

**cAMP- und cGMP-bindende  
Tandem-GAF-Domänen:  
Biochemische Untersuchungen mit  
einer cyanobakteriellen  
Adenylatcyclase**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von  
Sandra Bruder

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2006  
Dekan: Prof. Dr. S. Laufer  
Erster Berichterstatter: Prof. Dr. J. E. Schultz  
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. O. Werz  
Dritter Berichterstatter: Prof. Dr. D. Koesling

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde zwischen Februar 2003 und September 2005 am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz danke ich für die Überlassung des Themas, für Diskussionen und Ratschläge in allen Bereichen des Lebens.

Herrn Prof. Dr. O. Werz danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Für die Zusammenarbeit bei der Kristallisation der CyaB2-GAF-Domänen geht mein Dank an PD Dr. J. Linder, Prof. J. A. Beavo und S.E. Martinez vom Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, USA.

Eine besondere Anerkennung geht an Anita Schultz für die vielen Klonierungen und Expressionen, die sie unter größtem persönlichem Einsatz für die vorliegende Arbeit anfertigte.

Allen meinen Kollegen im Labor möchte ich für das gute Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und immer offenen Ohren danken. Besonders genannt sei Ursula Kurz, die mir neben vielen praxisnahen Tipps durch die Überlassung ihres Pferdes „Harjana“ die Zeit in Tübingen verschönerte. Marco Groß-Langenhoff sei für das Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt.

PD Dr. Eric Beitz danke ich für seine Hilfe beim Umgang mit dem Schreibprogramm *Latex*. Herrn PD Dr. J. Linder verdanke ich viele gute Tipps bei der Planung von Konstrukten und Mutanten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>v</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Small molecule binding domains (SMBDs)	2
1.2 GAF-Domänen	2
1.3 Phosphodiesterasen	6
1.4 Adenylatcyclasen	8
1.5 Adenylatcyclasen aus <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	8
1.6 PAS-Domänen	9
1.7 Aufgabenstellung	10
<b>2 Material</b>	<b>13</b>
2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	13
2.2 Geräte	15
2.3 Oligonukleotide (Primer)	17
2.3.1 Sequenzier-Primer	17
2.3.2 Klonierungsprimer	18
2.4 Verwendete Plasmide	23
2.5 Puffer und Lösungen	25
2.5.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	25
2.5.2 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie	26
<b>3 Methoden</b>	<b>31</b>
3.1 Gentechnologische Methoden	31
3.1.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Miniprep)	31
3.1.2 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese	31
3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	32
3.1.4 Reinigung, Entsalzung und Konzentrierung von DNA	32
3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
3.1.6 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen	33
3.1.7 Glätten von überhängenden DNA-Enden	34
3.1.8 5'-DNA-Phosphorylierung von PCR-Produkten	34
3.1.9 5'-DNA-Dephosphorylierung von Plasmid-Vektoren	34

3.1.10	Ligation von DNA . . . . .	34
3.1.11	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	35
3.1.12	Sequenzierung von DNA . . . . .	36
3.2	Mikrobiologische Methoden . . . . .	37
3.2.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen . . . . .	37
3.2.2	Standardtransformation von <i>E.coli</i> -Zellen . . . . .	37
3.2.3	Schnelltransformation von <i>E.coli</i> -Zellen . . . . .	38
3.2.4	<i>E.coli</i> -Dauerkulturen . . . . .	38
3.2.5	Blau-Weiß-Screen . . . . .	38
3.3	Proteinchemische Methoden . . . . .	38
3.3.1	Bio Rad Proteinbestimmung . . . . .	38
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	39
3.3.3	Western Blot . . . . .	40
3.4	Proteinexpression . . . . .	41
3.5	Zellernte . . . . .	42
3.6	Zellyse . . . . .	42
3.7	Proteinreinigung durch Ni <sup>2+</sup> -NTA . . . . .	43
3.8	Dialyse . . . . .	44
3.9	CyaB2-GAFs: Expression und Reinigung zur Kristallisation . . . . .	44
3.10	Adenylatcyclase-Enzymtest . . . . .	45
3.11	cNMP-Bindungsstudien . . . . .	46
3.12	Phosphorylierung von PDE5-Konstrukten . . . . .	47
3.13	Erstellung eines Autoradiogramms . . . . .	47
3.14	Klonierungen . . . . .	49
3.14.1	vorhandene Ausgangsklone . . . . .	49
3.14.2	CyaB2-CyaB1 AC-Konstrukte . . . . .	51
3.14.3	PDE5-Konstrukte . . . . .	62
3.14.4	CyaB1-[EL-EIRIP-PDE2]-Konstrukte . . . . .	75
3.14.5	rPDE2a GAF-[EL-EIRIP-CyaB1]-Konstrukte . . . . .	82
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>89</b>
4.1	Ergebnisse der Kristallisation der CyaB2-GAF-Domänen . . . . .	89
4.1.1	Gesamtstruktur des Tandem-CyaB2-GAF-Dimers . . . . .	89
4.1.2	Dimerisierung im Vergleich zu PDE2A . . . . .	91
4.1.3	Nucleotidbindung in CyaB2 GAF A und B . . . . .	91
4.1.4	Bedeutung des konservierten NKFDE-Motivs . . . . .	94
4.2	Untersuchung der CyaB2 GAF-CyaB1 AC-Chimären . . . . .	97
4.2.1	CyaB2 GAF-CyaB1 AC . . . . .	98
4.2.2	Mutationen der NKFDE-Motive in CyaB2 GAF A und B . . . . .	99
4.2.3	verkürzte CyaB2 GAF-CyaB1 AC . . . . .	101
4.3	Untersuchung der PDE5 GAF-CyaB1 AC-Chimären . . . . .	106
4.3.1	Biochemische Charakterisierung von PDE5 GAF-CyaB1 AC . . . . .	107
4.3.2	Phosphorylierung an S102 . . . . .	116

4.3.3	Rolle des NKFDE-Motivs in PDE5 GAF-CyaB1 AC . . . . .	124
4.3.4	Einfluss des N-Terminus . . . . .	133
4.4	Nucleotidspezifität in GAF B von CyaB1 . . . . .	140
4.4.1	Blockaustausch AR-EL . . . . .	141
4.4.2	Blockaustausch AR-EIRIP . . . . .	142
4.4.3	Blockaustausch EL-EIRIP . . . . .	143
4.4.4	Blockaustausche zwischen T258 und EIRIP . . . . .	143
4.4.5	Kristallisationsversuche SVFL-EIRIP . . . . .	145
4.4.6	Austausche TV-/SL-/SV-CyaB1-EL-EIRIP . . . . .	148
4.4.7	TL in CyaB1 GAF B nach SV . . . . .	150
4.4.8	Austausch AAA in CyaB1 gegen FDG . . . . .	151
4.4.9	FDG in CyaB1-(EL-EIRIP-rPDE2a)-CyaB1 AC zu AAA . . . . .	152
4.4.10	Austausche weiterer AS zwischen EL und EIRIP . . . . .	153
4.4.11	Mutation Y325A in CyaB1-(EL-EIRIP-rPDE2a) . . . . .	155
4.5	rPDE2a GAF B: Mutationen zwischen AR und EIRIP . . . . .	157
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>161</b>
5.1	Kristallstruktur der CyaB2-GAF-Domänen . . . . .	161
5.2	Bindung und Aktivierung in CyaB2 GAF A und B . . . . .	163
5.2.1	cAMP-Bindung an die CyaB2 GAF-Domänen . . . . .	163
5.2.2	Bedeutung des NKFDE-Motivs . . . . .	165
5.2.3	Aktivierung durch beide GAF-Domänen . . . . .	166
5.3	Untersuchung der PDE5 GAF-CyaB1 AC-Chimären . . . . .	169
5.3.1	PDE5 GAF-CyaB1 AC wird durch cGMP aktiviert . . . . .	169
5.3.2	Auswirkung von Mutationen im NKFDE-Motiv . . . . .	171
5.3.3	Einfluß des PDE5 N-Terminus . . . . .	173
5.3.4	Auswirkungen der Phosphorylierung an S102 . . . . .	175
5.3.5	Hypothesen zur Aktivierung . . . . .	177
5.3.6	Pharmakologische Bedeutung der PDE5 GAF-Domänen . . . . .	178
5.4	Nucleotidspezifität in CyaB1 . . . . .	179
5.5	Offene Fragen und Ausblick . . . . .	182
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>185</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>187</b>
7.1	DNA- und Proteinsequenzen der verwendeten Gene . . . . .	187
7.1.1	<i>CyaB1-Holoenzym</i> . . . . .	187
7.1.2	<i>CyaB2: N-Terminus-GAF A und B</i> . . . . .	189
7.1.3	<i>rPDE2a: GAF A und B(AS E207-N546)</i> . . . . .	191
7.1.4	<i>PDE5 1A_2: N-Terminus-GAF A und B</i> . . . . .	192
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>195</b>



# Abkürzungen

<b>AB</b>	Antibiotikum
<b>AC</b>	Adenylatcyclase
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AS</b>	Aminosäure <sup>1</sup>
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>cpm</b>	gezählte Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
<b>CyaB1/ CyaB2</b>	Adenylatcyclase <i>CyaB1/CyaB2</i> aus <i>Anabaena sp. PCC 7120</i>
<b>CyaB1 AC</b>	verwendet zur Benennung von Konstrukten, gemeint sind PAS- und katalytische Domäne der CyaB1
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>dNTP</b>	Deoxynucleosid-triphosphat
<b>ddNTP</b>	Dideoxynucleosid-triphosphat (zur Sequenzierung)
<b>EHNA</b>	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-Adenin
<b>FP</b>	Zellaufschluß mit <i>Frenchpress</i>
<b>GAF</b>	Proteindomänen, benannt nach dem Vorkommen in cGMP bindenden Phosphodiesterasen, Adenylatcyclasen in <i>Anabaena</i> und dem Transkriptionsfaktor FhlA von <i>E.coli</i>
<b>GC</b>	Guanylatcyclase
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>GMP-PNP</b>	Guanylyl-imidodiphosphat
<b>IBMX</b>	3-Isobutyl-1-methylxanthin, ein unselektiver PDE-Hemmer
<b>IPTG</b>	Isopropylthiogalactosid
<b>kD</b>	Kilodalton
<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertani Kulturmedium für Bakterien
<b>MCS</b>	<i>multiple cloning site</i>
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA</b>	Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose

---

<sup>1</sup>die 20 proteinogenen AS wurden in der drei-Buchstaben-Abkürzung angegeben. In Kombination mit einer Positionsangabe, bei zwei und mehr aufeinanderfolgenden AS und in Namen von Konstrukten wurden die Ein-Buchstaben-Symbole verwendet.

<b>ORF</b>	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
<b>PAS</b>	Proteindomäne, benannt nach dem Vorkommen in <i>periodic clock proteine</i> , <i>aryl hydrocarbon receptor</i> und <i>single minded protein</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PDE/-n</b>	Phosphodiesterase/-n
<b>PDE2A</b>	Phosphodiesterase 2A aus der Maus (Kristallstruktur in [1])
<b>PKA</b>	durch cAMP-stimulierte Proteinkinase
<b>PKG</b>	durch cGMP-stimulierte Proteinkinase
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>rPDE2a</b>	Phosphodiesterase 2A aus Rattendarm
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>SMBDs</b>	<i>small molecule binding domains</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i>
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
<b>Tes</b>	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminomethansulfonsäure
<b>TM</b>	Transmembranspanne
<b>Tris</b>	Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan
<b>US</b>	Ultraschall
<b>UZ</b>	Ultrazentrifuge
<b>X-gal</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 1 Einleitung

Jeder Organismus muß auf Reize wie Licht, Kälte, Hitze, Trockenheit, pH und Hunger reagieren können. Solche Signale werden in Mensch und Tier unter anderem durch im Blut kreisende Neurotransmitter und Hormone auf einzelne Zellen oder Zellverbände (Organe) übertragen. Diese geben oft ihre Information durch Freisetzung eines *second messengers* ins Zellinnere weiter. Cyclisches Adenosin-3', 5'-monophosphat (*cAMP*) war der erste identifizierte intrazelluläre Botenstoff, bereits 1957 entdeckte Earl Sutherland dessen Rolle beim Glykogenabbau. Die Entdeckung des *cAMPs* als *second messenger* warf die Frage auf, ob auch das andere biologische Purinnucleotid, cGMP, eine solche Funktion im Organismus erfüllt. Diese Frage wurde 1963 mit der Entdeckung des cyclischen Guanosin-3', 5'-monophosphats (*cGMP*) im Urin prinzipiell mit ja beantwortet. In den folgenden Jahren waren die Entdeckungen auf dem Gebiet des *second messengers cAMP* vorherrschend. Die Rolle des *cAMPs* bei der Regulation von Stoffwechsel, Zelldifferenzierung, Gentranskription, Blutzuckerspiel, Verhalten und Lernen wurde beschrieben. Die bedeutenden Rollen von cGMP wurden erst im letzten Jahrzehnt des vergangenen Jahrhunderts wirklich erkannt und beschrieben. Dabei ergaben sich erhebliche Parallelen in den Proteinsystemen, die beim Stoffwechsel von und der Signalübertragung über cAMP bzw. cGMP beteiligt sind. Enzyme und Bindungsdomänen, die für die Synthese, den Abbau und die Bindung der beiden cyclischen Nucleotide verantwortlich sind, sind oft homolog und eng verwandt. Phosphodiesterasen, die den Abbau von *cAMP* und cGMP zu inaktiven 5'-Monophosphaten katalysieren, hatten teilweise sogar eine doppelte Spezifität. Die Bedeutung des Wissens über die an der Signaltransduktion beteiligten Proteine erhellt die Tatsache, dass allein ca. 60% aller bekannten Arzneistoffe über Interaktionen mit *G-Protein gekoppelte Rezeptoren* (GPCRs), d.h. großteils über cAMP wirken.

Cyclische Nucleotide beeinflussen intrazellulär durch Bindung an regulatorische Domänen die Aktivität von Proteinkinasen, Ionenkanälen, Transkriptionsfaktoren und Phosphodiesterasen. Der am besten untersuchte intrazelluläre Rezeptor für *cAMP* und *cGMP* ist die CNB (*cyclic nucleotide-binding*-Domäne), der bei cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen, cNMP-abhängigen Ionenkanälen (CNGs) und dem cAMP-aktivierten *Ras guanine nucleotide exchange factor Epac* vorkommt [2,3].

Eine weitere, neuere cNMP-bindende Domäne stellt die *GAF*-Domäne dar. 1990 wurde erstmals beobachtet, dass die N-terminalen regulatorischen Bereiche von einigen PDEn allosterisch cGMP binden. Die Sequenzen dieser *GAF*-Domänen unterscheiden sich von Domänen der CNB-Familie. Mittlerweile wurden in Organismen aus allen Bereichen der Evolution *GAF*-Domänen identifiziert. Trotz intensiver Forschung ist bisher wenig über die Struktur, Funktion und Bindungspartner der meisten ( $\geq 2330$

Einträge in Datenbanken) GAF-Domänen bekannt.

## 1.1 Small molecule binding domains (SMBDs)

Viele zelluläre Vorgänge wie Metabolismus, Transport oder Signalweiterleitung werden über die Bindung kleiner Signalmoleküle an spezialisierte Bereiche in beteiligten Proteinen und Enzymen reguliert. Aus Genomprojekten wurden mittels Sequenzanalysen und vorhergesagten Proteinstrukturen bisher 21 intrazelluläre *Small-molecule-binding-domains* (SMBDs) [4] in Bakterien, Archaea und Eukaryoten identifiziert.

Bei SMBDs handelt es sich um Proteinbereiche, die meist in einiger Entfernung zum katalytischen Zentrum des jeweiligen Enzyms angesiedelt sind. Sie üben durch die Bindung kleiner Moleküle wie organischer Metaboliten, Mono- oder Oligomere aus Biopolymeren, anorganischer Ionen eine regulatorische Wirkung auf das katalytische Zentrum aus und besitzen selbst wahrscheinlich keine katalytische Aktivität. Aufgrund struktureller Verwandtschaften erfüllen sie in Proteinen häufig ähnliche Funktionen [4–7]. Dies kann zur Funktionsaufklärung unbekannter Proteine beitragen.

Meist handelt es sich um Domänen von ca. 100 AS-Länge, die in ihren Sequenzen weniger stark als die katalytischen Domänen konserviert sind. Von einigen SMBDs ist bekannt, dass sie verschiedene Liganden binden. So binden die SMBDs PAS (Per-arrnt-sim) und DSBH (double-stranded beta helix) Moleküle wie Häm, Flavinnucleotide, Kohlenhydrate, Oxalat und Aminosäuren [4]. STAS (sulfate-transporter, anti-sigma factor binding protein), USPA (universal stress protein A), cNMPBD (cNMP binding domain) und einige GAF-Domänen (cGMP bindende phosphodiesterase, adenylate cyclase, FhlA domain) sind auf die Bindung von Nucleotiden spezialisiert. Ferredoxine, HMA (heavy metal-associated domain) und T-OB (transporter associated OB domain) binden kleinere anorganische Liganden wie Sulfat oder Schwermetalle (Kupfer, Eisen, Molybdate). Die molekularen Interaktionen zwischen Ligand und SMBDs reichen hierbei von H-Brücken, hydrophoben Interaktionen über kovalente Bindung an AS-Seitenketten bis hin zu Übergangs-Clustern aus Metallion und SH-Gruppen der Cysteinseitenketten. Von vielen SMBD-Klassen sind einzelne Vertreter kristallisiert [1, 2, 4, 8–11].

Das Vorkommen von SMBDs in Proteinen aus Prokaryoten (darunter Cyanobakterien) zeigt die frühe evolutionäre Entwicklung komplexer regulatorischer Mechanismen durch die Kombination eines begrenzten Repertoires von Domänen auf.

## 1.2 GAF-Domänen

GAF-Domänen sind SMBDs (siehe 1.1), die in vielen Organismen, vor allem in Bakterien, als wichtige regulatorische Elementte für verschiedene Enzyme vorkommen und aufgrund von vorhergesagten Struktur- und Sequenzähnlichkeiten zu einer Gruppe zusammengefaßt wurden [2, 4, 6, 12].

Der Name *GAF* leitet sich von den ersten drei Proteinklassen ab, in denen Domänen dieser Art gefunden wurden, nämlich in cGMP bindenden tierischen Phosphodiesterasen, cyanobakteriellen Adenylatcyclasen und dem Transkriptionsfaktor *FhlA* aus *E.coli*. Bisher wurden 2330 GAF-Domänen in 2089 Proteinen identifiziert (Stand 06.10.2005 unter <http://smart.embl-heidelberg.de>). GAF-Domänen sind neben der Regulatorfunktion in PDEn an der Gen-Regulation in Bakterien [6], an der Ethylen-Detektion in Pflanzen, an der Stickstofffixierung in Bakterien [13], an der Regulation der Adenylatcyclaseaktivität im Cyanobakterium *Anabaena sp. PCC 7120* (siehe 1.5, [14, 15]) und an der *two-component sensor histidine kinase* in Viren, Bakterien und Pflanzen beteiligt [16]. Eine Übersicht liefert Abb. 1.1.

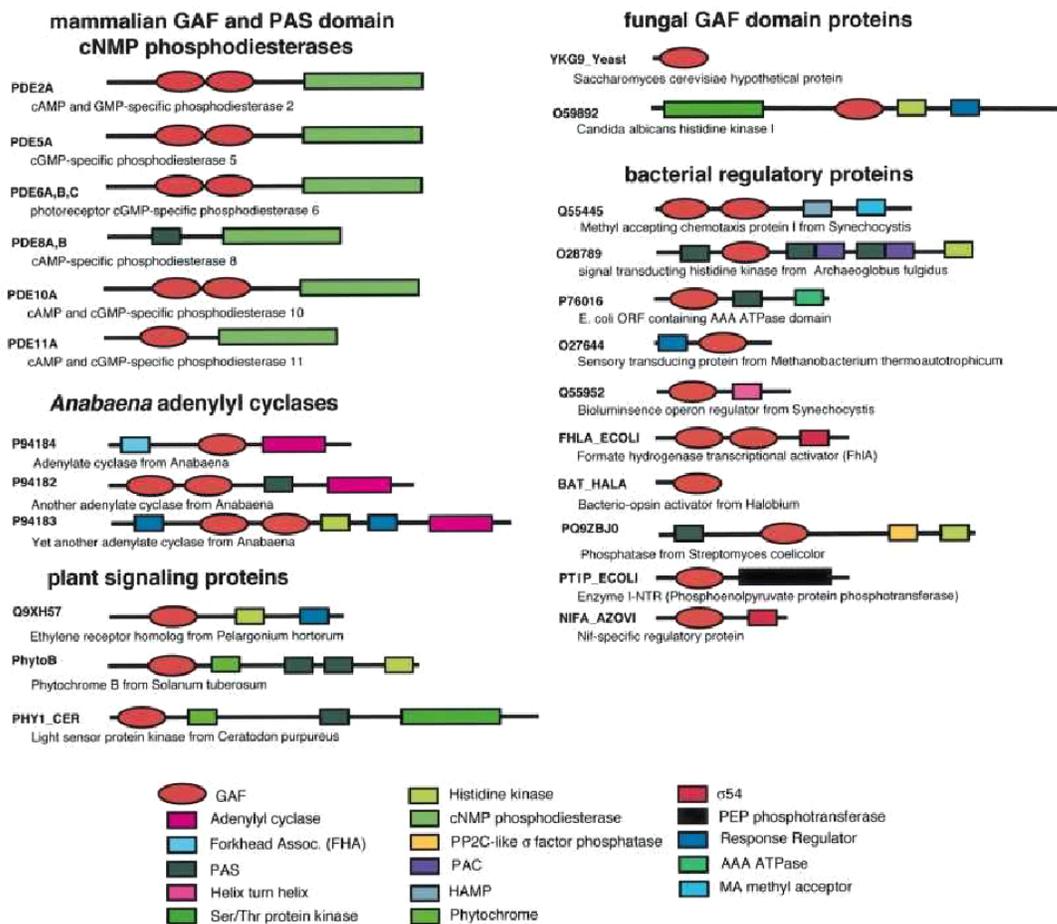


Abb. 1.1: Domänen-Struktur von GAF- und PAS enthaltenden Proteinen (aus [2], Stand 2000).

Am besten charakterisiert sind bisher die GAF-Domänen in Säuger-PDEn [6, 12, 16, 17](siehe auch 1.3). Schon seit 1990 wurde angenommen, dass die N-terminalen regulatorischen Domänen aus PDE2, 5 und 6 allosterische Bindungstellen für cGMP

darstellen [17–21]. Fünf der elf Säuger-PDE-Familien (PDE2, 5, 6, 10 und 11) besitzen N-terminal angeordnet zwei GAF-Domänen. Üblicherweise wird die N-terminale als GAF A und die C-terminale als GAF B bezeichnet. PDE2, 5, 6 und 11 werden allosterisch durch cGMP, PDE10 durch cAMP reguliert [21–26]. Sie weisen große Sequenzähnlichkeiten auf (siehe Abb. 1.2) Durch Mutationsstudien, Alignments und Strukturvergleiche versuchte man die für die Bindung und Selektivität für cAMP bzw. cGMP verantwortlichen Aminosäuren zu identifizieren. 12 der 14 in Säuger-PDEn vorhergesagten GAF-Domänen besitzen ein konserviertes NK/RX<sub>n</sub>FX<sub>3</sub>DE-Motiv und binden cyclische Nucleotide. Erste Mutagenesestudien an PDE5 [25, 27–30] und PDE6 [26] schienen deren Beteiligung zu bestätigen.

Die Strukturaufklärung der PDE2A-GAF-Domänen im Jahr 2002 [1] zeigte jedoch, dass zumindest im Falle der PDE2 dieses Motiv außerhalb der Bindungstasche liegt. Mutagenesestudien der an der Bindung beteiligten Aminosäuren in PDE2A [25], bzw. ihrer entsprechenden Aminosäuren in PDE5 [2, 31], PDE6 [23] und der cAMP bindenden Trypanosomen-PDE2B [32] zeigten, dass einige dieser Aminosäuren für die Bindung des cyclischen Nucleotids an die jeweilige GAF-Domäne essentiell sind (genauere Beschreibung der 13 in PDE2A identifizierten Aminosäuren unter 4.4, Seite 140).

Der Aufbau der cNMP bindenden GAFs ist konserviert. Meist folgen einem unterschiedlich langen N-Terminus eine GAF A-Domäne mit 110-170 AS, dann ein Linker mit 35-70 AS und anschließend die 110-170 AS lange GAF B-Domäne [16, 22].

Warum GAF-Domänen in PDEn und anderen GAF-haltigen Enzymen oft im Tandem vorkommen, ist bisher ungeklärt. Die Kristallstruktur der PDE2A zeigt, dass nur in GAF B cGMP gebunden ist, GAF A stellt eine Dimerisierungsdomäne dar, der Kristall zeigt eine parallele Anordnung der GAF-Domänen.

GAF-Domänen regulieren in PDEn aber nicht nur das katalytische Zentrum. Bei PDE5 bewirkt die Phosphorylierung von S102 (im N-Terminus der hPDE5A1) eine höhere Affinität der GAF-Domänen zu cGMP. Obendrein soll die Bindung des Nucleotids an die GAF-Domänen Voraussetzung für die Phosphorylierung sein [16, 24, 28, 33–39]. Die Ergebnisse zu Auswirkungen einer Phosphorylierung der isolierten bzw. in Zellen vorkommenden PDE5 sind widersprüchlich [24, 28, 33–41].

