGG CATCCCCTCC  
2521 TCCCCAAGG TTCGACCACC AGGCCGCACC AATTCAGTGT CCAGCTACAC CCCTGACCCC AATGAGGCAC  
2591 TGGATCCTCG GATGGCGGAA TCGGTGTTTC TTGACATGTG TCATCAGCGG GGAGATACCG CCAACAACCTC  
2661 CATCGCCGTC AAATTGCGGC AGGCGGCCAA CGACGATCGG TTGGACCTGG GCAGGATGTT GCAAGGGCCA  
2731 CACGAGCTCA TGCCTGTGAT GCAGGCCATC AAGCACCTGA CCAACCTGCG AATGCTCAAT ATGAGCGACA  
2801 ATTTCTGGGA TGACAACAAC GTTGGAGAAC TTGTGGAATC GTGCATTCCA ATGCGTTCGT TACAGGTGTT  
2871 GGAATTGTCC AACAACCCTG GCTTGACGAA GGTTCATCGCC CTGAAGCGCC TCATCAAGCA TAACACCAG  
2941 GTCCGGGAGA TCCTTCTGAA CGGCACCCGC ATCGCCCCAA CCGAGCAAAA GCTGATCTCG GAGGAGGACC  
3011 TGAAGGGTTC GCACAAATAT GAACATTAAC GATACGGCGA ATCACTAGTG CGGCCGCGTC GACAAGCTTG  
3081 ATCTGGTTAC CACTAAACCA GCCTCAAGAA CACCCGAATG GAGTCTCTAA GCTACATAAT ACCAACTTAC  
3151 ACTTTACAAA ATGTTGTCCC CCAAAAATGTA GCCATTGTA TCTGCTCTA ATAAAAAGAA AGTTTCTTCA  
3221 CATTCTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC TGCAGGCATG

## Publikationen:

SCHRÖDER-LANG, S., SCHWÄRZEL, M., SEIFERT, R., STRÜNKER, T., KATERIYA, S., **LOOSER, J.**, WATANABE, M., KAUPP, U., HEGEMANN, P. & NAGEL, G. (2007). Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo. *Nat Methods* **4**(1), 39–42.

**LOOSER, J.**, SCHRÖDER-LANG, S., HEGEMANN, P. & NAGEL, G. (2009). Mechanistic insights in light-induced cAMP production by photoactivated adenylyl cyclase alpha (PAC $\alpha$ ). *Biol Chem* **390**(11), 1105–1111.

**LOOSER, J.** & NAGEL, G. (2009). Characterization and application of natural light-sensitive proteins. In: *Systems Biology - The Challenge of Complexity*. pp. 47–56.

## Posterpräsentationen:

**LOOSER J.**, SCHRÖDER-LANG S. & NAGEL G. Functional expression and characterization of a light-activated adenylyl cyclase from *E. gracilis*.

Botanikertagung

September 2007, Hamburg

**LOOSER J.**, SCHRÖDER-LANG S. , HEGEMANN P. & NAGEL G. Functional analysis of Photoactivated Adenylyl Cyclase alpha (PAC $\alpha$ ) from *Euglena gracilis*.

Gordon Research Conference “Photosensory Receptors & Signal Transduction”

Januar 2008, Ventura, CA

**LOOSER J.**, SCHRÖDER-LANG S. , HEGEMANN P. & NAGEL G. Functional analysis of Photoactivated Adenylyl Cyclase alpha (PAC $\alpha$ ) from *Euglena gracilis*.

Minisymposium “Channelrhodopsin and light-gated enzymes”

Mai 2008, Frauenchiemsee

## Vorträge:

**LOOSER J.** & NAGEL G. Functional analysis of Photoactivated Adenylyl Cyclase alpha (PAC $\alpha$ ) from *Euglena gracilis*.

The 34th Meeting of American Society of Photobiology

Juni 2008, Burlingame, CA

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg angefertigt. Zu ihrem Gelingen trugen neben mir noch viele weitere Personen bei, von denen ich einige besonders erwähnen möchte.

**Prof. Dr. Georg Nagel** gab mir das herausfordernde Thema und die Möglichkeit, dieses in seiner Arbeitsgruppe zu untersuchen. Dabei nahm er sich stets Zeit für meine Fragen und unterstützte mich mit Anregungen und Diskussionen.

**Prof. Dr. Roland Benz** erklärte sich bereit, Gutachter dieser Arbeit zu sein.

In der **Arbeitsgruppe Nagel** fühlte ich mich sehr wohl und konnte in einem angenehmen Arbeitsklima effizient forschen. Besonders **Frieda Reisberg** hat mir sehr geholfen, da sie die cAMP- und cGMP-Immunoassays für mich durchgeführt hat. **Patrick Stumpf** injizierte und belichtete viele Oocyten. Auf seine sorgfältige Arbeit konnte ich mich dabei immer verlassen.

Die **Arbeitsgruppe Hedrich** erlaubte uns ihre Räumlichkeiten, Material und Geräte mitzubeneutzen, während sich die Arbeitsgruppe Nagel noch im Aufbau befand. Die **Mitarbeiter der Werkstatt** des Julius-von-Sachs-Institut waren beim Aufbau der Messplätze sowie beim Bau der Geräte zur Belichtung der Oocyten eine große Hilfe.

Meine **Familie** unterstützte mich während meines gesamten Studiums nicht nur finanziell. Speziell mein Bruder **Ralf** half mir bei dieser Arbeit durch sein Korrekturlesen und viele weitere wichtige Anregungen und Hinweise.

Und nicht zuletzt sorgte meine Freundin **Heike** dafür, dass ich vor allem während der Schlussphase dieser Arbeit immer etwas Sauberes zum Anziehen und genug zu Essen hatte.

Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich danken.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 19. März 2010

.....

Jens Looser