Desweiteren wurden bisher die GAF-Domänen der Adenylatcyclasen *CyaB1* und *CyaB2* aus dem Cyanobakterium *Anabaena sp. PCC 7120* [14, 15] untersucht. Ihre Domänenstruktur ist identisch zu der in PDEn (siehe Abb. 1.1). Außerdem ist die Sequenz der *CyaB1* GAF-Domänen zu 25% identisch und zu 42% ähnlich mit den PDE2A-GAF-Domänen.

Alle vier GAF-Domänen aus *CyaB1* und *CyaB2* besitzen das auf eine cNMP-Bindung hindeutende NK/RX<sub>n</sub>FX<sub>3</sub>DE-Motiv. In *CyaB1* erfolgt eine Bindung von cAMP an die GAF B-Domäne und dadurch eine Aktivierung der AC [14, 15].

Durch Ersatz der *CyaB1* GAF-Domänen durch die rPDE2a GAF-Domänen wurde eine cGMP-stimulierbare AC erhalten [14, 15] und gezeigt, dass Struktur und Funktion der GAF-Domänen über drei Milliarden Jahre evolutionären Abstands konserviert sind.

Das Vorhandensein des NK/RX<sub>n</sub>FX<sub>3</sub>DE-Motiv nicht nur bei den tierischen PDEn, sondern auch bei cyanobakteriellen, cAMP-bindenden GAFs und dessen Vorkommen in der trypanosomalen, über die GAF-A cAMP bindenden PDE2B [32], läßt eine Beteiligung dieses Motivs an der cGMP bzw. cAMP-Bindung vermuten und ermöglicht damit vielleicht die Voraussage des Liganden bei weiteren GAF-Domänen.

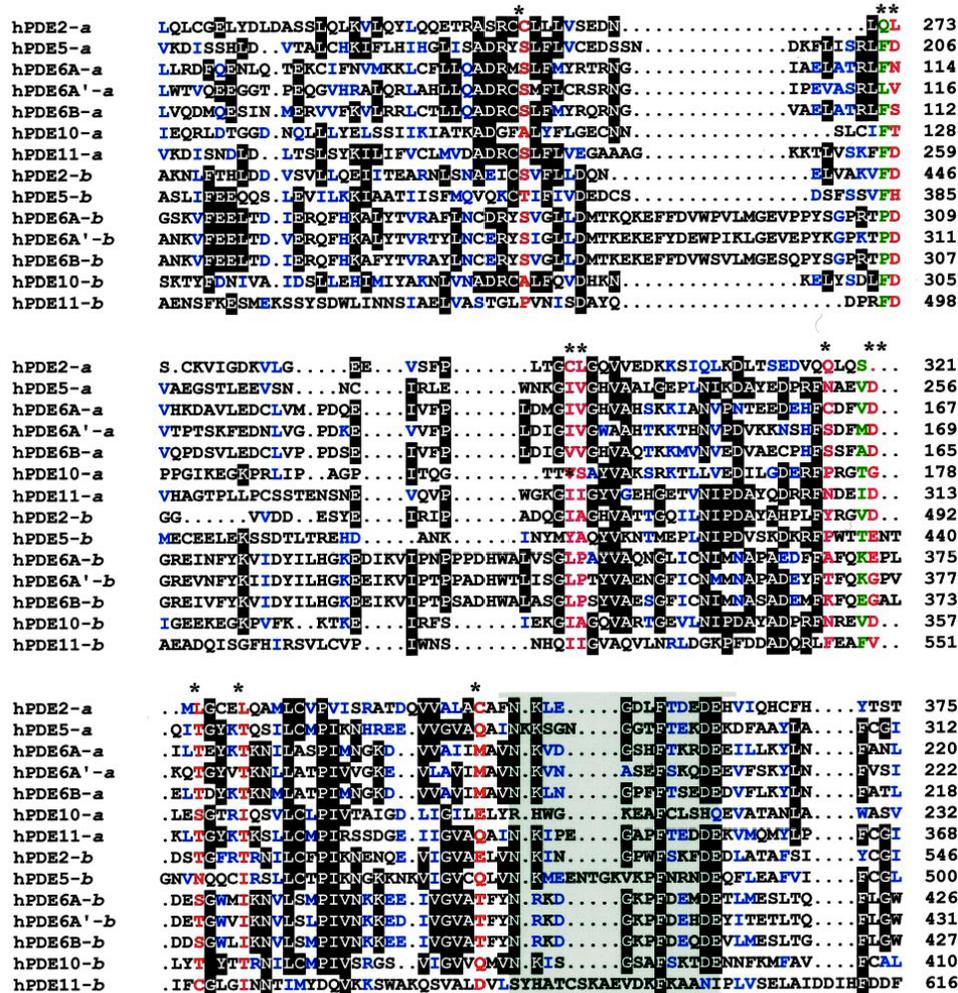


Abb. 1.2: Clustal W-Alignment der GAF-Domänen der Säuger-PDEn. Nach [16].

Da GAF-Domänen in Säugern nur in PDEn und auch dort nur in 5 Familien vorkommen, stellen sie mögliche „drug-targets“ zur selektiven Hemmung einzelner PDEn dar. Ihre physiologische Bedeutung zeigt sich unter anderem in der Mutation H258N in PDE6B, die zur autosomal dominanten kongenitalen Nachtblindheit des Menschen führt [2, 42].

Bisher stellte die Tatsache, dass cGMP bei den Säuger-PDEn 2, 5, 6 und 11 sowohl

Substrat als auch allosterischer Aktivator an den GAF-Domänen ist, ein meßtechnisches Problem dar, es konnte nie ein isolierter enzymatischer Effekt der Nucleotidbindung an die GAF-Domänen gemessen werden. Nachdem jedoch der Austausch der CyaB1-GAF-Domänen durch die rPDE2a-GAF-Domänen in der Adenylatcyclase CyaB1 erfolgreich war, stellt die katalytische Domäne der CyaB1 ein geeignetes Testsystem für die Bindung cyclischer Nucleotide an verschiedene GAF-Domänen dar.

### 1.3 Phosphodiesterasen

Die zellulären Spiegel der *second messenger* cAMP und cGMP werden nicht nur durch die synthetisierenden Enzyme AC und GC bestimmt, sondern auch durch abbauende Phosphodiesterasen. Diese hydrolysieren cAMP und cGMP zum jeweiligen Nucleosidmonophosphat und senken so die *second messenger*-Konzentration. PDEn unterliegen verschiedenen Regulationsmechanismen, z.B. durch intrazelluläres cAMP und cGMP, durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin, Phosphorylierung, Interaktion mit Regulatorproteinen, intrazelluläre Lokalisation und Änderungen ihrer Proteinkonzentration durch Up- und Downregulation der Expression. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten der PDEn erfolgt eine Einteilung in zwei Klassen [43]:

- Klasse I** alle 11 Säuger-PDE-Familien, 4 PDEn aus *Ephydatia fluviatilis*, 1 PDE aus *Drosophila*, die *S. cerevisiae* PDE2 und die trypanosomalen PDEn [32, 44, 45]  
enthalten alle einen konservierten C-terminalen Bereich von ca. 300 AS, der das katalytische Zentrum einschließt
- Klasse II** bisher 3 Vertreter aus *S. cerevisiae*, *Vibrio fischeri* und *Dictyostelium discoideum*  
32% Sequenzhomologie zu Klasse I katalytischen Domänen

Die 11 Säuger-PDE-Familien sind im C-terminalen, katalytischen Bereich sehr ähnlich (20–45% Identität). Die katalytischen Zentren sind ohne die regulatorischen Domänen als Monomere aktiv. Dies steht im Widerspruch zur Tatsache, dass alle Säuger-PDEn als Di- oder Oligomere vorliegen. Die Funktion dieser Quartärstruktur ist bisher unbekannt. Die katalytischen Zentren der einzelnen PDE-Familien unterscheiden sich in ihrer Spezifität für cAMP und cGMP, in ihren Umsetzungsgeschwindigkeiten, ihren erforderlichen Cofaktoren ( $\text{Zn}^{2+}$ , plus  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  bzw.  $\text{Co}^{2+}$ ), und ihrer Selektivität gegenüber verschiedenen Hemmstoffen (siehe Tab. 1.1, [3, 43, 46–50]). Auch die Gewebeverteilung, die Anzahl der Isoformen, Gene, Splicevarianten und das Expressionsmuster der verschiedenen Familien divergiert [46, 47, 51–62]. Die bei einzelnen PDE-Familien unterschiedlichen N-Termini erfüllen verschiedene regulatorische Aufgaben. PDE 1 bindet  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin, die Aktivität der PDE 3 Familie wird durch Phosphorylierung gesteuert, in PDE4 besitzt der N-Terminus Membran-bindende Eigenschaften oder interagiert mit weiteren Proteinen. Die bei PDE 8A1 gefundene N-terminale PAS-Domäne wechselwirkt mit Proteinen, die den Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B hemmen [63]. Eine Übersicht über die einzelnen Familien gibt Tab. 1.1.

Familie	Charakterisierung	Spezifität des katal. Zentrums	(selektive) Hemmstoffe
<b>PDE1</b>	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin stimuliert	dual	8-Methoxy-IBMX, Phentiazine, Zaprinast
<b>PDE2</b>	c-GMP-stimuliert	dual	EHNA
<b>PDE3</b>	cGMP-gehemmt	dual	Cilostamid, Milrinon, Amrinon
<b>PDE4</b>	cAMP-spezifisch	cAMP	Rolipram, Roflumilast
<b>PDE5</b>	cGMP-spezifisch	cGMP	Zaprinast, Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil, Dipyridamol
<b>PDE6</b>	Photorezeptor	cGMP	Zaprinast, Sildenafil
<b>PDE7</b>	hohe cAMP-Affinität	cAMP	Benzothieno- und Benzothiadiazine
<b>PDE8</b>	hohe cAMP-Affinität	cAMP	Dipyridamol
<b>PDE9</b>	hohe cGMP-Affinität	cGMP	Zaprinast
<b>PDE10</b>	duale Spezifität, cAMP-stimuliert [22]	dual	–
<b>PDE11</b>	duale Spezifität, cGMP-stimuliert [22]	dual	Dipyridamol, Zaprinast

**Tab. 1.1:** Übersicht über die einzelnen Familien der Säuger-PDEn, nach [3, 43].

PDE 2, 5, 6, 10 und 11 enthalten N-terminal GAF-Domänen [2, 20], die durch cyclische Nucleotide die katalytische Aktivität beeinflussen können (siehe 1.2).

Die Beteiligung der PDEn am cGMP-Signalweg bietet über selektive Hemmstoffe interessante medikamentöse Angriffspunkte zur Behandlung verschiedener Erkrankungen. Das wohl bekannteste Beispiel ist Sildenafil (*Viagra*), das als PDE5-Hemmer zusammen mit den Nachfolgesubstanzen Tadalafil (*Cialis*) und Vardenafil (*Levitra*) zur Behandlung der erektilen Dysfunktion und bei pulmonaler Hypertonie eingesetzt wird. Die Steigerung des cGMP-Spiegels bewirkt eine Gefäßerweiterung und damit eine Durchblutungssteigerung des Corpus cavernosum bzw. der Lungengefäße [19, 64–70].

Momentan werden PDE4 (und PDE3)-Hemmer zur Behandlung von Asthma und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) intensiv untersucht [71–80]. Bei Rauchern wird die COPD wahrscheinlich in Zukunft einen bedeutenden Kostenfaktor im Gesundheitswesen darstellen. Auch bei der sehr seltenen Erkrankung *essentielle Thrombozythämie* kommt ein selektiver PDE-Hemmstoff, der PDE3-Hemmer Anagrelid (*Xagrid*), zum Einsatz [81, 82].

Alle bisherigen Stoffe hemmen das katalytische Zentrum der jeweiligen PDE. Da GAF-Domänen im Menschen nur in PDEn vorkommen, stellen sie ideale *drug targets* für eine noch selektivere Hemmung einer definierten PDE dar.

## 1.4 Adenylatcyclasen

Adenylatcyclasen sind als Produzenten des praktisch ubiquitären *second messengers* *cAMP* in allen drei Reichen des Lebens vorhanden. In Säugern überwiegen membranständige Formen, in Bakterien findet man häufiger lösliche Adenylatcyclasen (zur Übersicht [83, 84]).

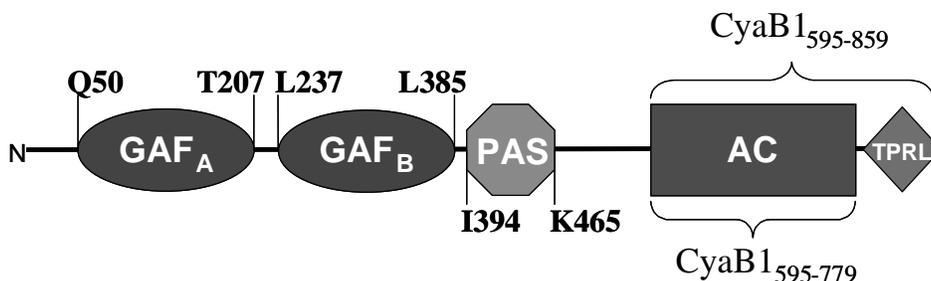
Am besten untersucht und deshalb immer das Vergleichsobjekt für andere ACn sind die Säuger-ACn. Sie besitzen zwei Membrandomänen und zwei cytosolische Bereiche, die als C1- und C2-Schleifen bezeichnet werden. Die Dimerisierung dieser beiden Schleifen erzeugt ein funktionsfähiges katalytisches Zentrum. Im katalytischen Zentrum liegen 6 konservierte Aminosäuren vor, zwei Aspartate zur Cofaktorbindung, ein Lysin und Aspartat zur Substraterkennung und -bindung und je ein Asparagin und Arginin zur Stabilisierung des Übergangszustandes [85–87].

## 1.5 Adenylatcyclasen aus *Anabaena* sp. PCC 7120

Cyanobakterien sind eine Untergruppe Gram-negativer Prokaryoten. Sie synthetisieren Chlorophyll a und nutzen für die Photosynthese Wasser als Elektronendonator. Ihre schon ca. 3,5 Milliarden Jahre dauernde Existenz führte durch die Produktion von Sauerstoff zu einer aeroben Erdatmosphäre [88, 89]. Cyanobakterien sind in der Lage sich an unterschiedlichste Klimabedingungen, wie extreme Kälte, große Hitze, hohe Ionengehalte oder stärkste Lichteinstrahlung anzupassen und liegen je nach Umgebung in verschiedenen vegetativen Formen vor.

Sie sind in der Lage Stickstoff zu fixieren [88, 90]. *cAMP* fungiert auch in Cyanobakterien als intrazelluläres Signalmolekül, der Spiegel wird vermutlich durch Wachstumsbedingungen beeinflusst. Stickstoffmangel, der Übergang von der Dunkelheit ins Helle oder sich ändernde  $\text{HCO}_3^-$ -Spiegel scheinen den *cAMP*-Spiegel zu erhöhen (Übersicht in [89], [91]).

Das Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 besitzt sechs Gene für Adenylatcyclase-Isoenzyme [14, 15, 91–93]. Die ACn CyaB1 und CyaB2 besitzen den gleichen modulären Aufbau (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3:** Modulärer Aufbau der CyaB1. Dem N-Terminus schließt sich ein Tandem aus zwei GAF-Domänen (GAF), eine PAS-Domäne (PAS), das katalytische Zentrum (AC) und eine *tetratricopeptid-repeat-ähnliche* Domäne (TPRL) an. Nach [14].

CyaB1 und CyaB2 besitzen N-terminal je zwei GAF-Domänen, die große Ähnlichkeit zu den cGMP-bindenden GAF-Domänen der Säuger-Phosphodiesterasen aufweisen [2, 14, 15, 94] und für die eine Autoaktivierung der katalytischen Domäne durch cAMP nachgewiesen wurde [14, 15]. Von den anderen vier ACn in *Anabaena sp. PCC 7120* besitzt CyaC N-terminal zwei GAF-Domänen, und CyaD eine einzelne GAF-Domäne, Liganden für diese GAF-Domänen wurden bisher nicht identifiziert.

Von T.Kanacher wurde gezeigt, dass die beiden GAF-Domänen der CyaB1 gegen die der rPDE2a ausgetauscht werden können [14, 15] und man eine funktionsfähige, cGMP-stimulierbare AC erhält. Somit stellt das CyaB1-Holoenzym mit seinen austauschbaren GAF-Domänen ein hervorragendes analytisches Werkzeug zur isolierten Untersuchung anderer GAF-Domänen dar.

## 1.6 PAS-Domänen

PAS-Domänen gehören wie die GAF-Domänen zu den SMBDs. Sie werden hier aufgeführt, da in CyaB1 und CyaB2 aus *Anabaena* eine ca. 70 AS lange PAS-Domäne zwischen den GAF-Domänen und dem katalytischen Zentrum sitzt (siehe Abb. 1.3).

PAS-Domänen sind wie die GAF-Domänen strukturelle Module, die in Proteinen aller Bereiche der Evolution vorkommen. Sie wurden zuerst im *Drosophila* clock protein PER, in den basic helix-loop-helix (bHLH) enthaltenden Transkriptionsfaktoren ARNT (aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator) aus Säugern und im SIM (single-minded protein) in Insekten gefunden und entsprechend benannt. Sie können auf Veränderungen der Umweltbedingungen wie Licht, Sauerstoff, Spannungsänderungen, Redoxpotentiale oder Liganden reagieren [8, 10, 11, 95] und sind im Cytosol lokalisiert. Durch Konformationsänderungen wird das empfangene Signal auf andere Domänen oder Partner übertragen, wobei Sequenzähnlichkeiten bei den meist 100-130 ASn langen Domänen sehr gering sind. Allerdings scheint ihre dreidimensionale Struktur mit einer typischen  $\alpha/\beta$ -Faltung konserviert zu sein. Dies zeigen Kristallstrukturen und NMR-Spektren verschiedener PAS-Domänen [9–11, 96, 97]. Auch die konformationelle Flexibilität der PAS-Domänen weist Ähnlichkeiten auf [97].

In Prokaryoten dienen die meisten PAS-Domänen als Sensor-Module für Zwei-Komponenten-Systeme. Eine der am besten untersuchten PAS-Domänen stellt hierbei der FixL/FixJ-Signalweg in *Rhizobia* dar. Hier wird über die Sauerstoffkonzentration das Ausmaß der Stickstofffixierung geregelt. Die PAS-Domäne in FixL mißt die  $O_2$ -Spiegel über eine Häm-Untereinheit und reguliert über Konformationsänderungen die Aktivität einer Histidin-Kinase [8, 98]. Im PYP (photoactive yellow protein) aus *Ectothiorhodospira halophila* besitzt die PAS-Domäne ein angehängtes 4-Hydroxycinnamoyl-Chromophor, das als Sensor (Übergang von *trans* zu *cis*) für blaues Licht dient [8, 9].

In Eukaryoten sind Zwei-Komponenten-Systeme selten, hier wurden PAS-Domänen in verschiedenen Klassen von Signalmolekülen, wie dem menschlichen Kalium-Kanal HERG, der PASK, einer PAS-enthaltenden Serin-Threonin-Kinase und verschiedenen Transkriptionsfaktoren gefunden. Auch die PDE8A1 enthält eine PAS-Domäne. Für

diese wurde kürzlich eine Wechselwirkung mit Hemmstoffen des Nekrosefaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  nachgewiesen, was zu einer Erhöhung der PDE-Aktivität führte [63].

Bisher hielt man diese PAS-Domänen vor allem für wichtige Protein-Protein-Interaktionsdomänen [96]. Mit der Entdeckung der Bindung von CO an den Häm-Cofaktor des Säuger-bHLH-PAS-Protein NPAS2 und der Erkenntnis, dass die pflanzliche PAS-enthaltende Serin-Threonin-Kinase NPH1 Licht über einen FMN-Cofaktor detektiert [8,95], erscheinen weitere Bindungspartner für die eukaryotischen PAS-Domänen wahrscheinlich. Dies lassen auch strukturelle Untersuchungen der PASK vermuten [9].

Die mögliche medizinische Bedeutung der PAS-Domänen zeigt sich in der Tatsache, dass eine Mutation im menschlichen Kalium-Kanal HERG (in dem die PAS-Domäne vielleicht als  $\text{O}_2$ -Sensor dient) mit kardialen Arrhythmien in Verbindung gebracht wird [8]. Auch der *hypoxia inducible factor* HIF, der zwei PAS-Domänen enthält, ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Reaktion von Zellen auf Sauerstoffmangel [8, 96, 99], eine Fehlregulation dieser zellulären Antwort kann zu Anämie, Herzinfarkt, Retinopathie oder Tumorwachstum führen. Hier bieten sich pharmakologische Angriffspunkte für die Behandlung der entsprechenden Erkrankungen, bisher ist die Funktion der PAS-Domänen jedoch nicht ausreichend geklärt.

## 1.7 Aufgabenstellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Dissertation von T. Kanacher [14, 15]. Hier wurde gezeigt, dass der Austausch der GAF-Domänen der CyaB1 durch ein Säuger-PDE-GAF-Tandem (rPDE2a) möglich ist. Diese Ergebnisse ließen hoffen, dass CyaB1 sich als Werkzeug zur isolierten Untersuchung von GAF-Domänen eignet. Die Funktionsfähigkeit des Austausches der GAF-Domänen aus CyaB1 durch rPDE2a warf allerdings neue Fragen auf:

Zum einen liegen die katalytischen Zentren aller bisher untersuchten Adenylatcyclasen als rotationssymmetrische, antiparallele Dimere vor, dies paßt nicht zur für die PDE2A-GAF-Domänen gefundenen Kristallstruktur [1], in der die PDE2A GAF-Domänen parallel vorliegen. Da aber die Chimäre aus rPDE2a GAFs und CyaB1 AC Aktivität zeigte [14], stellte sich die Frage, ob die PDE2A GAF-Domänen in Lösung so wie im Kristall vorliegen oder ob sie eine andere Anordnung einnehmen.

Aus diesem Grund war ein Ziel die Strukturaufklärung weiterer GAF-Domänen.

Die zweite Frage war, ob die CyaB1 auch zur Untersuchung weiterer GAF-Domänen geeignet ist. Dazu wurden zwei parallele Versuchsansätze gestartet.

Erstens: das CyaB2 Holoenzym hatte sich als instabil erwiesen, weshalb über eine CyaB2-GAF-CyaB1 AC-Chimäre versucht wurde, herauszufinden, ob auch die CyaB2-GAF-Domänen ohne Funktionsverlust bei Erhalt der cAMP-Stimulierbarkeit in die CyaB1 eingebaut werden können.

Zweitens: bisher war nur der Austausch der CyaB1 GAF-Domänen durch die ebenfalls über die GAF-B signalisierenden rPDE2a-GAFs untersucht worden, nun sollte geklärt werden, ob auch ein Austausch durch die GAF-Domänen der PDE5 möglich

ist. Bei PDE5 vermutet man eine Aktivierung über eine cGMP-Bindung an GAF-A [24]. In einer Chimäre mit CyaB1 muß das aktivierende Signal des cGMPs damit über einen weiteren Weg zum katalytischen Zentrum übertragen werden als in rPDE2a oder dem CyaB1 Holoenzym. Mit einer funktionsfähigen PDE5-CyaB1-Chimäre wäre außerdem eine isolierte Untersuchung der GAF-Domänen der pharmazeutisch interessanten PDE5 möglich.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage wie verschiedene GAF-Domänen Adenin und Guanin in cAMP bzw. cGMP spezifizieren. Hierzu wurde das CyaB1 Holoenzym als cAMP spezifisches Ausgangskonstrukt verwendet und hiervon Bereiche und einzelne Aminosäuren durch rPDE2a GAF B-Bereiche ersetzt. Ziel war die Umkehrung der Spezifität von cAMP zu cGMP. PDE2 GAF B wurde wegen der bekannten Kristallstruktur und vorhandenen Mutagenesestudien [1, 25] gewählt.



## 2 Material

### 2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

**AGS, Heidelberg** Restriktionsendonucleasen mit 10x-Puffern

**Altana Pharma GmbH, Konstanz** PDE-5-Hemmer Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil

**American National Can, Menasha (USA)** *Parafilm M*

**Amersham Bioscience, Buckinghamshire (UK)** [2,8-<sup>3</sup>H]-cAMP, [8-<sup>3</sup>H]-cGMP, *ECL Plus Western Blotting Detection System*, Hyperfilm-ECL, *Thermo-Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*, *OnePhorAll*-Puffer für Restriktionsendonucleasen

**AppliChem, Darmstadt** Acrylamid 4K-Lösung 30 % (37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung), HEPES

**Axygen Scientific, Union City (USA)** PCR Tubes, dünnwandig

**Becton Dickinson (BD) AG, Basel (Schweiz)** Falcon Tubes 15 und 50 ml, Syringe Einmalspritzen 10 ml, 50 ml

**BIO RAD, München** *BIO-RAD Proteinassay-Reagenz*, *Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose*

**Biozym Diagnostics, Hess. Oldendorf** *Sequagel XR*, *ultrapure* von National Diagnostics, Atlanta (USA), *Chill-Out 14 Liquid Wax* von MJ Research, *Sequagel Complete Buffer Reagent*

**Braun AG, Melsungen** Einmal-Injektionskanülen *Sterican*, *Discofix-3-Wege-Hähne*

**Dianova, Hamburg** Sekundärer Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase

**Fluka BioChemika, Buchs (Schweiz)** Natriumdodecylsulfat (SDS), Formamid, 3',5'-cAMP, Glucose, Glutaraldehyd-Lösung

**Fortuna** Pasteur-Pipetten

**Gibco-BRL-Life-Technologies, Eggenstein** LB-Agar

**Greiner Labortechnik, Nürtingen** Gewebekulturschalen, Petrischalen, steril

- Hartman Analytik, Braunschweig** Radionukleotide [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP, [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP
- ICN Biomedicals, Aurora (Ohio, USA)** Ethidiumbromid-Tabletten
- Kimberly-Clark, Roswell (USA)** *Safeskin Satin Plus*-Latex-Untersuchungshandschuhe, *Kimtech<sup>Science</sup>*-Präzisionswischtücher
- Kodak** Röntgenfilme Biomax MR
- Macherey-Nagel, Düren** *Nucleotrap-Kit*, Blotmembran *porablot PVDF* (2  $\mu\text{m}$  Porenweite)
- Merck, Darmstadt** Aluminiumoxid 90 % aktiv, Ethanol, Methanol, 2-Mercaptoethanol, DMSO, Harnstoff, Natriumpyrophosphat, Natriumchlorid, Trichloressigsäure, Chloroform, Imidazol, Glycerin 87%, Essigsäure 100%, alle nicht aufgeführten Chemikalien in *p.a.* Qualität
- MWG-Biotech GmbH, Ebersberg** Oligonucleotide (PCR-Primer und Fluoreszenzmarkierte Sequenzier-Primer [5'-IRD 800-Markierung])
- New England Biolabs (NEB), Frankfurt a. M.** Restriktionsendonukleasen mit 10 x Reaktionspuffern, *T4-Polynucleotid-Kinase*, BSA 100x für Molekularbiologie, PKA (*cAMP-abhängige Proteinkinase, katalyt. Untereinheit*) und Puffer, Ligase
- Novagen, R&D Systems, Wiesbaden** pET16b-Expressionsvektor, *E. coli BL21(DE3)* [*pLysS*] und [*pRep4*]-Zellen
- Pall Corporation, Ann Arbor (USA)** *NANOSEP 10K OMEGA*-Proteinkonzentratoren
- PeqLab, Erlangen** peqGOLD-Agarose, peqGOLD-Protein Marker
- Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston (USA)** *Ultima Gold XR*-LSC-Szintillator, Super Polyethylene Vials, 20 ml
- Promega, Madison (USA)** *Wizard Plus Plasmid Purification Kit (Minipreps)*, Pfu-DNA-Polymerase
- Qbiogene, Heidelberg** *Taq*-Polymerase mit Reaktionspuffer
- Qiagen, Hilden** *pQE30*-Expressionsvektor, *pRep4*,  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose, monoklonale Antikörper (*anti-RGS(His)<sub>4</sub>* und *Tetra-His*), *Taq*-DNA-Polymerase
- Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Basel** Restriktionsendonucleasen mit 10x Puffern, Alkalische Phosphatase, Klenow-Polymerase, *Rapid DNA Ligation Kit*,  $\lambda$ -DNA, ATP, dNTPs, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, *Complete-EDTA-free*-Proteaseinhibitortabletten, *Quick-Spin Columns (Sephadex G-50 (fine)) for radiolabeled DNA Purification*

**Roth, Karlsruhe** Brilliantblau R250 und G250, Glycin, Ampicillin, Kanamycin

**Serva, Heidelberg** TES, *Visking Dialyse*-Schlauch 8/32 (Durchmesser 6mm)

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim und Seelze** Ethanol absolut, Glycerin 99%, Trichloressigsäure, IPTG, X-Gal, Monothioglycerol, Ponceau S, Tris-Base, EDTA, TEMED, Bis-Tris, MOPS, Triethanolamin, Tween 20, Dowex 50WX4-400, LB-Agar Fertigpulver, LB-Broth-Fertigpulver, Harnstoff, DMSO, BSA, Tetracyclin, Bromphenolblau, APS

**SLG, LP Italiana, Mailand (Italien)** Einmalpipetten 10 ml, 25 ml

**Stratagene, Heidelberg** pBluescript II SK(-)-Klonierungsvektor, pBluescript(+), *E. coli* XL1-*Blue*-Zellen

**Vetter, Entringen** Pipettenspitzen, Eppicups und sonstiges Plastik-Verbrauchsmaterial

**Whatman International Ltd, Maidstone (England)** *Whatman 3 MM Chr 190 mm x 100 m*-Chromatography Paper

## 2.2 Geräte

**Amersham Pharmacia, Freiburg** Elektrophorese-Spannungsquellen *EPS 301*, *EPS 601*, *Macrodrive 1 Powersupply 2301 (LKB Bromma)*, *Liquid Scintillation Counter Rackbeta 1209* (LKB Wallac), *AKTA-FPLC-Proteinreinigungsanlage* mit Zubehör und Säulen, *Hoefer Mighty Small SE245-Gelgießapparatur* für 8x7 cm Gele, *Mighty Small II-Gellaufkammer*, Käämme und Spacer

**Beckmann, München** Ultrazentrifuge *Optima L-60*, Rotor *Ti50.2*

**Bender & Hobein, München, Zürich, Ulm** *Vortex Genie 2*

**Berthold** Hand-Fuß-Monitor *LB 1043 B*

**Biometra, Göttingen** TRIO-Thermoblock *Thermocycler* und beheizbare Deckel *TRIO Heated Lid* für TRIO-Thermoblock

**BIO RAD, München** Blotapparatur *Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell*

**Branson, Danbury (USA)** Ultraschallbad *Bransonic B12*, Ultraschallsonde *Sonifier B-12*

**Braun, Melsungen** Glashomogenisatoren

**Bühler, Tübingen** KL-2-Laborschüttler

**Ceag Schirp (CS) Reinraumtechnik, Bork-Westfalen** *Envirco*-Cleanbench

- Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Werkstatt Pharmazie** Flachbett-Gelelektrophoresekammern, Kämme und Spacer für SDS-Gel-Elektrophorese
- Eppendorf, Hamburg** Thermo-Heizblock 3401 und 5320, Thermomixer 5436, Thermostat 5320, Tischzentrifugen 3200 und 5414 und *mini spin*, Kühlzentrifuge 5402, Zentrifuge *Hermle ZK 401*, *BioPhotometer*, Pipetten *Research* (0,1–2,5  $\mu\text{l}$ , 10–100  $\mu\text{l}$ , 100–1000  $\mu\text{l}$ ), *Reference* (0,5–10  $\mu\text{l}$ ), *Multipette plus*
- Fröbel, Lindau** Consort *Microcomputer Elektrophoresis Power Supply E411*
- Gilson** Pipetten 1–20  $\mu\text{l}$ , 20–200  $\mu\text{l}$
- Haake, Berlin** GH Heiz-/Kühlwasserbad, D8 Thermostatfühler und -regler
- Heidolph** *MR 2002* Laborrührer
- Heinemann, Schwäbisch Gmünd** *FRENCH-PRESS*-Presse, *AMINCO*-Zylinder (Aufschlusszellen), Nylon-Kugeln und Rückhalteringe für *FRENCH-PRESS*
- Heraeus-Christ, Osterode, Fellbach** *Megafuge 1.0R (BS 4402/A)*, *Varifuge 3.0*, *Laminair HLB2448*
- Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt** *Pipetus-akku*-Pipettierhilfe
- H.Saur Laborbedarf, Reutlingen** Vakuumpzentrifuge *Typ BA-VC-300H*, *Bachofer-Vacuum-Concentrator (Speedvac)*
- Idaho Technology, Idaho Falls (USA)** *Kapillar Air Thermocycler 1605*
- Infors AG, Bottmingen (Schweiz)** *Unitron*-Kühlbrutschrank, HT-Wasserbad-Kühlschüttler
- Kontron-Hermle, Gosheim** *Centrikon H401 und ZK401*, Rotoren *A6.14 (SS34)* und *A8.24*
- KSG Sterilisatoren, Olching** Hochdruckdampf-Sterilisator *KSG 40-2-1*
- Liebherr** Kühlschränke, z.B. *Premium no-frost*
- LTF Labortechnik, Wasserburg** Videoprinter *Mitsubishi Video Copy Processor P91* mit *Sony CCD Video Camera Modul XC-ST500E*, Thermopapier *K65HM*, Software *BioCapt Version 99.01s*
- Metrohm, Herisau (Schweiz)** pH-Meter *E512 und 605*
- Mettler-Toledo, Steinbach** Waage *Mettler PL 200* (Tischwaage), pH-Elektrode *Inlab 423*

**Millipore, Molsheim (Frankreich)** Reinstwasseranlage *MilliQ*, Vorreinigungsanlage *Elix* mit *QuantumX*-Patronen

**Moulinex (Frankreich)** Mikrowellengeräte *Micro Chef FM B 935 Q & Compact Y 53*

**MWG, Ebersberg** *LI-COR DNA sequencer model 400*, *BaseImagIR version 4.0* Software

**PeqLab, Erlangen** *Thriller*-Schüttel-Kühl- und Heizblock

**Promega, Madison (USA)** *Vac-Man* (Vakuumanchlüsse zur Plasmidpräparation), *Wizard Minicolumns* (zur Proteinreinigung)

**Radiometer, Kopenhagen (DK)** Leitfähigkeitsmessgerät *CDM 2F* mit Zelle *CDC 114*

**Sartorius, Göttingen** Analysenwaage *handy*, Tischwaage *BP 2100 S*, Sterilfilter (0,22  $\mu\text{m}$ ), HAWP Filter (0,45  $\mu\text{m}$ )

**Schott** Glasgeräte

**Scotsman** *AF 100*-Eismaschine

**Techne, Princeton (USA)** *DRI-Block DB 2D*-Heizblöcke

**TPP, Schweiz** Zentrifugenröhrchen 50 ml

**Vetter, Wiesloch** UV-Kontaktlampe *Chroma 43*

**Wolf, Geislingen** Tischaufoklav *Sanoclav*

**WTB Binder, Tuttlingen** Kühlbrutschrank *KB 240*, Wärmeschränke

**Zeiss, Oberkochen** UV-Spektrometer *PM6*

## 2.3 Oligonukleotide (Primer)

### 2.3.1 Sequenzier-Primer

Durch PCR eingeführte Schnittstellen und zur Einführung von Mutationen veränderten Basen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet.

Name	Richtung	T <sub>Annealing</sub>	Sequenz (5' → 3')	Position	Beschreibung
Sequenzierprimer, IRD 800 markiert					
T3	s	56°C	aat taa ccc tca cta aag gg	772–791	<i>pBluescript II SK(-)</i>
T7	as	56°C	taa tac gac tca cta tag gg	626–645	<i>pBluescript II SK(-)</i>
U-pQE-IR	s	54°C	gaa ttc att aaa gag gag aaa	88–108	<i>pQE30</i>
R-pQE-IR	as	54°C	cat tac tgg atc tat caa cag g	212–233	<i>pQE30</i>
R-800-pETMCS-pQE30	as	56°C	acc cct caa gac ccg ttt aga	5423–5443	<i>pET16b mit MCS pQE30</i>
U-IR-800 CyaB1-PAS2	s	56°C	gct tgt cag atg ctg taa ttt c	1190–1211	<i>cyaB1 Holo</i>
R-IR-800 CyaB1-GAF	as	56°C	act ttt atg att agc atc acc	1279–1299	<i>cyaB1 Holo</i>
U-IR-800 CyaB1-Kat	s	56°C	gat gcc tta atg gtt ggt g	1768–1786	<i>cyaB1 Holo</i>
U-IR-800 PDE5 GAF	s	56°C	cat gat gaa ggg gac cag tgc t	427–448	<i>PDE5 Holo</i>

### 2.3.2 Klonierungsprimer

Name	Position	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Klonierungsprimer in <i>CyaB1</i> für verschiedene Konstrukte			
CyaB1-MfeI(as)	1343–1360	aaa $\overline{CAA TTG}$ gta caa ttt ccc	Mfe I
EcoRI wt(s)	362–382	aaa $\overline{GAA TTC}$ ctg gtc atg ttg cta	EcoR I
EcoRV wt(as)	1817–1836	aaa ggt gta gcc tcg $\overline{GAT ATC}$ tg	EcoR V
NheI (as)	1060–1077	aaa $\overline{GCT AGC}$ cgt aaa act tcc	Nhe I (von T.Kanacher)
PinAI wt(s)	541–570	aa $\overline{ACC GGT}$ aat ata ccc ttc aat cga aat gat	PinA I (von T.Kanacher)

Name	Position	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Klonierungsprimer für <i>PDE5 GAF-Konstrukte</i>			
PDE5 BglII(s)	1–18	aaa <u>AGA TCT</u> atg gag cgg gcc ggc ccc	Bgl II
PDE5 SalI(as)	1522–1539	aaa <u>GTC GAC</u> ctc cac tgc ttc ata cat	Sal I
PDE5 XbaI(s)	1019–1040	aaa <u>TCT AGA</u> agt aat ttt gaa gaa aat	Xba I
PDE5 XbaI(as)	1020–1037	aaa <u>TCT AGA</u> gat tgt tgt tct tca aaa	Xba I
P5-D299A(s)	886–911	act gaa aaa gCt gaa aag gac ttt gc	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5-D299A(as)	886–911	gca aag tcc ttt tca Gct ttt tca gt	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5-D488A ohne Hind(s)	1460–1491	atg Ccg aac agt ttc tgg aGg ctt ttg tca tc	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5-D488A2 o. Hind(as)	1452–1483	aag cCt cca gaa act gtt cgG cat ttc ggt tg	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5GAF K287A(s)	849–875	ggc cat caa cGC gaa atc agg aaa cgg	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5GAF K287A(as)	849–875	ccg ttt cct gat ttc GCg ttg atg gcc	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5GAF K473A(s)	1408–1433	ctt gtt aat GCg atg gag gag aat ac	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5GAF K473A(as)	1408–1433	gta ttc tcc tcc atc GCa tta aca ag	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5-S102DA wobble(s)	293–319	cca gga aaa tcG (G/T)tg cct ctg aat ttg	wobble-Mutageneseprimer für Fusions-PCR
P5-S102DA wobble(as)	293–319	caa att cag agg ca(G/T) Cga ttt tcc tgg	wobble-Mutageneseprimer für Fusions-PCR
PDE5 V30 BglIII(s)	88–108	aaa <u>AGA TCT</u> gtc gaa gca tgg ctg gac gat	N-term. Verkürzung: Bgl II
PDE5 I72 BglIII(s)	214–234	aaa <u>AGA TCT</u> atc aga ggc cac acc gaa tct	N-term. Verkürzung: Bgl II
PDE5 P87 BglIII(s)	259–279	aaa <u>AGA TCT</u> cct cgt gca gat aac agt gtc	N-term. Verkürzung: Bgl II
PDE5 I101 BglIII(s)	301–321	aaa <u>AGA TCT</u> atc tct gcc tct gaa ttt gac	N-term. Verkürzung: Bgl II

Name	Position	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Klonierungsprimer für <i>PDE5 GAF</i> -Konstrukte			
PDE5 P109 BglII(s)	325–345	aaa $\overline{AGA TCT}$ cct ctt aga ccc att ggt gtc	N-term. Verkürzung: Bgl II
PDE5 T121 BglII(s)	361–381	aaa $\overline{AGA TCT}$ act gtg agc ttc ctc tct gac	N-term. Verkürzung: Bgl II
PDE5 kurz BglII(s)	442–462	aaa $\overline{AGA TCT}$ cag tgc tca aga ctc ttg gaa	N-term. Verkürzung: Bgl II

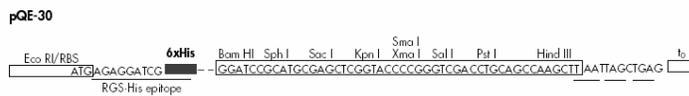
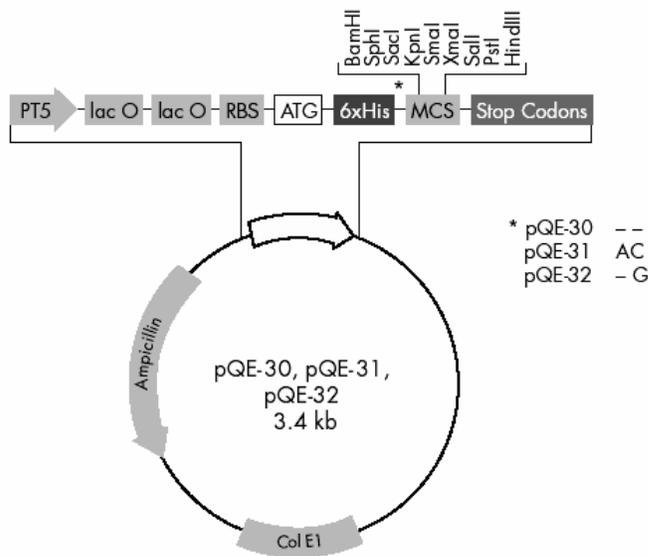
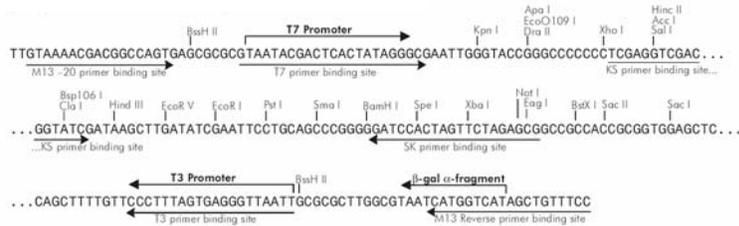
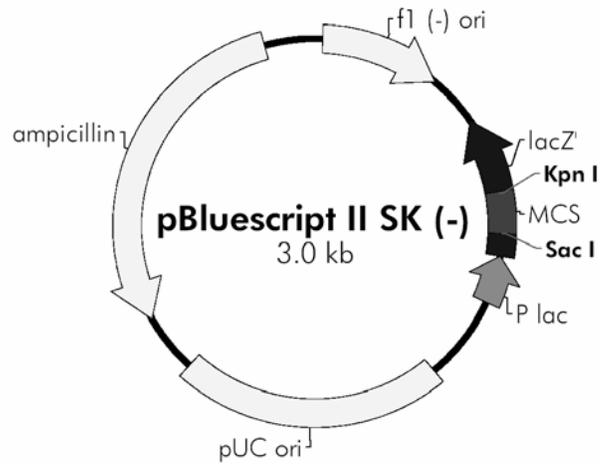
Name	Position	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Klonierungsprimer für <i>CyaB2-CyaB1</i> -Konstrukte			
CyaB2-BamHI (s)	1–18	aaa $\overline{GGA TCC}$ atg tca ttg caa cag cgt	BamHI von J. Linder
CyaB2-XbaI (s)	813–837	aaa $\overline{TCT AGA}$ aga tac cct caa acg ggt a	Xba I
CyaB2-XbaI (as)	796–818	aaa $\overline{TCT AGA}$ tcc aga cta ctt tgg ct	Xba I
CyaB2-XhoI (as)	1306–1323	aaa $\overline{CTC GAG}$ ctt gac tgt ggc aaa caa	Xho I
anaB2-224-DA MfeI (as)	662–681	aa $\overline{CAA TTG}$ ctc aGc tgc act gg	Mfe I
anaB2-419-DA EcoRI (as)	1237–1257	aa $\overline{GAA TTC}$ ttc gGc gtt gcg gtc	EcoRI entspr. D416A
CyaB2-GAFcr. NcoI (s)	172–189	aaa $\overline{CCA TGG}$ tta cag aag tgc agc aa	NcoI für Kristall. der GAFs
CyaB2-GAFcr. BamHI (as)	1315–1335	aaa $\overline{GGA TCC}$ ttg ctc ttg ttg ctt gac tgt	BamHI für Kristall. der GAFs
anaB2GAFa verk (s)	592–603 [Δ 604–645] 646–663	ctc aac aaa tta [Δ 42BP] gat aat caa ggt ttt acc	Verkürzung GAF A um 14 AS
anaB2GAFa verk (as)	586–603 [Δ 604–645] 646–657	acc ttg att atc [Δ 42BP] taa ttt gtt gag taa ctg	Verkürzung GAF A um 14 AS
anaB2GAFb verk (as)	1141–1161 [Δ 1162 –1221; +3] 1222–1257	aaa $\overline{GAA TTC}$ ttc gtc gtt gcg gtc aaa act cgc ttg gaa [Δ 60BP + 3BP] TCC ttt att tac cag ttg ggt cac	EcoR I Verkürzung GAF B um 20 AS + 1 G

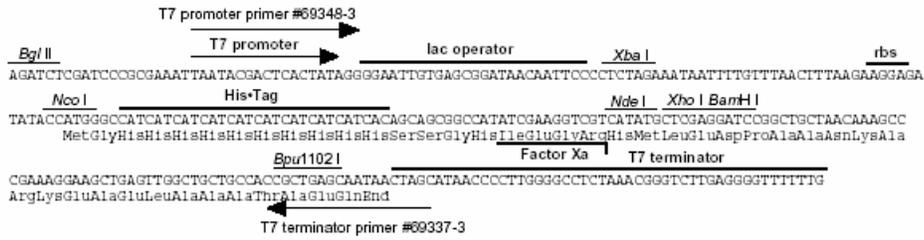
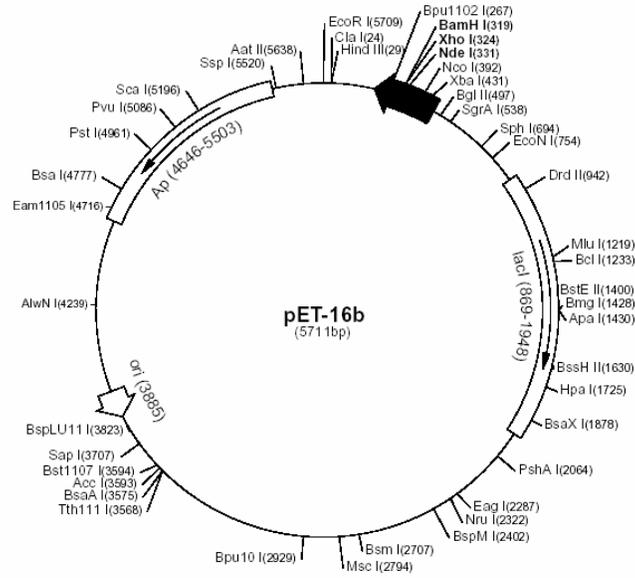
Name	Position	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Klonierungsprimer für <i>AR-EL-EIRIP-PDE2-CyaB1 GAF</i> -Konstrukte			
QNEL-SacI (as)	766-807	aaa <u>GAG CTC</u> ATT CTG gcg ata cag aaa taa tgt gct gcg	Sac I
QEMNEL-SacI (as)	766-807	aaa <u>GAG CTC</u> ATT CAT TTC CTG gcg ata cag aaa taa tgt gct gcg	Sac I
LDQNEL-SacI (as)	766-807	aaa <u>GAG CTC</u> ATT CTG ATC CAG cag aaa taa tgt gct gcg	Sac I
SVFLLDQNEL-SacI (as)	754-807	aaa <u>GAG CTC</u> ATT CTG ATC CAG CAG GAA CAC GGA gct gcg gtc tgc ctg cat	Sac I
SL-CyaB1-ELSacI (as)	760-807	aaa <u>GAG CTC</u> gcc cat ttc ttt gcg ata cag aaa taa GGA gct gcg gtc tgc	Sac I
TV-CyaB1-ELSacI (as)	763-807	aaa <u>GAG CTC</u> gcc cat ttc ttt gcg ata cag aaa CAC tgt gct gcg gtc	Sac I
SV-CyaB1-ELSacI (as)	760-807	aaa <u>GAG CTC</u> gcc cat ttc ttt gcg ata cag aaa CAC GGA gct gcg gtc tgc	Sac I
EcoRI TQL (as)	823-865	aaa <u>GAA TTC</u> gga tct cat aTA ACT GTG Tca cta cac cgc cat c	EcoR I
SacI CyaB1-FDG (s)	802-843	aaa <u>GAG CTC</u> tgg act aaa gta TTC GAT GGC gca gat acc aca cag	Sac I
SacI-EL-AAA- EIRIP (s)	802-843	aaa <u>GAG CTC</u> gtt gcc aag gtg GCA GCA GCA ggt gta gtg gac gat	Sac I
Y490A (s)	961-986	gac aga aaa aca ggc GCT ttg acc ag	Mutageneseprimer für Fusions-PCR (Y490 real Position Y325)
Y490A (as)	961-986	ctg gtc aaA GCg cct gtt ttt ctg tc	Mutageneseprimer für Fusions-PCR (Y490 real Position Y325)
VA270-271WT (s)	796-823	atg ggc gag ctc TGG Acc aag gtg ttc g	Mutageneseprimer für Fusions-PCR
VA-FD_WT-AA (as)	796-836	act aca ccg cca Gcg GCc acc ttg gTC CAg agc tgc ccc at	Mutageneseprimer für Fusions-PCR

Name	Position	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Klonierungsprimer für <i>AR-EL-EIRIP-CyaB1 in PDE2 GAF-CyaB1</i> -Konstrukte			
PDE2-EcoRI (as)	844-857 in CyaB1 1342-1350 in rPDE2a	GTC CGC AGG AAT TCg aat ttc tat taa	Mutageneseprimer zur Einführung von AR-EIRIP aus CyaB1 in PDE2 GAFs
CyaB1-EcoRI (s)	1342-1355 in rPDE2a 846-857 in CyaB1	AAT AGA AAT TCG AAT TCc tgc gga cca agg	Mutageneseprimer zur Einführung von AR-EIRIP aus CyaB1 in PDE2 GAFs
CyaB1-BssHII (as)	1213-1226 in rPDE2a 748-759 in CyaB1	CTG CAT CAA AAT GCG CGC ctc tgt gat gat	Mutageneseprimer zur Einführung von AR-EIRIP aus CyaB1 in PDE2 GAFs
PDE2-BssHII (s)	748-762 in CyaB1 1215-1226 in rPDE2a	CAT CAC AGA GGC GCG C at ttt gat gca ggc a	Mutageneseprimer zur Einführung von AR-EIRIP aus CyaB1 in PDE2 GAFs

## 2.4 Verwendete Plasmide

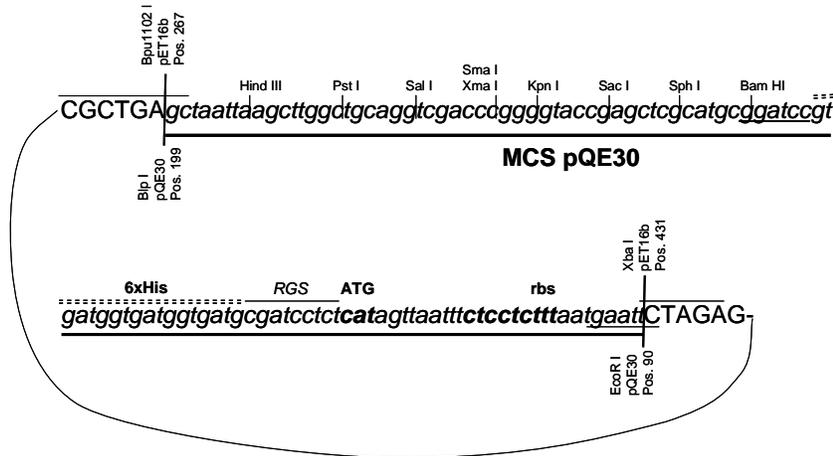
Die Beschreibung der Plasmide findet sich an entsprechender Stelle im Text.





pET-16b cloning/expression region

**pET16b mit MCS pQE30 – Klonierungsvektor (5634 BP)**



5634BP

## 2.5 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung aller Lösungen wurde *MilliQ*-Wasser verwendet, pH-Werte wurden bei Raumtemperatur eingestellt (wenn nicht anders angegeben).

### 2.5.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Alle Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden wurden sterilfiltriert (0,2  $\mu\text{m}$  Porenweite) oder autoklaviert (20 min, 121°C, 2 bar).

#### 2.5.1.1 Lösungen zum Arbeiten mit DNA

##### *TAE-Puffer*

40 mM Tris/Acetat, pH 8,0  
1 mM EDTA

##### *BX-Probenpuffer*

1x TAE  
0,5% Bromphenolblau  
0,5% Xylencyanol  
5% Glycerol

##### *TBE-Puffer, 10x (LI-COR)*

1,34 mM Tris  
440 mM Borsäure  
25 mM EDTA

##### *TE-Puffer [10/1] bzw. [10/0,2]*

10 mM/ 10 mM Tris/HCl,  
pH 7,5  
1 mM/ 0,2 mM EDTA

##### *CM-Puffer, 10x*

100 mM  $\text{CaCl}_2$   
100 mM  $\text{MgCl}_2$

##### *Dephosphorylierungspuffer, 10x*

500 mM Tris/HCl, pH 8,5  
1 mM EDTA

##### *dNTPs*

20 mM pro dNTP

##### *Klenowpuffer, 10x, BSA-frei*

200 mM Tris/HCl pH 7,9  
60 mM  $\text{MgCl}_2$   
10 mM Dithiothreitol  
5% BSA, frisch zuzugeben

#### 2.5.1.2 Nährmedien für *E.coli*

##### *LB-Medium*

20 g/l LB Broth-Pulver

##### *LB-Plattenagar*

35 g/l LB Agar-Pulver

##### *LB-Plattenagar mit Antibiotika*

100  $\mu\text{g}$  Ampicillin/ml Plattenagar  
und/oder  
50  $\mu\text{g}$  Kanamycin/ml Plattenagar  
und/oder  
10  $\mu\text{g}$  Tetracyclin/ml Plattenagar

<i>LB-Medium mit Antibiotika</i>		<i>LB-Medium für Dauerkulturen</i>
100 µg Ampicillin/ml LB-Medium und/oder		20 g/l LB Broth-Pulver
50 µg Kanamycin/ml LB-Medium und/oder		28,7% Glycerol [V/V]
10 µg Tetracyclin/ml LB-Medium		

---

## 2.5.2 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie

### 2.5.2.1 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

<i>Trenngelpuffer (4-fach)</i>		<i>Hoefler-Laufpuffer</i>
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8		25 mM Tris
0,4% SDS		192 mM Glycin
		0,1% SDS
<i>Sammelgelpuffer (4-fach)</i>		<i>Coomassie-Färbelösung</i>
500 mM Tris/HCl, pH 6,8		0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250
0,4% SDS		1% Essigsäure
<i>Proben-Puffer (4-fach)</i>		40% Methanol
130 mM Tris/HCl, pH 6,8		
10% SDS		<i>Entfärber</i>
10% β-Mercaptoethanol		7,5% Essigsäure, 100%
20% Glycerol		30% Ethanol
0,06% Bromphenolblau		

---

### 2.5.2.2 Westernblotting und verwendete Antikörper

<i>Transferpuffer nach Towbin [100]</i>		<i>TBS-Puffer</i>
25 mM Tris/HCl		20 mM Tris/HCl, pH 7,6
192 mM Glycin		0,8% NaCl
20% Methanol		
<i>M-TBS</i>		<i>TBS-T</i>
5% Milchpulver in TBS-Puffer		0,1% Tween 20 in TBS-Puffer
		<i>M-TBS-T</i>
		5% Milchpulver
		0,1% Tween 20 in TBS-Puffer

*primäre Antikörper*

RGS-(His) <sub>4</sub> -Antikörper	monoklonaler Antikörper der Firma Qiagen Verdünnung 0,04-0,2 µg/ml M-TBS-T
Tetra-His-Antikörper	monoklonaler Antikörper der Firma Qiagen Verdünnung 0,1 µg/ml M-TBS-T

*sekundäre Antikörper*

Ziege-anti-Maus, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	polyklonaler Antikörper der Firma Dianova Verdünnung 1:5000 in M-TBS-T
---	--

**2.5.2.3 Puffer für Zellernte und Proteinreinigung an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose**

Die pH-Werte aller Lösungen wurden bei 4°C eingestellt und die Lösungen bei 4°C verwendet.

*Pelletwaschpuffer*

50 mM Tris/HCl, pH 8,5

*Zellysepuffer*

50 mM Tris/HCl, pH 8,5

50 mM NaCl

20% Glycerin 87%

optional *Complete-EDTA-free-*  
Protease-Inhibitor-  
tabletten von Roche  
(1 Tablette auf 50 ml)

optional 7,5 mM Imidazol, pH 8,5

*Waschpuffer A*

50 mM Tris/HCl, pH 8,5

400 mM NaCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

7,5 mM Imidazol, pH 8,5

20% Glycerin 100%

*Waschpuffer B*

50 mM Tris/HCl, pH 8,5

400 mM NaCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

15 mM Imidazol, pH 8,5

20% Glycerin 100%

*Waschpuffer C*

50 mM Tris/HCl, pH 8,5

10 mM NaCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

15 mM Imidazol, pH 8,5

20% Glycerin 100%

*Waschpuffer D*

50 mM Tris/HCl, pH 8,5

10 mM NaCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM Imidazol, pH 8,5

20% Glycerin 100%

*Waschpuffer E*

50 mM	Tris/HCl, pH 8,5
10 mM	NaCl
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
25 mM	Imidazol, pH 8,5
20%	Glycerin 100%

*Dialysepuffer, Proteinlagerungspuffer  
(-20° C)*

50 mM	Tris/HCl, pH 8,5
10 mM	NaCl
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
35%	Glycerin 100%

*Elutionspuffer*

50 mM	Tris/HCl, pH 8,5
10 mM	NaCl
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
300 mM	Imidazol, pH 8,5 (oder
200, 400, 600 mM	Imidazol, pH 8,5)
20%	Glycerin 100%

---

**2.5.2.4 Puffer und Lösungen für Adenylatcyclase-Enzymtests**

*Stopp-Puffer*

3 mM	cAMP
3 mM	ATP
1,5%	SDS
	NaOH auf pH 7,5

*AC-Cocktail, 2x*

43,5%	Glycerin
100 mM	Tris/HCl, pH 7,5 bzw. andere Puffer für pH-Abhängigkeit
20 mM	MgCl <sub>2</sub>
optional <sup>a</sup>	
für regenerierendes	
System	0,46 mg/2 ml Creatinkinase und 6 mM Kreatinphosphat

<sup>3</sup>H-cAMP-interner Standard <sup>b</sup>

20 mM	cAMP
	inklusive 10–20 kBq/ml [2,8- <sup>3</sup> H-cAMP]
	plus Tris-Lösung auf pH 7,5

---

<sup>a</sup>nur bei ungereinigtem Zellysat

<sup>b</sup>wurde wegen allosterischer Aktivierung der untersuchten Proteine erst nach dem Stopp-Puffer zugegeben

*ATP-Substrat-Lösung, 10x*750  $\mu\text{M}$  ATP, pH 7,5

für Kinetik:

200  $\mu\text{M}$  ATP, pH 7,51,5 mM ATP, pH 7,5 je inkl. 16–30 kBq [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP*Nucleotidlösungen zur allosterischen Aktivierung*10  $\mu\text{M}$  cAMP bzw. cGMP-Lösung, bzw.100  $\mu\text{M}$  cAMP bzw. cGMP-Lösung, bzw.

1 mM cAMP bzw. cGMP-Lösung, bzw.

40 mM cAMP bzw. cGMP-Lösung  
pH 7,5

---

**2.5.2.5 weitere Puffer***Bindungspuffer für Nucleotid-Bindungstests*

10 mM Tris/HCl, pH 8,5, 4°C

1 mM EDTA (optional)

*[2,8- $^3\text{H}$ -cAMP]-und [8- $^3\text{H}$ -cGMP]-Stocks für Bindungsassay*0,4  $\mu\text{M}$  cAMP bzw. cGMP bzw.4  $\mu\text{M}$  cAMP bzw. cGMP, bzw.40  $\mu\text{M}$  cAMP bzw. cGMP, bzw. inkl. [2,8- $^3\text{H}$ -cAMP] 0,6–6,2 kBq/ $\mu\text{l}$  bzw.100  $\mu\text{M}$  cAMP bzw. cGMP inkl. [8- $^3\text{H}$ -cGMP] 0,2–22,4 kBq/ $\mu\text{l}$ *Phosphorylierungspuffer für GAF-Domänen durch PKA, katalyt. Einheit*0,5  $\mu\text{M}$  zu untersuchendes Protein

1x PKA-Puffer

2 mM ATP, pH 7,5

0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA

---



# 3 Methoden

## 3.1 Gentechnologische Methoden

### 3.1.1 Plasmidisolierung aus E.coli (Miniprep)

Einzelklone oder bereits existierende Dauerkulturen wurden in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und für 8–20h bei 37°C unter Schütteln hochgezogen. Durch Zentrifugation von 3–5 ml der Kultur erhielt man genügend Zellen für die Plasmidpräparation. Die Isolierung und Reinigung der Plasmide erfolgte gemäß der Vorschrift des verwendeten *Wizard-Plus-Plasmid-Purification-Kits*. Die DNA wurde mit 50–100  $\mu$ l TE-Puffer [10 mM Tris/HCl und 0,2 mM EDTA] oder Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

### 3.1.2 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte oder mit Restriktionsendonucleasen verdaute DNA wurde zu Kontrollzwecken oder zur Reinigung mit ca. 1/4 Volumen *BX-Puffer* versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 80 – 105 V 30-60 min in *TAE-Puffer*, 1x aufgetrennt. Der Agarosegehalt des Gels richtete sich nach den aufzutrennenden Fragmentgrößen.

$\geq 800$ bp	1%
500–1000 bp	2%
$\leq 500$ bp	4%

Für die Gelherstellung wurde Agarose in 50–60 ml TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle aufgeschmolzen, beim Abkühlen bildete sich die Gelstruktur aus. Als DNA-Marker dienten  $\lambda$ -DNA (*EcoR* I–*HinD* III verdaut) und pBluescript II SK(–) (*Msp* I–*Ssp* I verdaut) (siehe Tabelle 3.1).

Zur Detektion wurde das Gel 1–2 min im Ethidiumbromidbad (10  $\mu$ g/100 ml Wasser) gefärbt und nach weiteren 10 min Elektrophorese bei UV-Licht ( $\lambda = 302$  nm) betrachtet. Über ein Videoprintersystem wurden die erhaltenen Bandenmuster dokumentiert.

$\lambda$ -DNA ( <i>Eco</i> R I/ <i>Hin</i> D III)	pBluescript II SK(-) ( <i>Msp</i> I/ <i>Ssp</i> I)
21226	489
5148	404
4973	312
4268	270
3530	242/241
2027	215
1904	190
1584	157
1375	147
947	110
831	67
564	57
125	34
Alle Angaben in [bp]	26

**Tab. 3.1:** DNA-Größenmarker für Agarose-Gelelektrophorese

### 3.1.3 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gem. Herstellerangaben mit dem *NucleoTrap-Kit* (Macherey-Nagel) gereinigt. Zur Elution wurden 20–50  $\mu$ l Wasser verwendet. Die Fragmente wurden im Kühlschrank bei 4°C (wenn *überhängende* Enden vorliegen) bzw. bei -20°C (wenn *glatte* Enden vorliegen) gelagert.

### 3.1.4 Reinigung, Entsalzung und Konzentrierung von DNA

#### 3.1.4.1 Entsalzung durch NucleoTrap-Kit

Mit dem unter 3.1.3 beschriebenen Kit konnte DNA-Lösung auch entsalzt werden, falls die DNA zur weiteren Bearbeitung (z.B. Mehrfachverdau in anderem Puffer, Ligation) umgepuffert werden sollte. Hierfür lieferte der Hersteller ein leicht verkürztes Protokoll. Die Elution und Lagerung erfolgte wie unter 3.1.3 beschrieben.

#### 3.1.4.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Vor allem nach der Präparation von Plasmid-DNA aus *BL21(DE3)[pRep4]*-Zellen war es nötig, Proteine (i.d.R. Enzyme, DNAsen) von der wäßrigen DNA-Lösung abzutrennen. Dazu wurde die DNA zunächst auf ein Volumen von 200–300  $\mu$ l mit Wasser aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50+49+1)

ausgeschüttelt (ca. 60 sec. vortexen). Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation für 60 sec. bei  $12\,000\times g$  beschleunigt. Danach befand sich das Protein an der Phasengrenzschicht (weiße „Haut“). Die wäßrige Oberphase wurde abpipettiert und, um Phenolreste zu entfernen, 2x mit je  $200\ \mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthielt die vom Protein befreite DNA, die noch durch *Ethanol-fällung* konzentriert werden mußte.

### 3.1.4.3 Ethanol-Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 37,5% ihres Volumens an Ammoniumacetat-Lösung (10 M) und dem 2,5fachen des bisherigen Volumens an eiskaltem Ethanol (96%) versetzt. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz zur Ausbildung des Niederschlags mindestens 30 min bei RT (oder 20 min bei  $-20^\circ\text{C}$ ) gehalten. Anschließend wurde für 15 min bei  $15\,000\times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, der Niederschlag mit  $500\ \mu\text{l}$  eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und erneut wie vorher zentrifugiert. Nach Trocknen des Niederschlags in der Vakuumzentrifuge wurde der DNA-Niederschlag in 20–40  $\mu\text{l}$  Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

### 3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei  $\lambda = 260\ \text{nm}$  bestimmt. Folgende Formel ergab die Konzentration  $c$  in  $[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ :

$$c = E_{260\ \text{nm}} \cdot f \cdot \text{Verdünnung}$$

$$f = 0,02 \text{ (bei Oligonukleotiden, Einzelstrang-DNA)}$$

$$f = 0,04 \text{ (bei Plasmiden, Doppelstrang-DNA)}$$

Zusätzlich wurde bei  $\lambda = 280\ \text{nm}$  auf Proteinanwesenheit geprüft. Wenn das Verhältnis von  $E_{260\ \text{nm}}/E_{280\ \text{nm}}$  über 1,8 lag, konnte man davon ausgehen, dass die DNA ausreichend gereinigt war.

Auch eine Abschätzung der DNA-Menge über einen Intensitätsvergleich der mit Ethidiumbromid gefärbten Banden zu DNA-Standards wurde, insbesondere vor Ligationen (3.1.10), häufig durchgeführt.

### 3.1.6 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Für analytische Verdaue wurden typischerweise 200–500 ng Plasmid-DNA (2–8  $\mu\text{l}$ ) in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  mit 1–5 U (0,2  $\mu\text{l}$ ) der jeweiligen Restriktionsenzyme gemäß Herstellerangaben für ca. 1 h inkubiert. Zur Stabilisierung mancher Enzyme wurden 0,3  $\mu\text{l}$  *purified BSA 100x* zugesetzt. Die Auswertung der erhaltenen Fragmente erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese und Ethidium-Bromidfärbung unter UV-Licht im Vergleich mit den in Tabelle 3.1 beschriebenen Markern.

### 3.1.7 Glätten von überhängenden DNA-Enden

Um nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR glatte (*blunt*) DNA-Enden für eine spätere Ligation zu erzeugen, wurde das *Klenow*-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* verwendet (ein Glätten war nicht nötig bei Verwendung von *Pfu-DNA-Polymerase*).

Der Reaktionsansatz setzte sich aus 0,5–3 µg DNA, dem *Klenow*-Fragment (0,8 U), *Klenow*-Puffer und BSA (0,5 µg/µl) in einem Volumen von 10–25 µl zusammen. Nach dem Mischen wurde der Ansatz für 10 min bei 37°C vorinkubiert (Abbau der 3'-Überhänge, wenn vorhanden), im Anschluß wurden dNTPs auf jeweils 2 mM Endkonzentration zugegeben, so wurden zuviel abgespaltene Nukleotide aufgefüllt. Der Ansatz wurde für weitere 35 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde nach Reaktionsende für 10 min auf 70°C erhitzt.

### 3.1.8 5'-DNA-Phosphorylierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte müssen zur Ligation in dephosphorylierte Vektoren am 5'-Ende phosphoryliert werden. Diese 5'-Phosphatreste wurden mit Hilfe der *T4-Polynucleotidkinase* eingeführt.

Der *Klenow*-Ansatz bzw. 1–2 µg der gereinigten *Pfu*-PCR wurden mit PNK-Puffer, ATP (1 mM) und T4-Polynucleotidkinase (10 U) für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 70°C inaktiviert bzw. der Reaktionsansatz mit dem *Nucleotrap*-Kit (3.1.3) entsalzt, dies ermöglicht anschließend eine direkte Verwendung zur Ligation.

### 3.1.9 5'-DNA-Dephosphorylierung von Plasmid-Vektoren

Die Religation eines geschnittenen Vektors mit glatten Enden kann durch Dephosphorylierung der 5'-Enden verhindert werden.

Dazu wurden nach oder während des Restriktionsverdaus *Alkalische Phosphatase (AP)* (0,5–1 U/10 µl Ansatz) und ev. AP-Puffer zugesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein *Nucleotrap* (3.1.3) durchgeführt.

### 3.1.10 Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA-Fragmenten und Klonierungs- oder Expressionsvektoren wurde der *Rapid DNA Ligation* Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) gemäß Herstellerangaben verwendet.

Um eine effiziente Ligation zu erzielen, wurde ein molares Verhältnis von 1 : 1 bis 1 : 3 (Vektor : Fragment) für die Reaktion eingesetzt. Das Verhältnis wurde am Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel (3.1.2) abgeschätzt. Die Vektormenge betrug standardmäßig 50 ng. Die Ligationszeit betrug bei RT 5–15 min für überhängende

Enden und 20–40 min für geglättete Enden. Bei schwierigen Ligationen wurde über Nacht bei 4°C oder 16°C ligiert.

### 3.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Reaktion wurde in Anlehnung an das Protokoll von Mullis [101, 102] durchgeführt. Spezifische PCR-*Primer* wurden für verschiedene Vorhaben wie Einführung von Punktmutationen, Amplifikation bestimmter Teilbereiche (z.B. *PDE5-GAF-Domänen*), Austausch kleinerer Gen-Bereiche (z.B. EL-EIRIP aus *CyaB1* durch EL-EIRIP aus *rPDE2a* ersetzt) und zur Einführung von Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen benutzt.

Für die Reaktion wurde die zu amplifizierende DNA (Plasmid-DNA aus Minipräparation, 1 : 50 bis 1 : 100 verdünnt) als Template mit *Primern* (jeweils 0,5  $\mu\text{M}$ ), dNTPs (jeweils 200  $\mu\text{M}$ ), PCR-Puffer (mit 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), optional 5–10% DMSO und DNA-Polymerase (1 U *Taq* bzw. 1,75 U *Pfu*) versetzt und mit Wasser auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit Wasser statt DNA-Template.

Das Temperaturprogramm variierte in Abhängigkeit des verwendeten DNA-Templates, der eingesetzten *Primer* und der erwarteten Produktlänge in folgenden Grenzen:

95°C	5 min	Denaturierung
20–40 Zyklen:		
95°C	1 min	Denaturierung
40–65°C	1 min	<i>Primer</i> -Anlagerung
72°C	1–3 min	Extension
72°C	10 min	Auffüllen unfertiger Produkte
4°C	Pause	Kühlung der Produkte bis zur Weiterverwendung

**Tab. 3.2:** PCR-Programm

Bei der Verwendung von *Miniprep-DNA* als Template wurden i.d.R. 30 Zyklen ohne Temperaturgradient gefahren. Bei der Durchführung einer *Fusions-PCR* mit zwei PCR-Produkten als Template wurde ein Temperaturgradient gewählt, bei dem die ersten 5 Zyklen bei einer niedrigeren Temperatur (z.B. 44°C) und die anschließenden 25 Zyklen bei einer höheren Temperatur (z.B. 50°C) gefahren wurden.

Die Anlagerungstemperatur ( $T_{\text{Annealing}}$ ) wurde näherungsweise nach untenstehender Formel berechnet:

$$T_{\text{Annealing}}[^\circ\text{C}] = 4 \cdot (\text{GC}) + 2 \cdot (\text{AT})$$

GC = Anzahl der bindenden GC-Basenpaare im *Primer*,

AT = Anzahl der bindenden AT-Basenpaare im *Primer*

Falls sich die Anlagerungstemperaturen der beiden verwendeten Primer unterschieden, wurde mit der niedrigeren errechneten Temperatur gearbeitet. Die Extensionszeit  $t_{ex}$  in [s] ergab sich aus

$$t_{ex}[s] = 0,06 \cdot \text{Länge des erwarteten Produkts [bp]},$$

betrug jedoch mindestens 1 min.

Die Reaktion wurde in sterilen 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen im *TRIO-Thermoblock Thermocycler* durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

### 3.1.12 Sequenzierung von DNA

DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode [103] unter Verwendung von *ddNTPs* sequenziert. Hierzu wurde der *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences) eingesetzt. In 0,2 ml PCR-Cups wurden je 2  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung (4 verschiedene; je mit einem ddNTP, dNTPs, Reaktionspuffer mit  $\text{Mg}^{2+}$  und DNA-Polymerase) vorgelegt und anschließend 3  $\mu\text{l}$  von folgendem Mix unter Mischen zugegeben:

- Miniprep-DNA (insgesamt 1-2 pmol, ca. 130 ng/1000 Basenpaare Plasmid, die Lösung darf maximal 0,1 mM EDTA enthalten), davon
  - 5–8  $\mu\text{l}$  Miniprep bei *pBSKII(-)* als Vektor-Plasmid oder
  - 11,3  $\mu\text{l}$  vorher aufkonzentrierte Miniprep bei *pQE30*, *pET16b* und *pET16b-MCSpQE30* als Vektor-Plasmid
- 0,7  $\mu\text{l}$  DMSO
- 1  $\mu\text{l}$  5'-IRD 800-markierter Sequenzierprimer, 4  $\mu\text{M}$
- Wasser ad 13  $\mu\text{l}$

Die Reaktionsansätze wurden mit je einem Tropfen *Chill-Out 14 Liquid Wax* überschichtet, kurz abzentrifugiert und die Reaktion auf dem *TRIO-Thermoblock Thermocycler* (für 0,2 ml Cups) gestartet.

Es wurde das in Tab. 3.3 angegebene Temperatur-Programm gefahren.

$T_{\text{Annealing}}$  betrug für  $T_3$ ,  $T_7$ , R-CyaB1-GAF, U-CyaB1-PAS2, U-CyaB1-Kat, U-PDE5 GAF und R-pETMCS-pQE30 (siehe 2.3.1, Seite 17) 56°C und für U-pQE und R-pQE 54°C.

Nach Reaktionsende wurden je 5  $\mu\text{l}$  Formamid-Stoppuffer zur Denaturierung zugegeben, gevortext und abzentrifugiert. Je 1–1,2  $\mu\text{l}$  der Proben wurden auf ein 6%-Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff im *LI-COR*-Sequenator aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 50°C, 50 W Leistung, einer maximalen Spannung von 1500 V und einer Stromstärke von 37 mA über 6–8h. Das erhaltene Bandenmuster wurde mit Hilfe der *BaseImagIR version 4.0*-Software, die vom Hersteller des *LI-COR*-Sequenators mitgeliefert wurde, ausgewertet.

95°C	2 min	Denaturierung
20–30 Zyklen:		
95°C	20 sec	Denaturierung
$T_{Annealing}$	20 sec	<i>Primer</i> -Anlagerung
72°C	30 sec	Extension
4°C	Pause	Kühlung der Produkte bis zur Auftragung aufs Gel

**Tab. 3.3:** PCR-Programm zur Sequenzierung von DNA

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterienzellen kann durch Calcium-Behandlung deutlich gesteigert werden.

5 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Bei *BL21(DE3)[pRep4]*-Zellen wurde hierzu Kanamycin, bei *XL1*-Zellen Tetracyclin und bei *DH5 $\alpha$*  kein Antibiotikum zugesetzt. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur mit 100–200 ml LB-Medium, auf 37°C vorgewärmt, 1:100 angeimpft. Es wurde unter Schütteln inkubiert bis bei  $\lambda = 600$  nm eine optische Dichte von 0,3–0,4 erreicht war ( $\approx 3$ h). Der Hauptkultur wurde nur bei *BL21(DE3)[pRep4]*-Zellen Kanamycin zugesetzt, die Hauptkulturen von *XL1* und *DH5 $\alpha$* -Zellen enthielten kein Antibiotikum. Nach Erreichen der gewünschten  $OD_{600}$  wurden die Zellen für mindestens 15 min auf Eis abgekühlt und danach bei 2000 $\times g$  und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 50 ml eiskalter  $CaCl_2$ -Lösung (0,1 M, steril) resuspendiert und für weitere 20 min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurden die Zellen in 10 ml 0,1 M  $CaCl_2$ /20% Glycerol (steril) aufgenommen und mindestens 4 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in Aliquots à 100  $\mu l$  bei  $-80^\circ C$  gelagert.

### 3.2.2 Standardtransformation von E.coli-Zellen

Der komplette Ligationsansatz (3.1.10) wurde mit 10  $\mu l$  CM-Puffer (10-fach) versetzt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 100  $\mu l$  aufgefüllt. Diese Mischung wurde zu 100  $\mu l$  leicht angetauten kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben. Die Bakterien wurden für 20 min auf Eis, für 45–60 s bei 42°C und nochmals für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Ausbildung der nötigen Antibiotikaresistenz wurden 500  $\mu l$  LB-Medium zugesetzt und für 75 min bei 37°C geschüttelt. Schließlich wurden die Zellen (50–400  $\mu l$  des Ansatzes) auf Agar-Platten, die das Selektionsantibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gehalten.

### 3.2.3 Schnelltransformation von E.coli-Zellen

100  $\mu\text{l}$  leicht angetaute kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 100–200 ng Plasmid-DNA (0,5–5  $\mu\text{l}$  Miniprep) gemischt, 5–15 min auf Eis inkubiert und 10–100  $\mu\text{l}$  des Ansatzes auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C gehalten. Diese Methode ist nur zur Retransformation von bereits vorhandenen Minipreps geeignet.

### 3.2.4 E.coli-Dauerkulturen

Zum Animpfen von Expressionskulturen und zur Lagerung wichtiger Plasmide wurden Dauerkulturen angelegt. 1,5 ml der entsprechenden Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 900  $\mu\text{l}$  *LB-Medium für Dauerkulturen* resuspendiert. Die Zellen wurden sofort bei -80°C eingefroren.

Durch den Glycerinzusatz wird ein vollständiges Gefrieren der Lösung verhindert, außerdem bewirkt die Lagerung bei -80°C ein verlangsamtes Kristallwachstum, so dass die Zellen nicht durch sich bildende Eiskristalle zerstört werden.

### 3.2.5 Blau-Weiß-Screen

Wenn der verwendete Klonierungsvektor *pBSKII(-)* religiert, ohne das gewünschte Insert aufgenommen zu haben, bleibt eine Leserasterverschiebung im dort vorhandenen *Lac-Operon* aus. Dies bedeutet, dass bei Induktion durch IPTG das funktionsfähige M15-Fragment der  $\beta$ -Galactosidase exprimiert werden kann, welches zusammen mit dem im *E.coli XL1 Blue*-Genom codierten Rest der  $\beta$ -Galactosidase eine funktionsfähige  $\beta$ -Galactosidase ergibt. Diese wandelt das angebotene künstliche Substrat *X-Gal* in einen blauen Farbstoff um, der Klone ohne Insert blau färbt. Streicht man die transformierten *E.coli XL1 Blue* -Zellen auf Agarplatten mit 40  $\mu\text{l}$  0,1 M IPTG und 40  $\mu\text{l}$  2% *X-Gal* aus, erscheinen nach Inkubation über Nacht bei 37°C die rekombinanten Kolonien mit Insert weiß (oder z.T. hellblau) und die ohne Insert blau.

Auf diese Weise kann überprüft werden, ob ein Bakterium ein inserthaltiges Plasmid oder nur den religierten Klonierungsvektor aufgenommen hat.

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 Bio Rad Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurde das *Bio Rad Protein Assay*-Reagenz gemäß Herstellervorschrift verwendet.

Die Proteinprobe (meist 2–30  $\mu\text{l}$ ) wurde mit Wasser auf 800  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 200  $\mu\text{l}$  Bio Rad-Reagenz versetzt. Die Ansätze wurden kräftig gevortext und 5 min stehen gelassen, bevor sie bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  vermessen wurden. 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12  $\mu\text{g}$  BSA dienten als Standard.

Trenngel, pH 8,8			Sammelgel, pH 6,8
	10%	12,5%	4,5%
H <sub>2</sub> O	5 ml	4 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	
Sammelgelpuffer			1 ml
Acrylamid/Bis (37,1 : 1) 30% Fertiglsg. ( <i>AppliChem</i> )	4 ml	5 ml	0,6 ml
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
APS (10%)	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	45 $\mu$ l

**Tab. 3.4:** Zusammensetzung von 10 bzw. 12,5%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen, inklusive des Sammelgels (4,5%).

### 3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [104] angewendet. Verwendet wurden Minigel-Apparaturen der Firma Amersham (*Hoefler-Kammern*). Je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine wurden 10–12,5%ige Trenngele eingesetzt, die angegebenen Mengen ergeben je zwei Minigele.

Normalerweise wurden trotz der sehr großen exprimierten Proteine (90–116 kDa) 12,5% SDS-Gele verwendet, für *Western-Blots* wurden meist 10% SDS-Gele benutzt, da bei nur 10% Acrylamid die Proteine leichter aus dem Gel auf die Membran wandern können.

Flüssige Proteinproben wurden mit 1/4 Volumen Probenpuffer (4-fach) gemischt, für 3–5 min bei 80°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Von den Zellpellets, die nach Zentrifugation des Zellysates in der Kontron bei 48 000×g für 45 min erhalten wurden (siehe 3.6), wurden 50 - 60 mg in ein Eppicup abgewogen. Dort wurde mit 50  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95°C denaturiert, mit 50  $\mu$ l Wasser gemischt, und 2 - 4  $\mu$ l des Überstandes auf das SDS-Gel aufgetragen.

Zur Elektrophorese wurde *Hoefler-Laufpuffer* (2.5.2.1) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA/Gel und 200–250 V durchgeführt. Sobald die Bromphenolblau-Front das Gel verlassen hatte, wurde gestoppt. Das Gel wurde mit *Coomassie*-Lösung für mindestens 30 Minuten gefärbt und anschließend mit *Entfärber* bis zum Sichtbarwerden der Banden entfärbt bzw. direkt zum *Western-Blotten* (3.3.3) verwendet.

Als Protein-Größenstandard dienten 5  $\mu$ l *peqGold Protein-Marker* der Firma Peq-Lab, Erlangen. Dieser setzt sich aus den in Tabelle 3.5 aufgeführten Referenzproteinen zusammen.

Die erhaltenen Bandenmuster wurden mit einem Videoprintersystem (*Biocapt Software*) dokumentiert. Die entfärbten SDS-Gele wurden getrocknet und aufbewahrt.

Protein	Herkunft	Molekulargewicht (kDA)
$\beta$ -Galactosidase	<i>E. coli</i>	116,0
BSA	Rinderserum	66,2
Ovalbumin	Hühnereiweiß	45,0
Lactat-Dehydrogenase	Schweinemuskel	35,0
RE <i>Bsp98I</i>	<i>E. coli</i>	25,0
$\beta$ -Laktoglobulin	Kuhmilch	18,4
Lysozym	Hühnereiweiß	14,4

**Tab. 3.5:** Zusammensetzung des *peqGold Protein-Markers*

### 3.3.3 Western Blot

*Western Blots* eignen sich, Proteine (gereinigt oder im Zellysat) spezifisch unter Verwendung spezieller Antikörper nachzuweisen. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass nur für den Antikörper antigene Proteine nachgewiesen werden, außerdem können 10-fach geringere Proteinmengen als beim SDS-PAGE-Gel nachgewiesen werden. Wenn ein unbekanntes Protein nach der ersten Expression auf dem SDS-PAGE-Gel keine erkennbare Bande ergab, konnte mit Hilfe des *Western-Blots* festgestellt werden, ob überhaupt eine Expression stattgefunden hatte.

Hierzu wurden die Proteine zuerst mittels SDS-PAGE (3.3.2) nach ihrer Größe aufgetrennt, anschließend wurden sie elektrophoretisch auf eine Membran (*PVDF*) übertragen. Verwendet wurde die Methode des *Semi-Dry*-Elektrotransfers nach Towbin [100]. Hierzu wurde die Blotmembran auf die Größe des SDS-PAGE-Gels (5,5 cm  $\times$  8,5 cm) zugeschnitten und nacheinander 10 min in Methanol, 10 min in Wasser und 15 min in *Towbin-Transferpuffer* (2.5.2.2) voräquilibriert. Auch das zu blottende SDS-PAGE-Gel wurde für 15 min in *Towbin-Transferpuffer* (2.5.2.2) gelagert.

Anschließend wurde ein Sandwich bestehend aus drei Lagen *Whatman*-Papier (je 6 cm  $\times$  9 cm, mit *Towbin-Transferpuffer* durchtränkt), der Membran, dem Gel und nochmals drei getränkten *Whatman*-Papieren auf der Anodenplatte der Blot-Apparatur (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*, Firma BIO-RAD) luftblasenfrei zusammengesetzt. Die Elektrodenplatten waren vorher mit *Towbin-Transferpuffer* befeuchtet worden. Geblottet wurde für 3-4 h (je größer die Proteine, desto länger) mit einer Stromstärke von 2,5 mA/cm<sup>2</sup> (für 1 Minigel: 200 mA, 20 V). Auf die Membran übertragene Proteinbanden ließen sich mit *Ponceau S* reversibel anfärben, die Markerbanden wurden mit Bleistift gekennzeichnet.

Für die anschließende Immundetektion wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Blockieren der Membran mit *M-TBS-T* (2.5.2.2) für 1 h oder über Nacht, um freie Bindungsstellen auf der Membran mit Milchproteinen zu beladen und so eine unspezifische Anlagerung des primären Antikörpers zu verhindern.

- Waschen mit *TBS-T* (2×2 min)
- Bindung des *primären Antikörpers* für 1 h [RGS-(His)<sub>4</sub>-Antikörper für alle Konstrukte aus *pQE30* oder *pET16b-MCSpQE30* bzw. *Tetra-His-Antikörper* für *pET16b*-Konstrukte] (2.5.2.2)
- Waschen mit *TBS-T* (1×15 min, 2×5 min)
- Bindung des *sekundären Antikörpers* für 1 h [Ziege-anti-Maus, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, 1 : 5000 verdünnt] (2.5.2.2)
- Waschen mit *TBS-T* (1×15 min, 2×5 min)

Im Anschluß erfolgte die Detektion als Chemoluminiszenzreaktion mit dem *ECL Plus Western Blot Detection System* der Firma Amersham Biosciences nach Herstellerprotokoll. Die auftretende Luminiszenz wurde durch Belichtung (5 s bis 10 min) von *ECL-Hyperfilmen* detektiert.

### 3.4 Proteinexpression

Als Expressionszellen wurden überwiegend *BL21(DE3)[pREp4]*-Zellen, bei *pET16b* als Expressionsplasmid auch *BL21(DE3)[pLysS]* verwendet. [pRep4] als zusätzliches *E. coli*-Plasmid bewirkte eine Überexpression des *Lac*-Repressors, wodurch eine Hintergrundexpression von *pQE30* und *pET16b-MCSpQE30* weitgehend unterdrückt wurde.

Bei schwieriger zu exprimierenden Konstrukten (z.B. einige CyaB2-CyaB1 AC-Mutanten) war eine noch besser kontrollierbare Expression nötig. Aus diesem Grund wurde hier im *pET16b* mit *BL21(DE3)[pLysS]*-Zellen zur Expression gearbeitet. Die Transkription des Zielgenes wird dabei über einen T7-Promotor gesteuert. Die zur Expression nötige T7-RNA-Polymerase ist auf dem Wirtsgenom (Abschnitt *DE3*) codiert und die Transkription dieser RNA-Polymerase wird ebenfalls über ein *Lac-Operon* gesteuert. So wird durch den gebildeten *Lac*-Repressor (codiert im Wirtsgenom und auf *pET16b*) sowohl die direkte Expression des Zielgenes verhindert als auch die Expression der dafür nötigen T7-RNA-Polymerase. [pLysS] als Zusatzplasmid liefert einen weiteren Kontrollschalter. Es codiert für T7-Lysozym, welches als natürlicher Hemmstoff der T7-RNA-Polymerase diese inaktiviert. Erst bei Induktion mit IPTG wird T7-RNA-Polymerase überexprimiert, was in Folge eine (Über-)Expression des Zielproteins bewirkt.

Mit entsprechenden Dauerkulturen wurden über Nacht Vorkulturen bei 30 oder 37°C hochgezogen. Die Hauptkulturen (vorgewärmte 200 ml Kolben mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml)) wurden am nächsten Morgen mit 7,5–10 ml Vorkultur überimpft und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,35–0,4 inkubiert. Bei dieser OD<sub>600</sub> wurde der Expressionsschrank auf eine Temperatur von 16–18°C herabgestellt. Bei geringeren Temperatur sollte mehr lösliches Protein aufgrund einer

besseren Proteinfaltung gebildet werden. Wenn eine  $OD_{600}$  von 0,5-0,6 erreicht war, wurde mit IPTG in einer Endkonzentration von 17,5  $\mu\text{M}$  bis 75  $\mu\text{M}$  induziert, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  zugesetzt und die Zellen weiter bei 16–18°C inkubiert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurde 7–20 h exprimiert.

## 3.5 Zellernte

Die Zellen wurden à 200 ml für 10 min bei 4°C und 3200×g in der *Kontron*-Zentrifuge abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen und drei bis vier Pellets des gleichen Konstruktes in ein Falcon-Tube, 50 ml überführt. Das Falcon wurde mit 0,05 M Tris/HCl-Lösung pH 8,5, 4°C, auf 50 ml aufgefüllt, durch Schütteln wurden die Zellen resuspendiert und gewaschen. Im Anschluß zentrifugierte man 10 bis 30 min bei 4300–5300 rpm in der auf 4°C gekühlten *Heraeus*-Zentrifuge. Je nach Expressionsszellen erhielt man dabei ein festes oder relativ flüssiges Zellpellet und einen verschieden klaren Überstand, der verworfen wurde. Das abgetropfte Zellpellet wurde ca. 2 min in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Anschließend wurde direkt zur Zellyse übergegangen oder bei -80°C gelagert.

## 3.6 Zellyse

Üblicherweise wurde das Pellet (entsprechend 600 - 800 ml Bakterienkultur) bei Raumtemperatur aufgetaut und in 20 bis 40 ml *Zellysepuffer* (2.5.2.3) unter Vortexen resuspendiert. Bei instabilen Konstrukten (v.a. PDE5 GAF-CyaB1 AC und einige CyaB2 GAF-CyaB1 AC-Konstrukte) wurde dem Lysepuffer ein Proteaseinhibitor (*Complete EDTA-free*-Tabletten von Roche) gem. Herstellervorschrift zugesetzt. Um eine unspezifische Bindung *E.coli*-eigener Proteine bei der anschließenden Reinigung zu reduzieren, wurden dem Zellysepuffer zum Teil 7,5 mM Imidazol, pH 8,5 zugesetzt.

Die suspendierten Zellen wurden in 2 -3 Pressvorgängen mit der *French Press* (Druck = 1000 psi) lysiert. Hierbei wurden größere Ausbeuten an löslichem Protein erhalten als bei Lyse durch Ultraschall/Lysozym und DNase.

Eine Lyse durch 3× 12 s Ultraschall (*Branson Sonifier B-12*, Stufe 4), Inkubation mit 100  $\mu\text{l}$  Lysozym (40 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 10% Glycerin) für 30 bis 60 min und anschließende Inkubation mit 100  $\mu\text{l}$  DNase-Lösung (2 mg/ml DNase I in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 10% Glycerin) plus 50  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung für weitere 30 bis 60 min wurde nur in Ausnahmen bei sehr schleimigen, weil bereits selbst-lysierenden *BL21(DE3)[pLys]*-Expressionszellen oder zum Vergleich mit der *French Press*-Methode angewendet.

Zur Abtrennung größerer unlöslicher Zellbestandteile schloss sich eine 45 minütige Zentrifugation in der *Kontron*-Zentrifuge (48 000×g) an.

## 3.7 Proteinreinigung durch Affinitäts-Chromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA

Da sowohl die verwendeten Expressionsvektoren *pQE30* und *pET16b-MCSpQE30* als auch *pET16b* für Oligo-His-Sequenzen (mit 6 bzw. 10 Histidinen) an den N-Termini der Expressionsprodukte codierten, war nach der Expression eine Affinitätsreinigung der Produkte über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Material und ein immunochemischer Nachweis mit *RGS-(His)<sub>4</sub>-Antikörpern* bzw. *Tetra-His-Antikörpern* möglich. Die Reinigung erfolgte in Anlehnung an das *QIAexpressionist-Handbuch* (Fifth Edition, June 2003) der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Herstellerfirma Qiagen.

Vor dem Ende der Zentrifugation (3.6) wurde ein neues Falcon-Tube vorbereitet, in dem 2 bis 3 ml *Zellysepuffer* mit 50 bis 300  $\mu$ l resuspendiertem Ni<sup>2+</sup>-NTA-Harz voräquilibriert wurden. Der Überstand nach beendeter Zentrifugation (20 bis 40 ml, entsprechend 400 bis 800 ml Bakterienkultur) wurde zur Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Suspension gegeben und das Protein innerhalb von 1,5 bis 3 h bzw. über Nacht bei leichtem Schütteln auf Eis ans Harz gebunden. Das im Zentrifugenröhrchen verbliebene Pellet wurde gemäß 3.3.2 für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgearbeitet.

Nach Ablauf der Bindezeit wurde das Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Harz für 5 min bei 1100 $\times$ g (*Heraeus*) abzentrifugiert und komplett in eine Miniprep-Säule (*Wizard Plasmid Purification Kit*, Promega) mit aufgeschraubter Spritze überführt.

Es wurde gemäß folgendem Schema gewaschen (Lösungen siehe 2.5.2.3):

- 2 $\times$  mit je 1 ml Wash A (7,5 mM Imidazol)
- 2 $\times$  mit je 1 ml Wash B (15 mM Imidazol)
- 2 $\times$  mit je 1 ml Wash E (25 mM Imidazol) (selten ersetzt durch Wash C oder D)

Durch die steigende Imidazolkonzentration sollten anhaftende Verunreinigungen abgepült werden, ohne jedoch das Zielprotein vom Harz zu verdrängen.

Die Elution des gewünschten Proteins erfolgte durch Zugabe von

- 100 - 500  $\mu$ l Elutionspuffer (300 mM Imidazol)

Das erhaltene Eluat wurde noch 2 $\times$  auf die Säule aufgetragen, um eine möglichst vollständige Elution zu erhalten. Der so erhaltenen Proteinlösung wurde Glycerin ad 35% zugesetzt, dies erhöhte den Frostschutz bei Lagerung. Die Proteinlösung konnte nun per SDS-PAGE-Gelelektrophorese (3.3.2) in Bezug auf Reinigungs- und Expressionsgrad untersucht werden, direkt auf *AC-Aktivität* getestet werden oder nach Dialyse bei -20C gelagert werden.

### 3.8 Dialyse

Für eine bessere Lagerungsstabilität der exprimierten Chimären bei  $-20^{\circ}\text{C}$  war eine Entfernung des durch die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Reinigung (3.7) in die Lösung eingebrachten Imidazols nötig. 50 -400  $\mu\text{l}$  der unter 3.7 erhaltenen, gereinigten Proteinlösung wurden in einen Dialyseschlauch (*Visking Dialyse Schlauch 8/32*, Firma Serva) gefüllt, dieser vorne und hinten mit einer Klammer verschlossen und  $2 \times 1$  h im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter Rühren gegen je 300 - 500 ml kalten Dialysepuffer (2.5.2.3) dialysiert. Anschließend konnte die Proteinlösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mehrere Monate gelagert werden.

### 3.9 CyaB2–GAFs: Expression und Reinigung zur Kristallisation

Die ersten Expressionen wurden von Anita Schultz durchgeführt. Das CyaB2 GAF–Konstrukt von AS 58 bis 445 im Expressionsplasmid *pQE60* wurde in *BL21(DE3)-[pREp4]*-Zellen in 150 ml LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin bei  $30^{\circ}\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 (ca. 3 h) kultiviert. Es wurde mit 600  $\mu\text{M}$  IPTG induziert und bei  $22^{\circ}\text{C}$  für 10 h exprimiert.

Die Lyse erfolgte in 40 ml Puffer mit 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM Imidazol; 20 % Glycerol und 50 mM NaCl durch Zusatz von 100  $\mu\text{l}$  Lysozym-Lösung (40 mg/ml) für 1 h. Anschließend wurde  $3 \times$  für 30 s auf Eis mit Ultraschall (Stufe 4) behandelt und 30 min in der *Kontron*-Zentrifuge bei 18 000 rpm abzentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde mit 400  $\mu\text{l}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA versetzt und 3 h auf Eis gebunden. Das erhaltene  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Pellet mit gebundenem Protein wurde nach folgendem Schema gewaschen:

Wash 1	$2 \times$	1 ml	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 15 mM Imidazol 20% Glycerol 400 mM NaCl 2 mM $\text{MgCl}_2$
--------	------------	------	---

Wash 2	$2 \times$	1 ml	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 15 mM Imidazol 20% Glycerol 10 mM NaCl 2 mM $\text{MgCl}_2$
--------	------------	------	--

Elution auf Eis	$2 \times$	500 $\mu\text{l}$	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 250 mM Imidazol 20% Glycerol 10 mM NaCl 2 mM $\text{MgCl}_2$
--------------------	------------	-------------------	---

Die erhaltene Proteinmenge betrug ca. 6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und war mit 3,5 mg/150 ml Kultur sehr groß. Der Reinigung schloß sich eine Ultrafiltration mit einem Puffer aus 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,05 mM Thioglycerin und 10% Glycerol an. Die Imidazolkonzentration wurde dadurch auf ca. 5,5 mM verringert. So wurden 150  $\mu\text{l}$  mit einer Proteinkonzentration von 11 mg/ml erhalten.

Jürgen Linder setzte nach Zusatz von 2 mM cAMP Kristallisationsansätze mit dem *Kristallscreen II*-Kit an.

Die folgenden Expressionen, Optimierungen der Kristallisation und die Strukturaufklärung wurden von S.E. Martinez im Labor von J.A. Beavo, Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, USA durchgeführt. Das übersandte Konstrukt im Expressionsplasmid *pQE60* wurde mittels Hitzeschock in *C41*-Zellen, einer Abwandlung von *BL21(DE3)[pREp4]* transformiert. 2 ml einer Übernachtskultur mit 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Carbenicillin wurden in 2 l LB-Medium überimpft. Unter Schütteln (200 rpm bei 37°C) wurde bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7 kultiviert, mit 600  $\mu\text{M}$  IPTG induziert und bei 22°C für 18 h geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, einmal mit 40 ml PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und das Pellet bei -80°C bis zur Lyse gelagert. Die Lyse und anschließende Reinigung mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA erfolgte wie oben (3.9) beschrieben. Die gereinigte Proteinlösung wurde in 0,1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

Die Kristallisation, Datengewinnung und Strukturaufklärung erfolgten ebenfalls im Labor von J.A. Beavo [105].

## 3.10 Adenylatcyclase-Enzymtest

Die Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität von gereinigtem Protein oder Zellhomogenaten erfolgte nach dem Verfahren von Salomon et al. (1974) [106]. Dabei wurde die Umsetzung von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  zu radioaktivem cAMP durch Szintillationsmessung bestimmt.

Enzymatisch gebildetes cAMP wurde dabei chromatographisch mit zwei hintereinander geschalteten Säulen von nicht umgesetztem ATP abgetrennt. Als interner Standard für die Wiederfindung diente  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$ .

Der Reaktionsansatz setzte sich aus 50  $\mu\text{l}$  AC-Cocktail,  $2\times$  (2.5.2.4), 40  $\mu\text{l}$  Enzymprobe (eventuell mit Reagenzienzusatz (meist cAMP oder cGMP)) und 10  $\mu\text{l}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ - Substrat (normale Endkonz. 75  $\mu\text{M}$ , 2.5.2.4) zusammen.

Cocktail und Enzymprobe mit Zusätzen wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen auf Eis vorgelegt und die Reaktion nach eventuell benötigter Vorinkubation (für die allosterische Aktivierung durch cAMP oder cGMP) durch zeitversetzte ATP-Zugabe gestartet. Nach dem Start wurde die Probe für vier (alle CyaB2- und EL-EIRIP-Konstrukte) bis 10 min (alle PDE5-Konstrukte) unter Schütteln auf dem Heizblock bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer (2.5.2.4) und Kühlung auf Eis beendet. Zuletzt wurden 10  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}\text{-cAMP}$ , 20 mM als interner Standard und 750  $\mu\text{l}$  Wasser zugesetzt. Der interne Standard  $^3\text{H}\text{-cAMP}$  wurde erst nach Ende der Reaktion

zugesetzt, da ansonsten eine allosterische Aktivierung des untersuchten Enzyms den Test hätte stören können. Um den Säulenhintergrund zu bestimmen, wurden je zwei Proben ohne Protein eingesetzt (*Blank* oder Nullwert).

Jeder Testpunkt wurde doppelt bestimmt, die gezeigten Ergebniskurven stellen je einen repräsentativen Verlauf von mindestens 2 Experimenten dar. Angegebene  $EC_{50}$ -Werte, Aktivierbarkeitsfaktoren, SEMs und Hillkoeffizienten sind die aus allen Messungen bestimmten Mittelwerte.

Meßwerte, die nicht mindestens dem doppelten *Blank* entsprachen, wurden nicht gewertet.

Zur Abtrennung des gebildeten cAMP von anderen ATP-Derivaten wurden die Ansätze auf *Dowex*-Säulen (9×1 cm Glassäule mit 1,2 g Dowex-50WX4) gegeben. Nach dem Einsickern der Proben wurde mit 3 bis 4 ml Wasser (je nach Elutionsprofil der verwendeten Säulen) gewaschen. Die *Dowex*-Säulen wurden anschließend mit 5 ml Wasser direkt auf *Aluminiumoxid*-Säulen (10×0,5 cm Plastik- oder 9×1 cm Glassäule mit 1,0 g  $Al_2O_3$  90 aktiv, neutral) eluiert. Die Elution erfolgte mit 4,2 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 in mit 4 ml Szintillator *Ultima Gold XR* befüllte Szintillationsgefäße. Nach gründlichem Schütteln wurde im *Liquid Szintillation Counter* ausgezählt.

Zur Bestimmung der eingesetzten Mengen an radioaktiv markiertem cAMP und ATP wurden  $^3H$ - und  $^{32}P$ -Totals direkt in Elutionspuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 7,5) und Szintillator ausgezählt.

Die Ezymaktivität  $A$  berechnete sich nach folgender Formel:

$$A\left(\frac{pmol[cAMP]}{mg[Protein] \cdot min}\right) = \frac{cpm[^{32}P]_{Probe} - cpm[^{32}P]_{Leerwert}}{cpm[^{32}P]_{total}} \cdot \frac{cpm[^3H]_{total}}{cpm[^3H]_{Probe} - 3\%[^{32}P]_{Probe}} \cdot \frac{ATP[\mu M] \cdot 10^5}{t_{Inkubation}[min] \cdot Protein[\mu g]} \quad (3.1)$$

Die Subtraktion von 3% der  $[^{32}P]$ -Counts vom entsprechenden  $[^3H]$ -Wert erfolgte aufgrund des Überstrahls vom  $^{32}P$ -Zählkanal in den  $^3H$ -Kanal.

Zur Regeneration der *Dowex*-Säulen wurde mit 1×5 ml HCl, 2 N und 2×5 ml Wasser gespült, die *Aluminiumoxid*-Säulen wurden durch Waschen mit 2×4,5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 regeneriert.

### 3.11 cNMP–Bindungsstudien

Der Test erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von T. Kanacher [2, 27].

1,5  $\mu g$  *PDE5 GAF-CyaB1 AC* bzw. *CyaB2 GAF A* und *GAF B* wurden für 1 h in einem Gesamtansatz von 20  $\mu l$  mit *Bindungspuffer für Nucleotid-Bindungstests* und 0,1 - 30  $\mu M$   $[^3H]$ -markierter-cNMP–Stocklösung (2.5.2.5) auf Eis inkubiert. Beim

Bindungspuffer handelte sich um einen Tris/HCl- und nicht wie sonst üblich um einen Phosphat-Puffer, da Phosphat die AC hemmt.

Anschließend wurde die Probe mit 880  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer versetzt, sofort auf vorbefeuchtete *HAWP*-Filter (0,45  $\mu\text{m}$ , Fa. Satorius, Göttingen) aufgetragen, unter Vakuum abgesaugt und mit 10 ml eisgekühltem Bindungspuffer nachgespült. Die Filter wurden getrocknet, mit 4 ml Szintillator *Ultima Gold XR* versetzt, gründlich geschüttelt und auf  $^3\text{H}$ -Radioaktivität ausgezählt. Die unspezifische Nucleotidbindung an die Filter wurde mit 1,5  $\mu\text{g}$  BSA bestimmt und von den erhaltenen Proteincounts subtrahiert. Es wurden 3 Wiederholungsansätze pro Meßpunkt ausgeführt.

### 3.12 Phosphorylierung von PDE5 GAF-CyaB1 AC und PDE5 S102A bzw. S102D-CyaB1 AC

Die humanen PDE5 GAF-Domänen besitzen an Position S102 eine Phosphorylierungsstelle für PKA und PKG. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluß der Phosphorylierung der PDE5 GAF-Domänen auf die Aktivität der *CyaB1*-katalytischen Domäne untersucht werden.

Der Test erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Zoraghi et al, 2005 [34]. 0,5  $\mu\text{M}$  Protein wurden mit PKA-Puffer, 2 mM ATP, 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA zur Erhöhung der Stabilität und 5000 U cAMP-abhängiger Proteinkinase A (PKA), katalytische Untereinheit in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  für 2 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zur Abtrennung nicht umgesetzten ATPs à 50  $\mu\text{l}$  auf trockengeliefene *Quick-Spin Columns for radiolabeled DNA Purification, Sephadex G-50 (fine)* aufgetragen und für 5 min bei 1100 $\times$ g zentrifugiert. Das ATP verblieb in der Säule, Protein befand sich im Durchlauf. Das eluierte, phosphorylierte Protein wurde direkt im AC-Test (3.10) untersucht oder mit Glycerin ad 35% versetzt und bei -20°C gelagert. Als Referenz zur Überprüfung der Stabilität des Enzyms bei 30°C über 2 h diente ein Ansatz ohne PKA, der im AC-Test als Vergleichswert diente.

### 3.13 Radioaktive Phosphorylierung für die Erstellung eines Autoradiogramms

Zum Nachweis, dass tatsächlich eine Phosphorylierung des Proteins unter den unter 3.12 beschriebenen Bedingungen stattgefunden hatte, wurde ein Autoradiogramm angefertigt.

Die Durchführung erfolgte wie unter 3.12 beschrieben, nur wurden 200  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  ATP an [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP (zu obigem 100  $\mu\text{l}$ -Ansatz 40  $\mu\text{Ci}$ ) zur radioaktiven Phosphorylierung zugesetzt. Nach 2-stündiger Inkubation und Zentrifugation über die G-50-Säulchen wurden die Proben auf ein 12,5%-SDS-PAGE-Gel (3.3.2) aufgeladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Das Trenngel wurde in Frischhaltefolie gepackt und ein Röntgenfilm (*Kodak Biomax MR*) für 22 h bis 4 Wochen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufgelegt, um die enthaltene radioaktive Strahlung sichtbar zu machen.

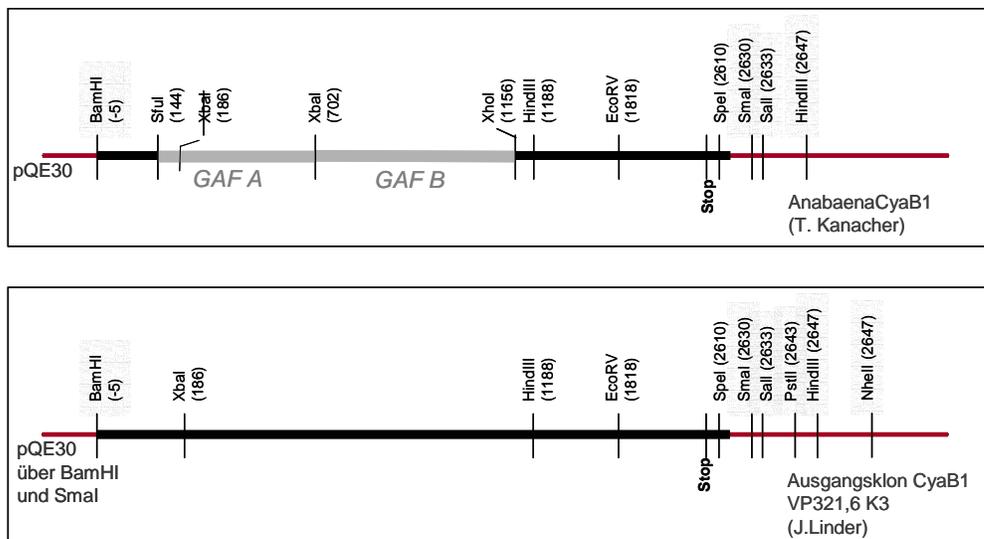
## 3.14 Klonierungen

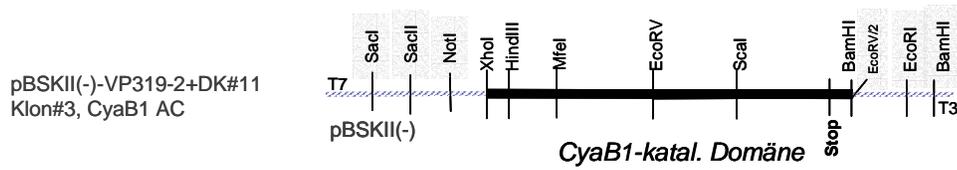
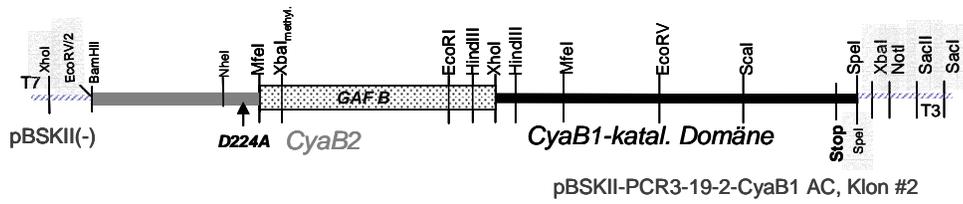
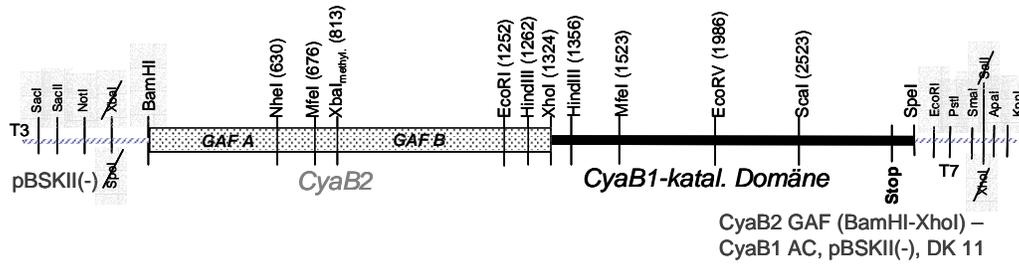
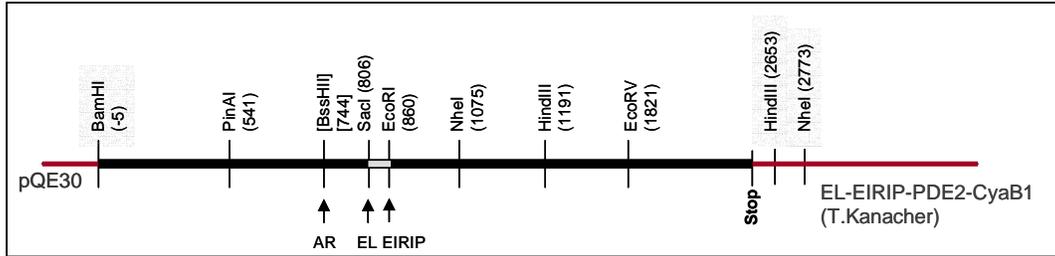
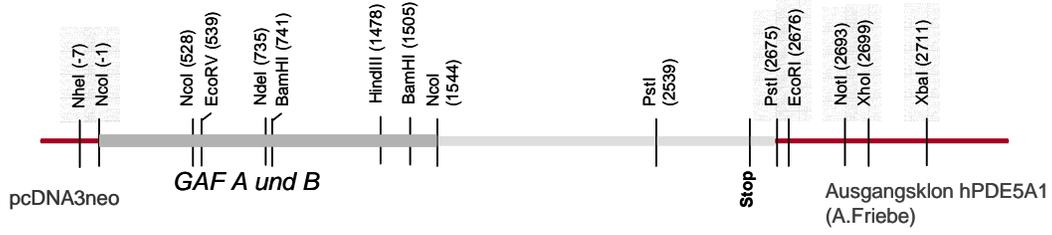
### 3.14.1 vorhandene Ausgangsklone

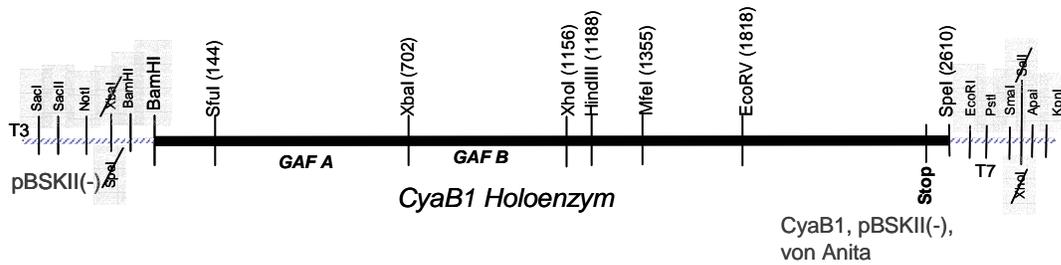
Die im Folgenden aufgeführten Klone waren bereits vorhanden und wurden von PD Dr. J. Linder (*Ausgangsklon CyaB1*), Dr. T. Kanacher (*CyaB1*-Klone mit veränderten Schnittstellen), PD Dr. Andreas Friebe (*PDE5A1-Holoenzym in pcDNA3-Zeocin-Vektor*) und A. Schultz (Zwischenklone, *CyaB1*-Klone mit verschiedenen Schnittstellen) kloniert und für die folgende Arbeit zur Verfügung gestellt. Der Originalklon mit dem Gen für *CyaB1* (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. D89623) wurde von Prof. Ohmori, Tokio zur Verfügung gestellt.

Die Nummerierung der Schnittstellen wurde relativ zum Start des eingebauten Inserts (*CyaB1*, *PDE5A1*) ermittelt. Grau hinterlegte Schnittstellen liegen im verwendeten Vektor. Durchgestrichene Schnittstellen wurden herausmutiert oder durch Ligation auf andere Schnittstellen vernichtet (wenn oberhalb und unterhalb des Schemas eine Schnittstelle angegeben ist). Sie können bei einer weiteren Verwendung dieses Klones von Bedeutung sein. PCR-Produkte sind dunkelgrau unterlegt und durch gestrichelte Kästen markiert. Bei *CyaB1*-rPDE2a-Mutanten sind *CyaB1*-PCR-Teile schwarz, rPDE2a-PCR-Teile hellgrau dargestellt. Exprimierte Konstrukte sind durch einen Kasten gekennzeichnet. Das Stop-Codon wurde zusätzlich zu den Restriktionsstellen angegeben, um seine Lage in Bezug auf einzelne Schnittstellen darzustellen. Die Nummerierung der Klone mit #/arabischen Ziffern oder Kleinbuchstaben zeigt, welcher Klon weiterverwendet wurde. DK gibt die Nummer der Dauerkultur des entsprechenden Klones an. EK steht für Einzelklon.

Durch Klonierung in die Expressionsvektoren *pQE30*, *pET16b* und *pET16bMCS-pQE30* wurde allen exprimierten Proteinen N-terminal die AS-Sequenz *MRGSHHH-HHHGS* angehängt, diese Sequenz diente zur Reinigung mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-Affinitätschromatographie.



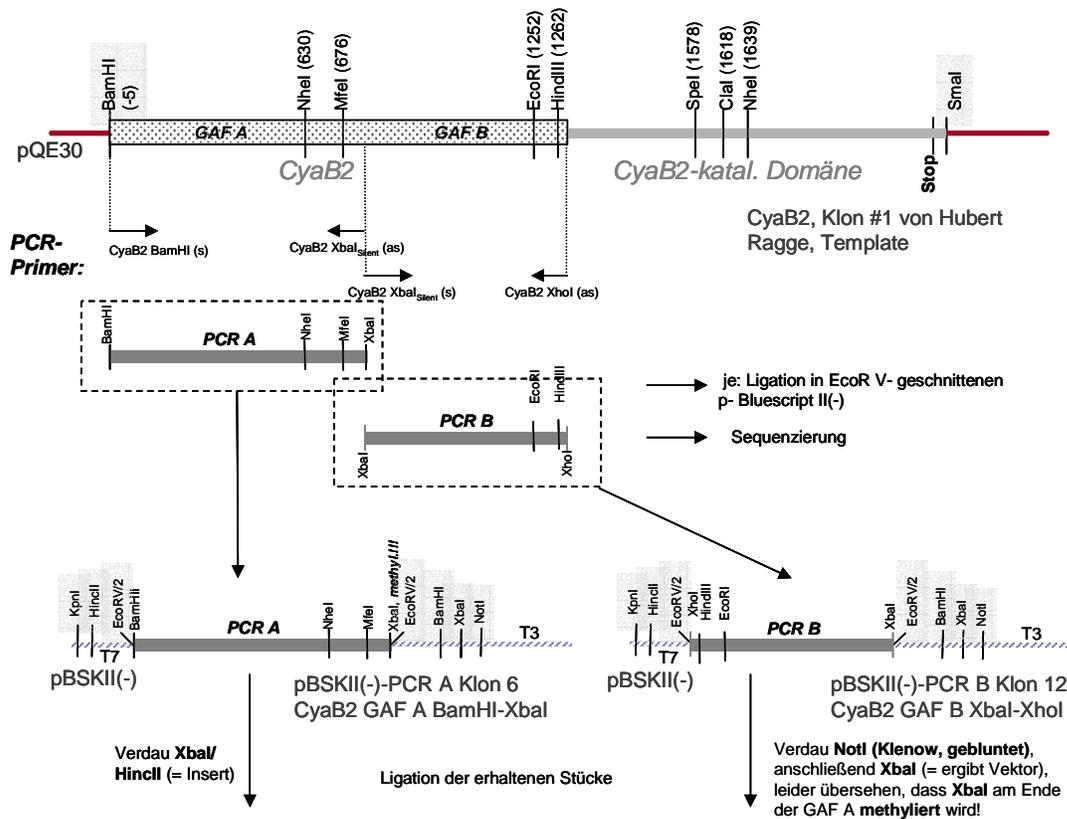


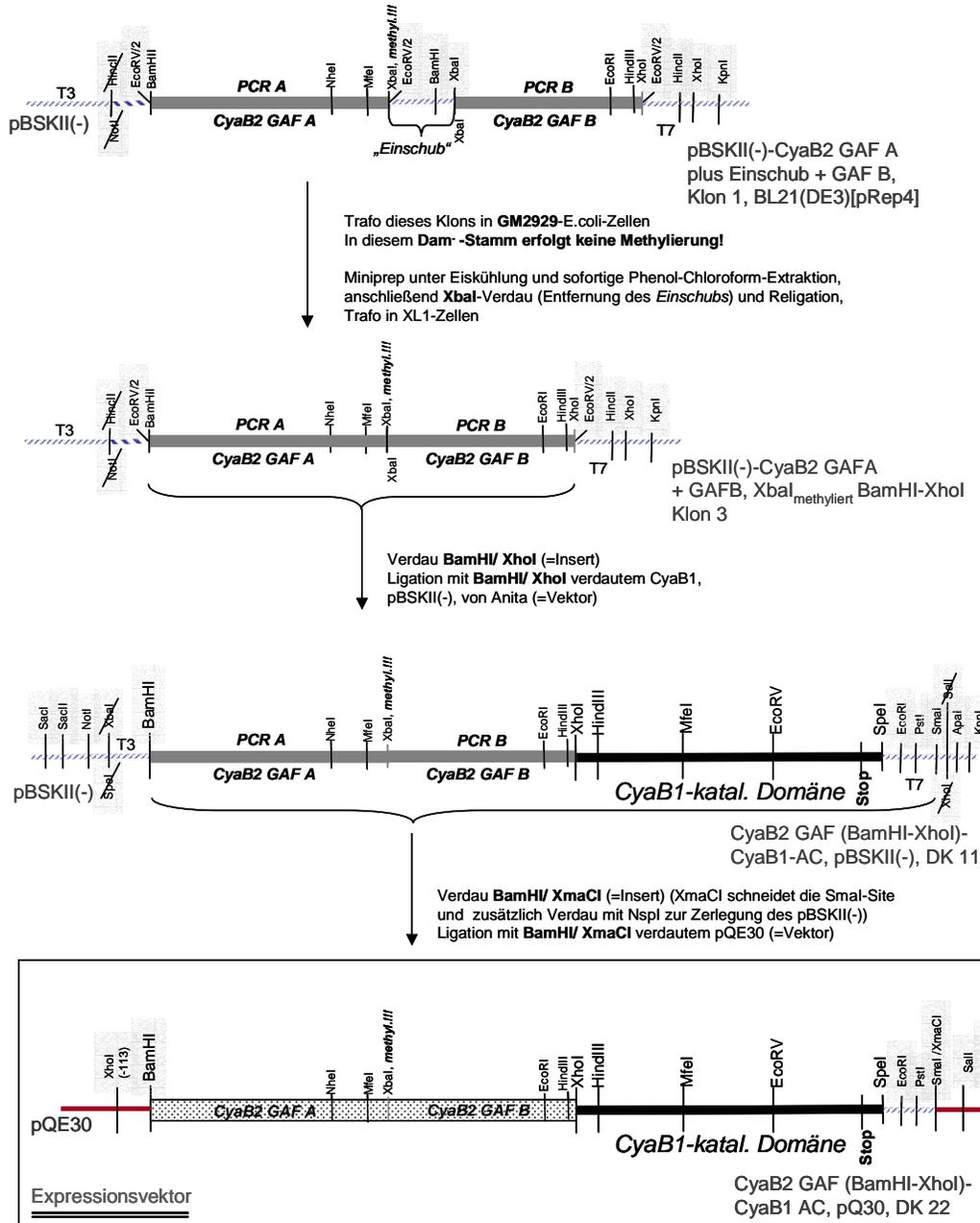


### 3.14.2 CyaB2–CyaB1 AC–Konstrukte

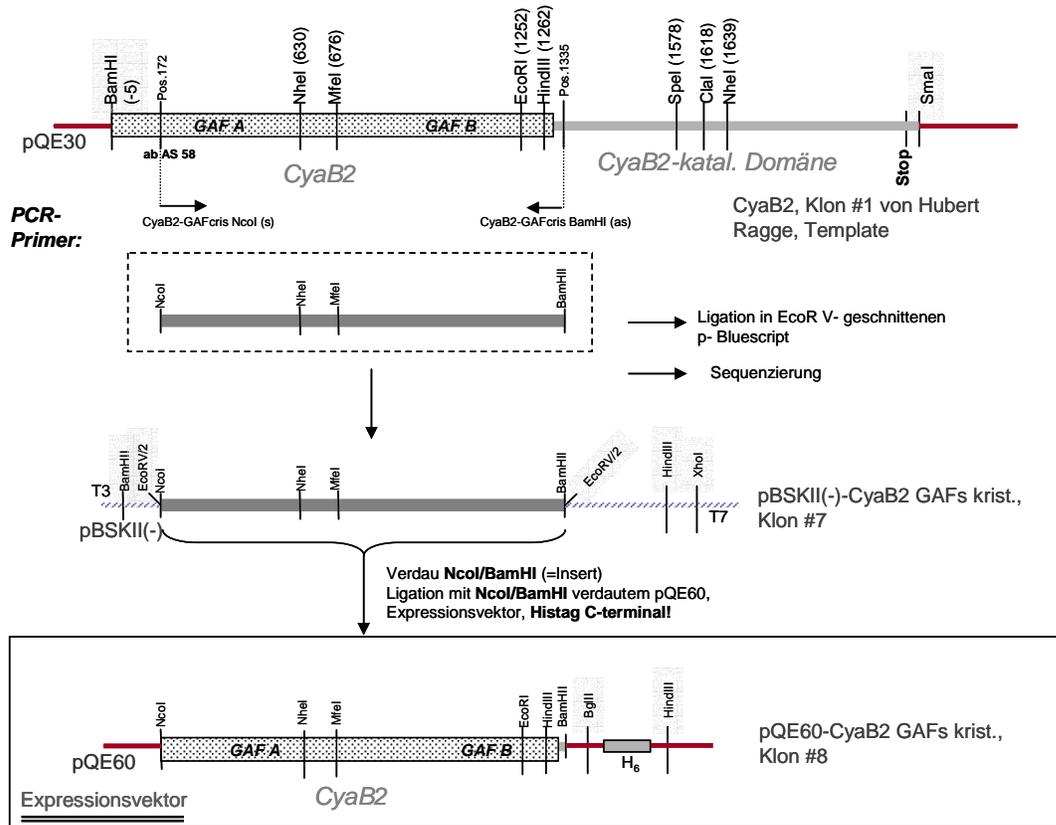
Bis auf den *CyaB2* GAF–*CyaB1* AC-Klon wurden alle Konstrukte von Anita Schultz kloniert. Die Expression der Konstrukte in *pQE30* und *pQE60* erfolgte in *BL21(DE3)* [*pRep4*]-Zellen, die der Konstrukte im *pET16b* in *BL21(DE3)*[*pLysS*].

#### 3.14.2.1 CyaB2 GAF–CyaB1 AC

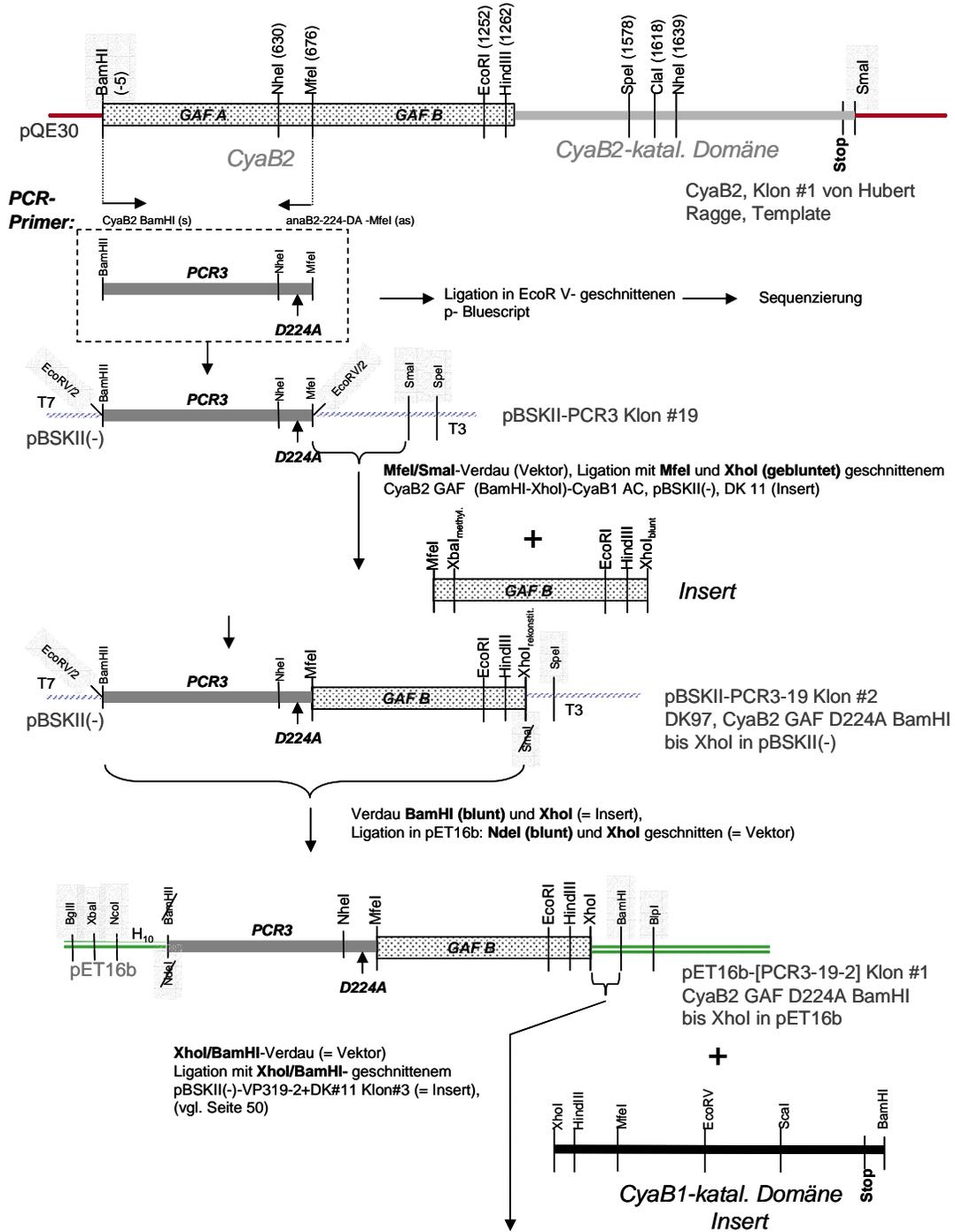


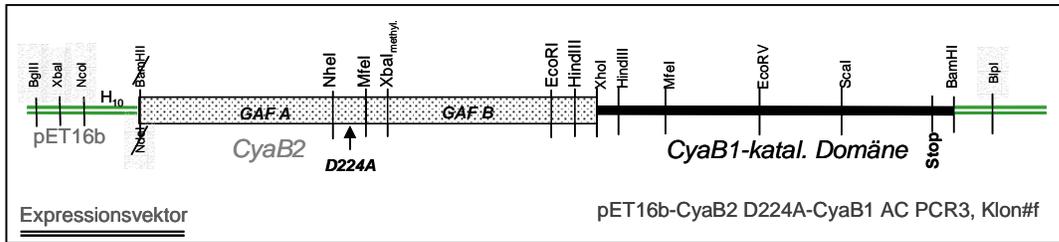


## 3.14.2.2 CyaB2 GAF A/B-Kristallisationskonstrukt

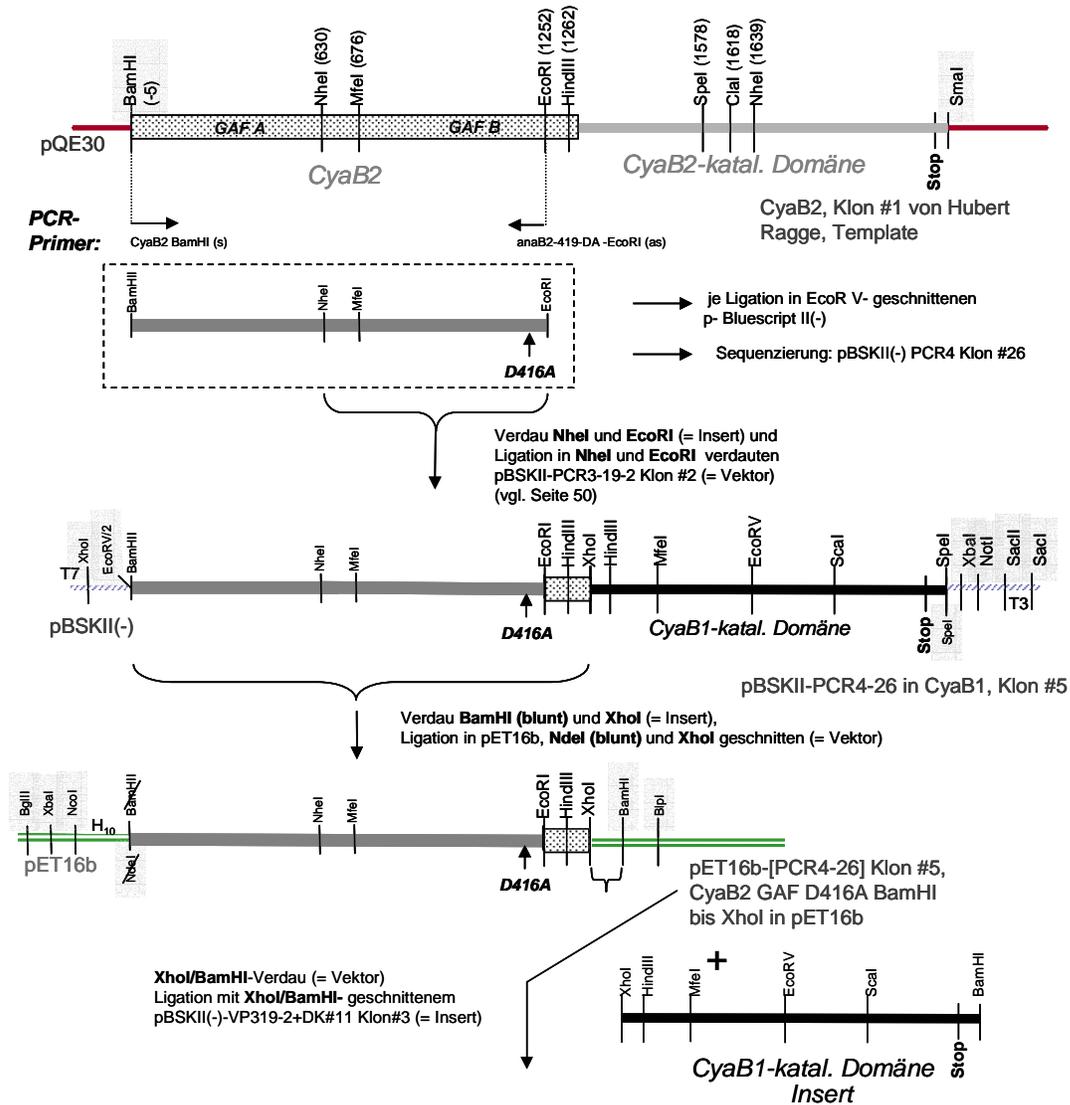


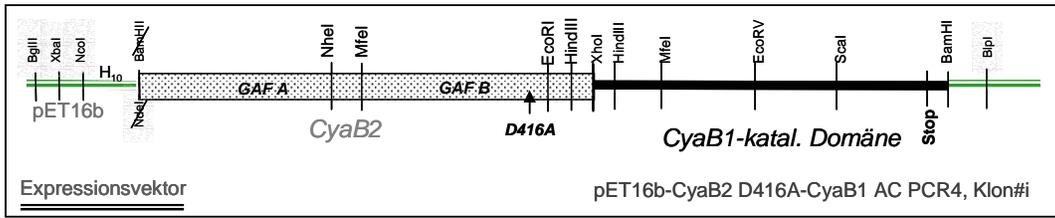
### 3.14.2.3 CyaB2-D224A-CyaB1 AC



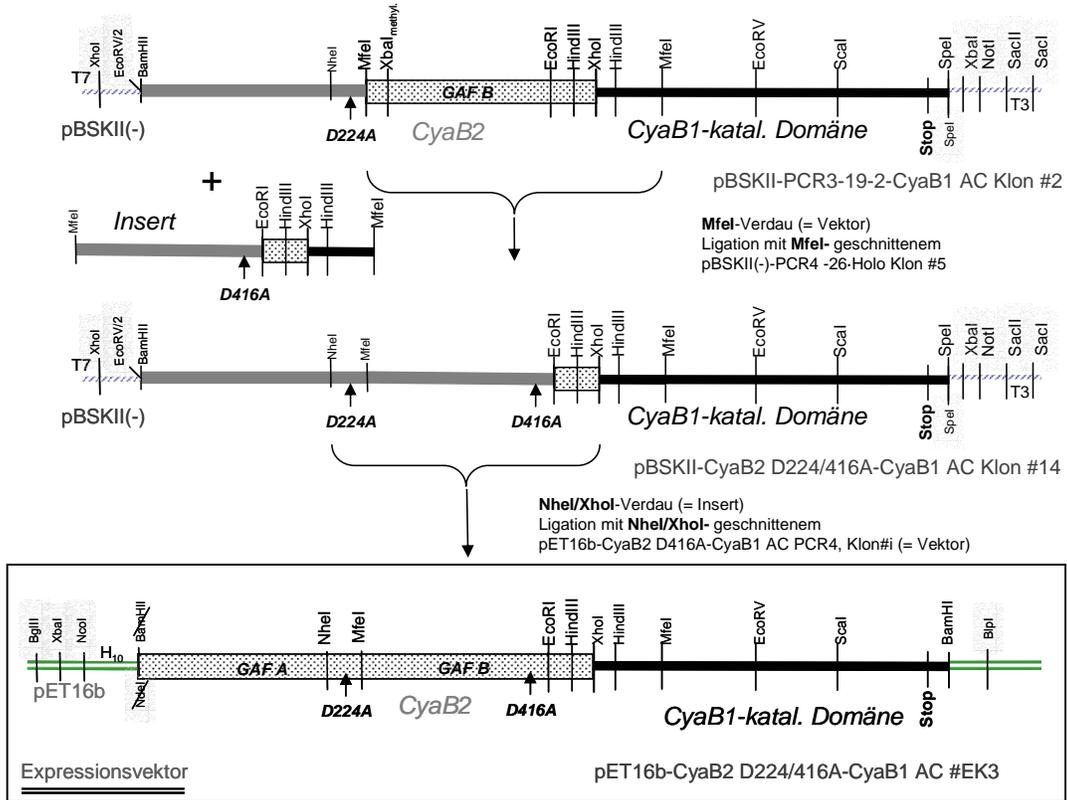


### 3.14.2.4 CyaB2-D416A-CyaB1 AC

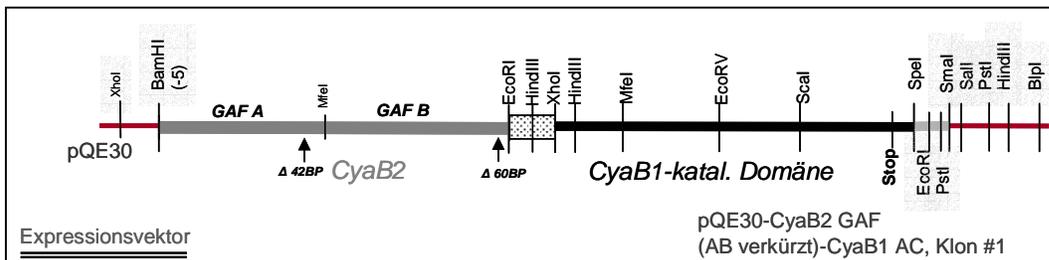
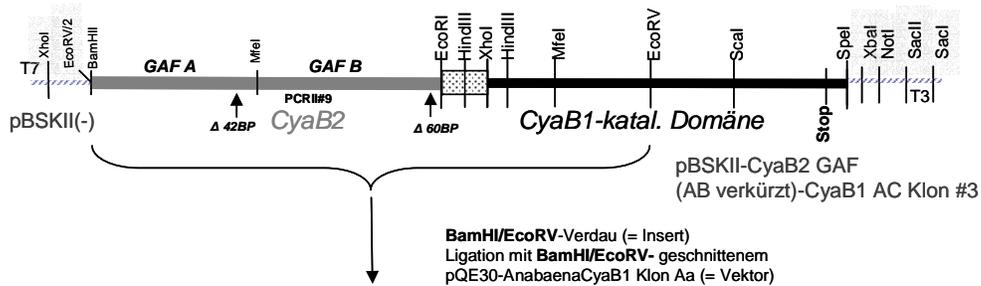
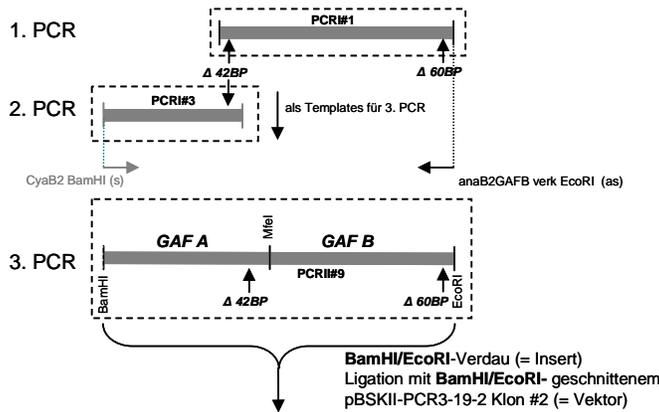
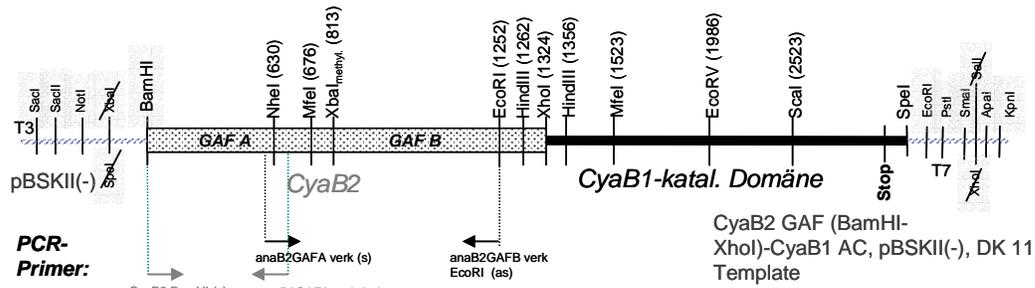




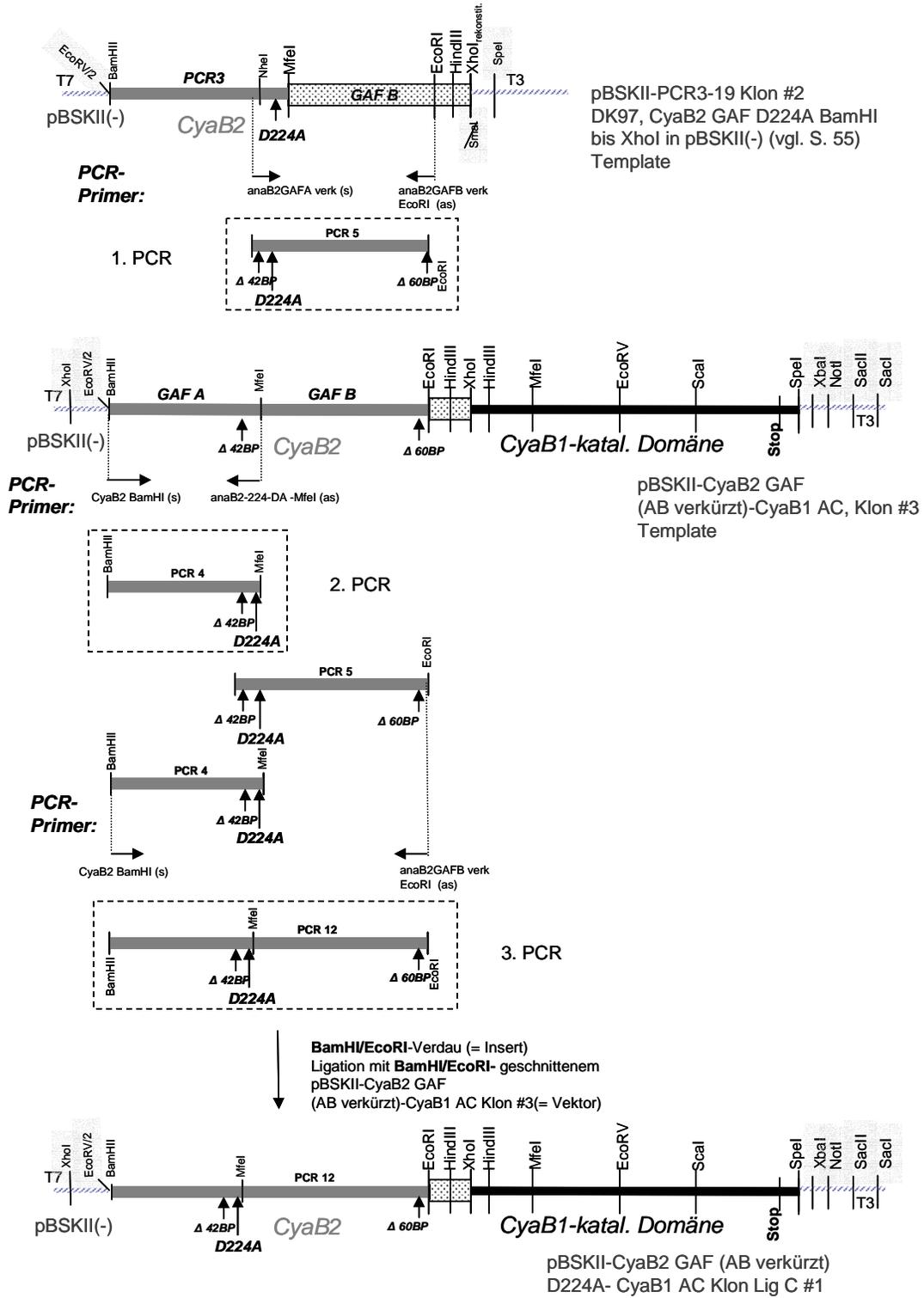
### 3.14.2.5 CyaB2-D224/D416A-CyaB1 AC

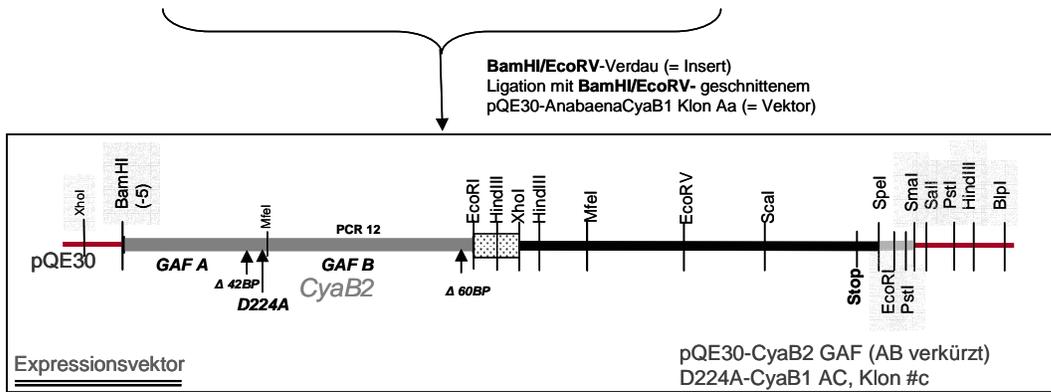


### 3.14.2.6 CyaB2-GAFs verkürzt-CyaB1 AC [ $\Delta$ L202 bis I215, $\Delta$ L389 bis C407 und K388G]



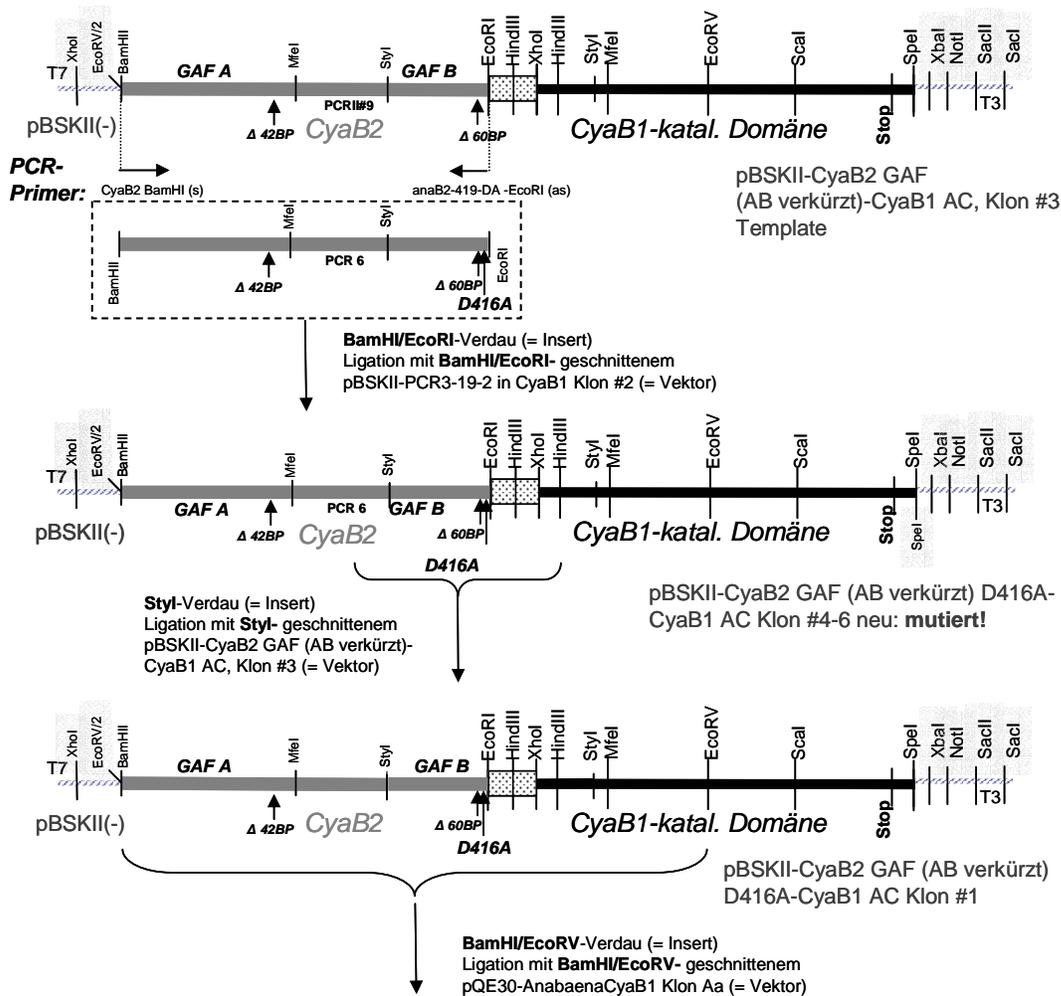
### 3.14.2.7 CyaB2-GAFs verkürzt D224A-CyaB1 AC [ΔL202 bis I215, ΔL389 bis C407, K388G und D224A]

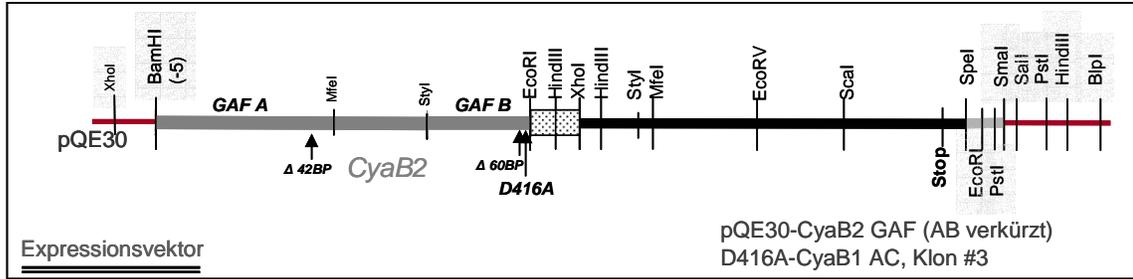




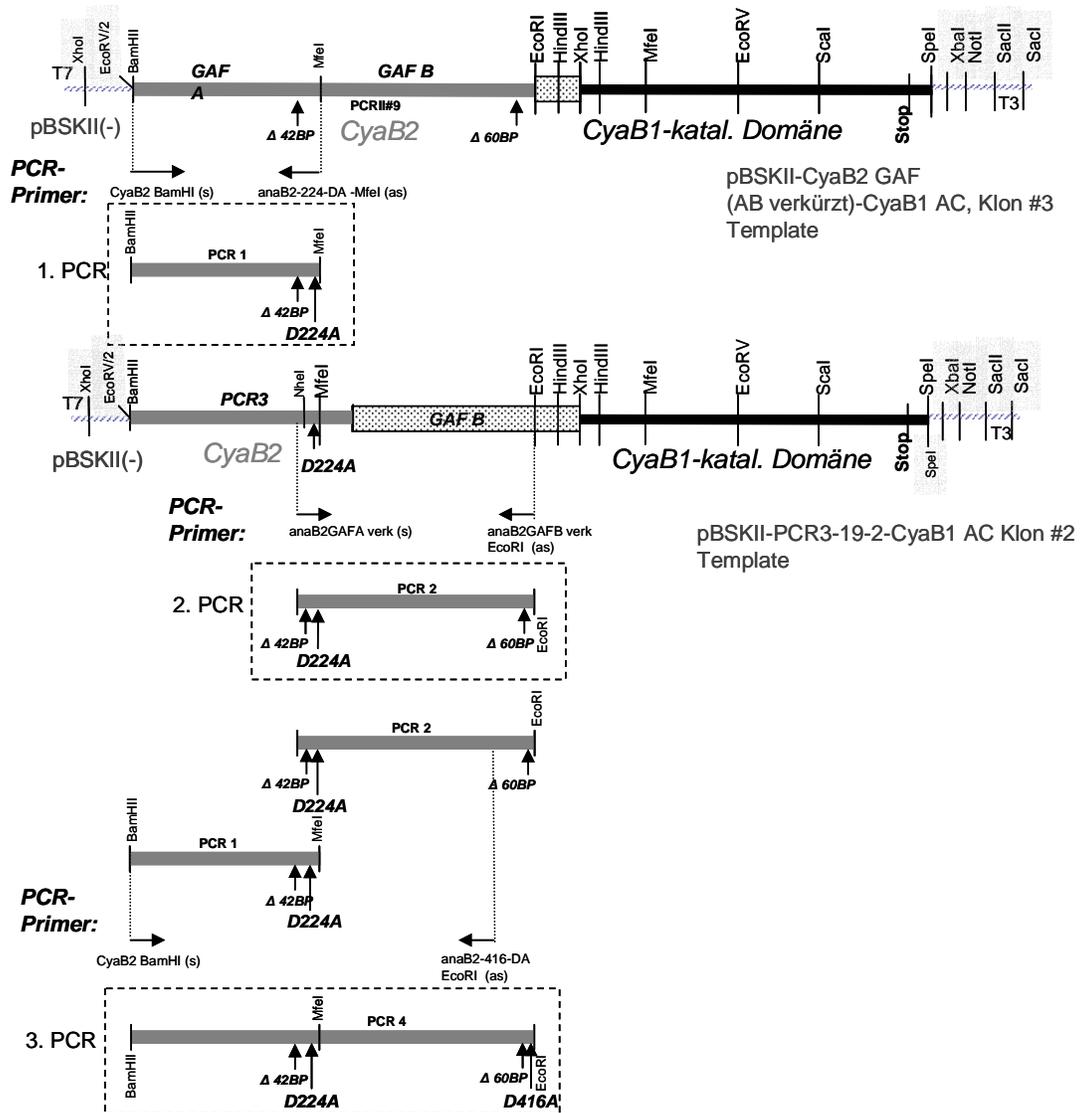
### 3.14.2.8 CyaB2-GAFs verkürzt D416A-CyaB1 AC

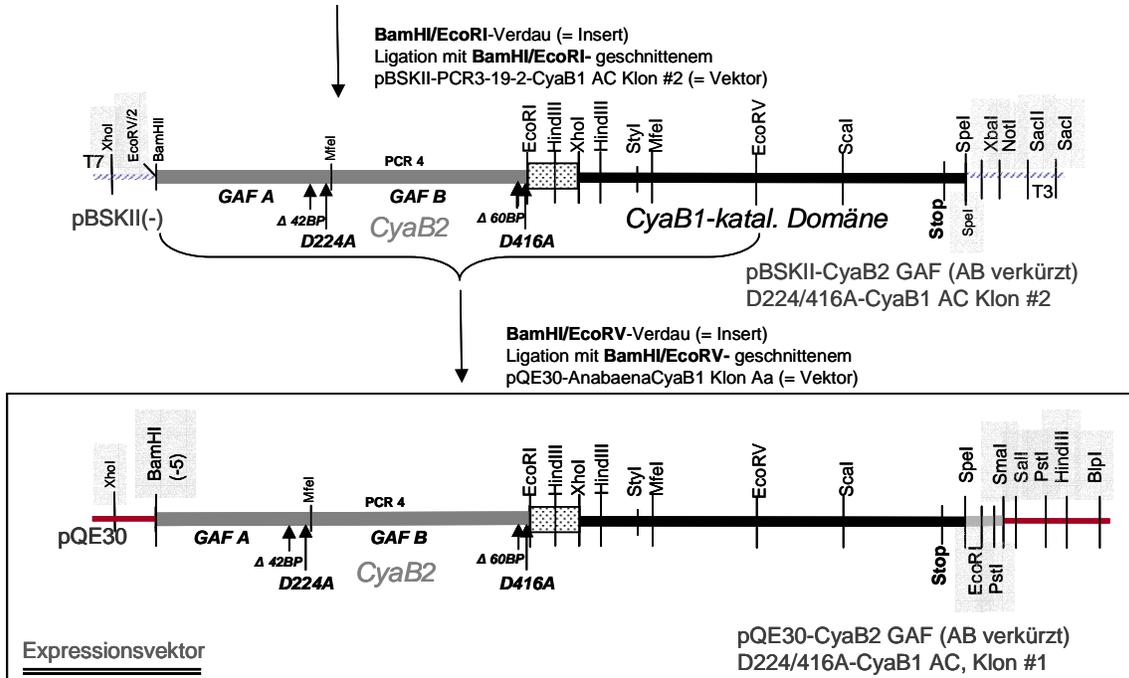
[ $\Delta$ L202 bis I215,  $\Delta$ L389 bis C407, K388G und D416A]





### 3.14.2.9 CyaB2-GAFs verkürzt D224/D416A-CyaB1 AC [ΔL202 bis I215, ΔL389 bis C407, K388G und D224A/D416A]

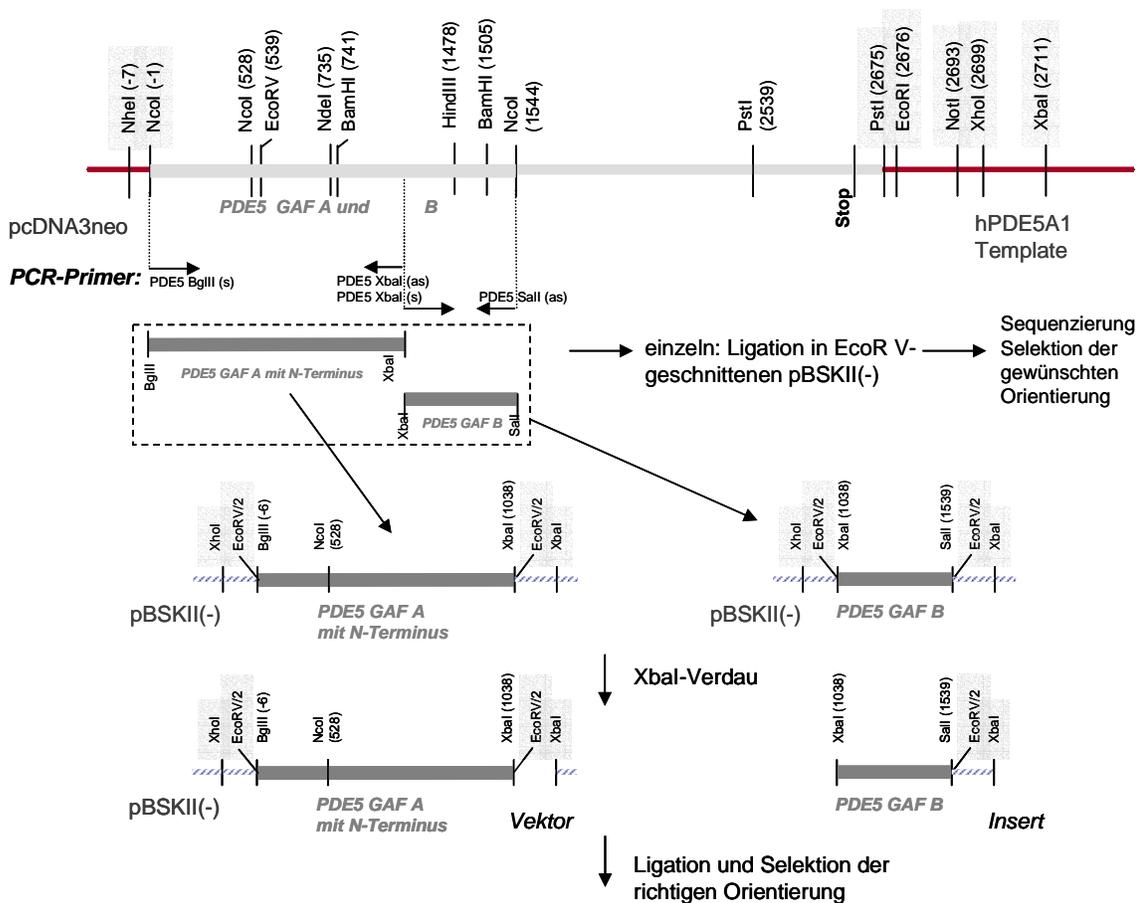


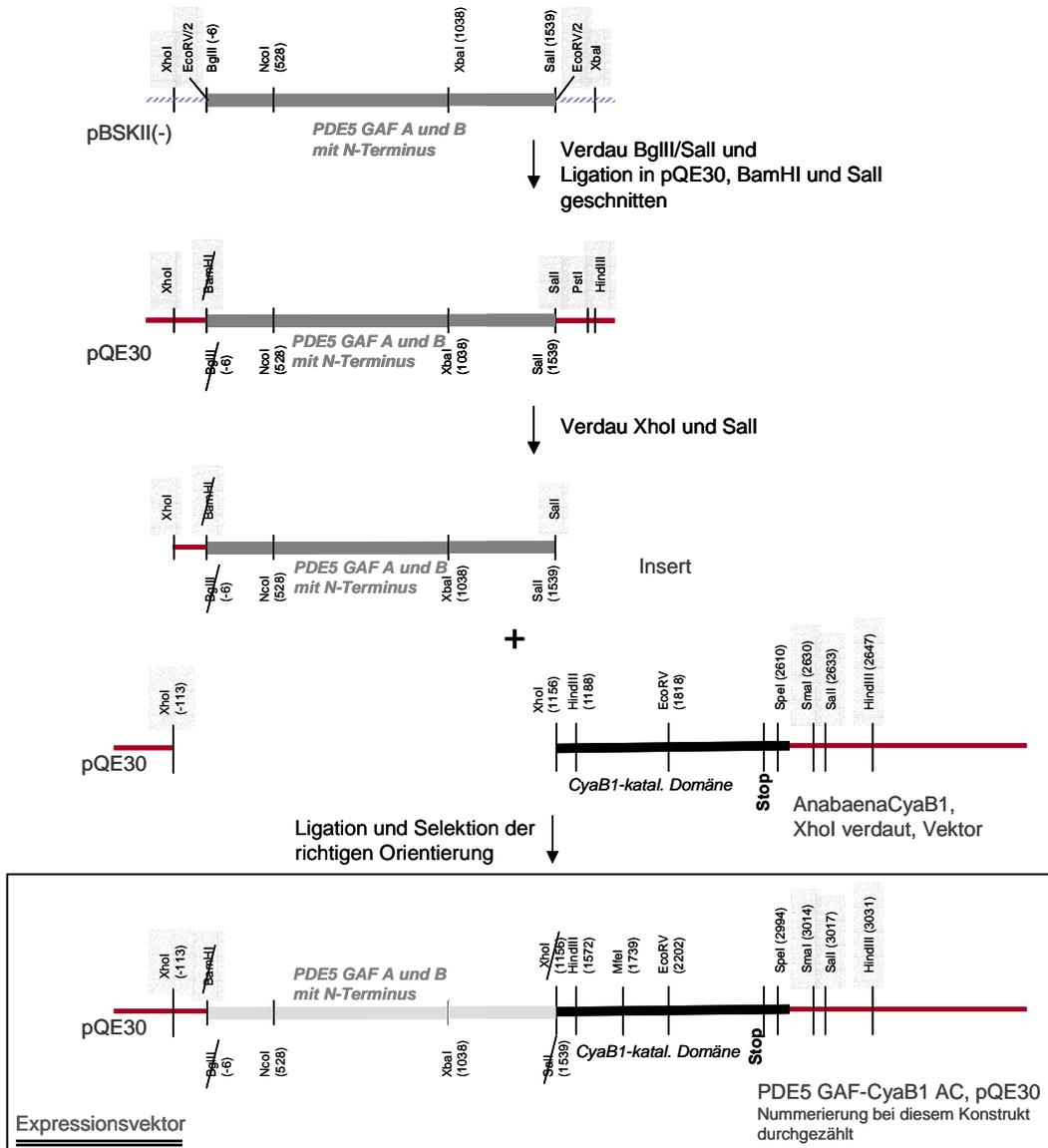


### 3.14.3 PDE5-Konstrukte

Bei PDE5 GAF-CyaB1 AC wurde *pQE30* als Expressionsvektor verwendet, alle weiteren PDE5-Mutanten ließen sich jedoch nicht im *pQE30* klonieren, weshalb die Konstrukte im *pET16b-MCSpQE30*-Vektor zusammengebaut wurden. Für die Klonierung in *pBSKII(-)* und *pQE30* wurden *XLI*-Zellen, für die Klonierung im *pET16b-MCSpQE30 DH5 $\alpha$* -Zellen verwendet. *DH5 $\alpha$* -Zellen haben den Vorteil, dass sie größere Plasmide wie *pET16b-MCSpQE30* (5634 BP) besser aufnehmen. Alle Expressionsplasmide wurden in *BL21(DE3)[pRep4]* exprimiert.

#### 3.14.3.1 PDE5 GAF-CyaB1 AC



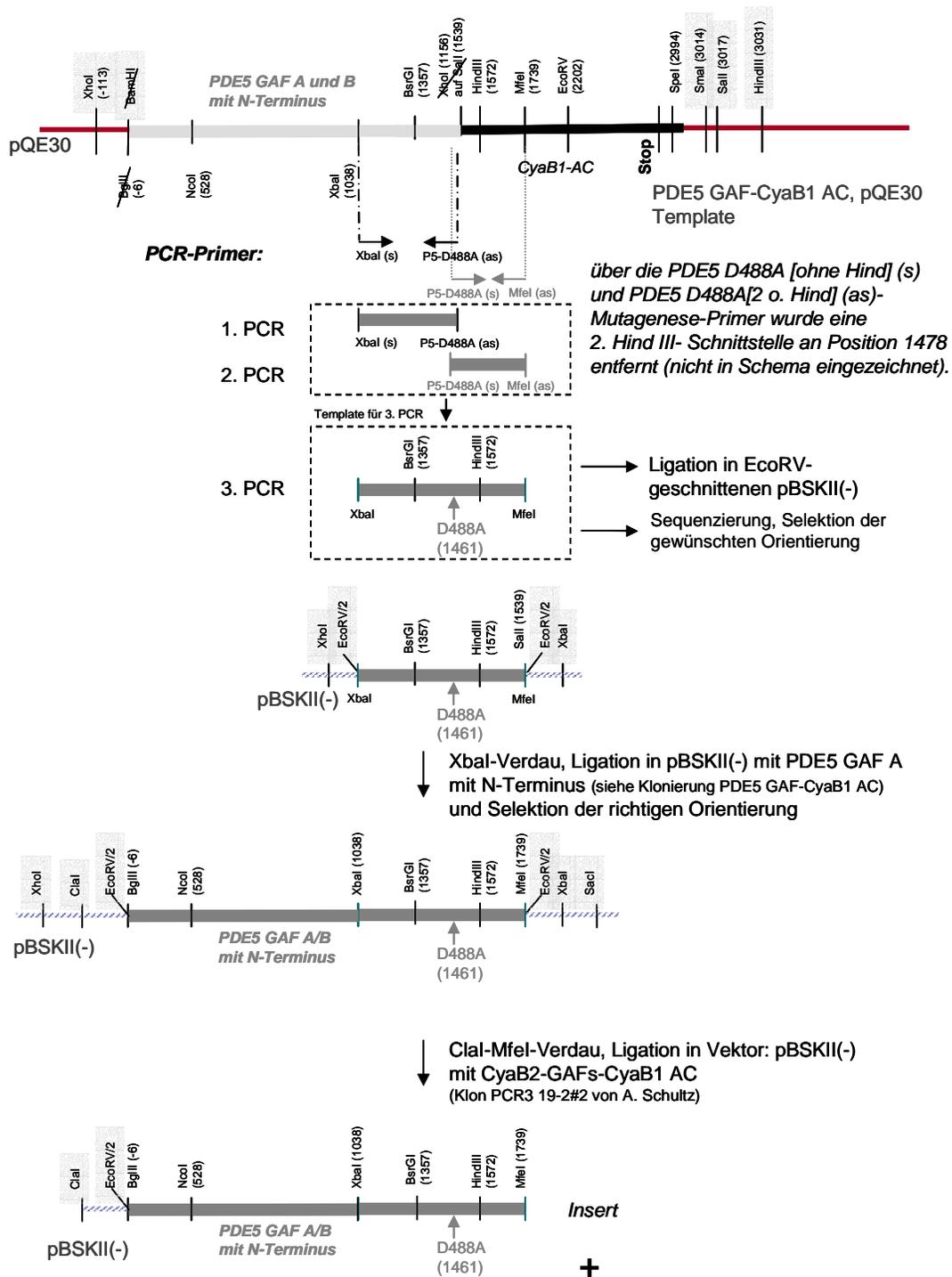


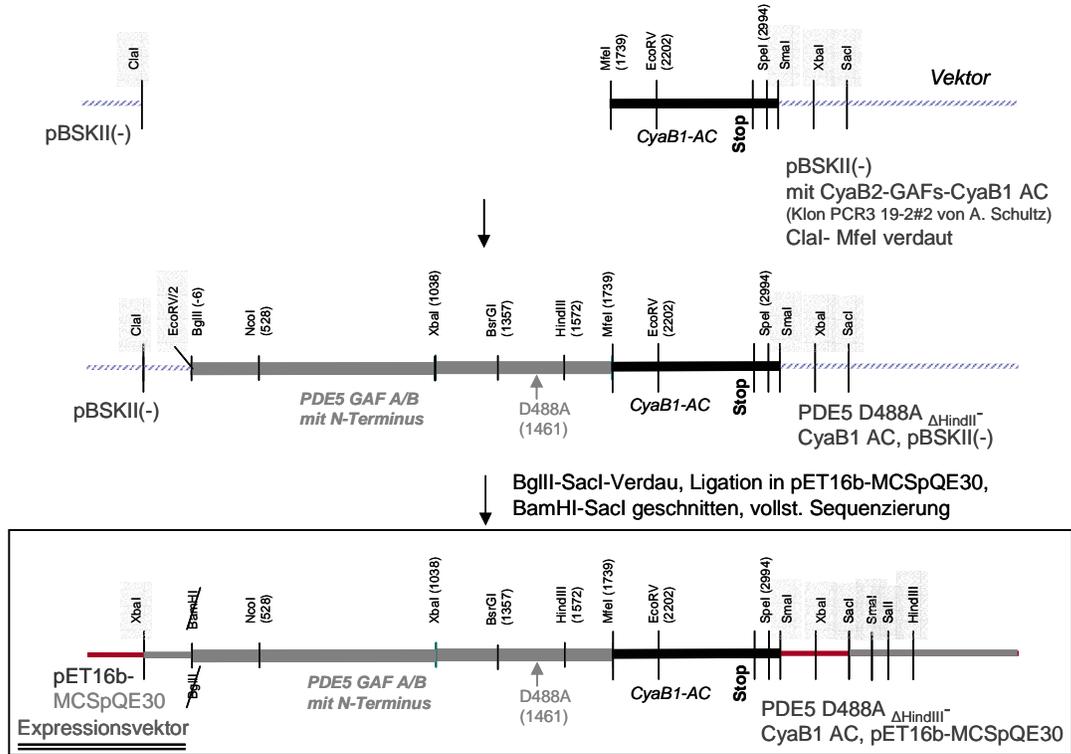
### 3.14.3.2 PDE5 D488A–CyaB1 AC

Bei allen Punktmutationen wurde als Technik die *Fusions-PCR* verwendet, hierbei enthielten die Mutagenese-Primer keine Schnittstellen sondern nur die für die Mutation zu veränderten Basenpaare. Es wurde je ein sense- und antisense-Primer mit der gewünschten Mutation benötigt. Es wurden je drei PCR-Reaktionen durchgeführt: 1.) Schnittstelle 1–Mutation, 2.) Mutation–Schnittstelle 2. Die beiden so erhaltenen PCR-Produkte wurden in sehr geringen Mengen als Template für die 3.) PCR zusammen mit den entsprechenden Primern eingesetzt.

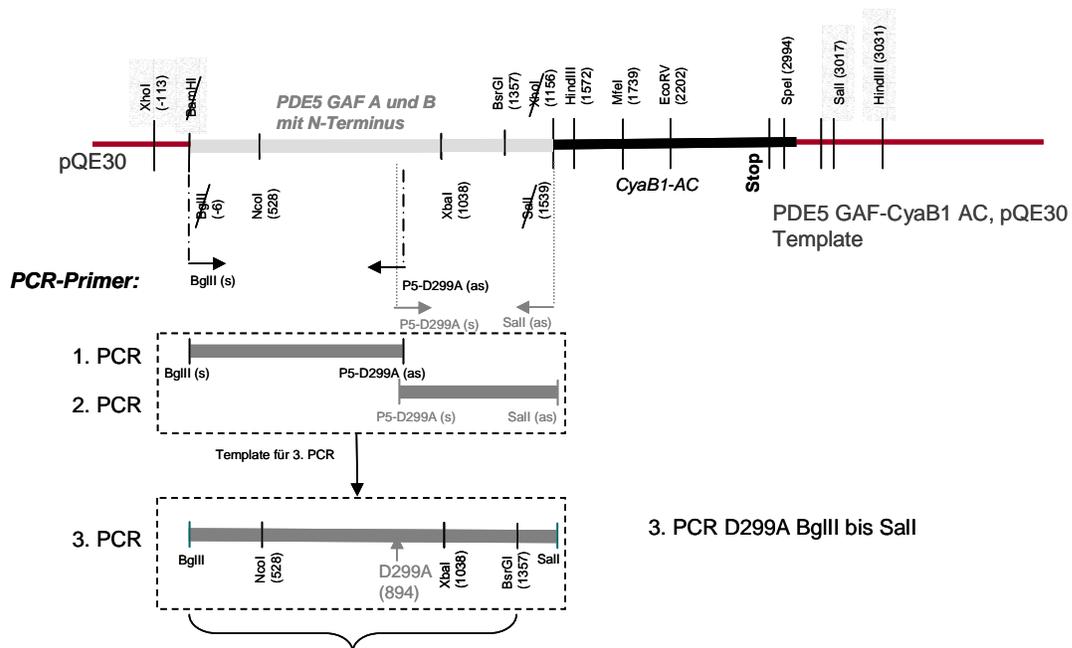
Für diesen Mechanismus dürfen am Anfang und Ende der erhaltenen PCR-Zwischen-

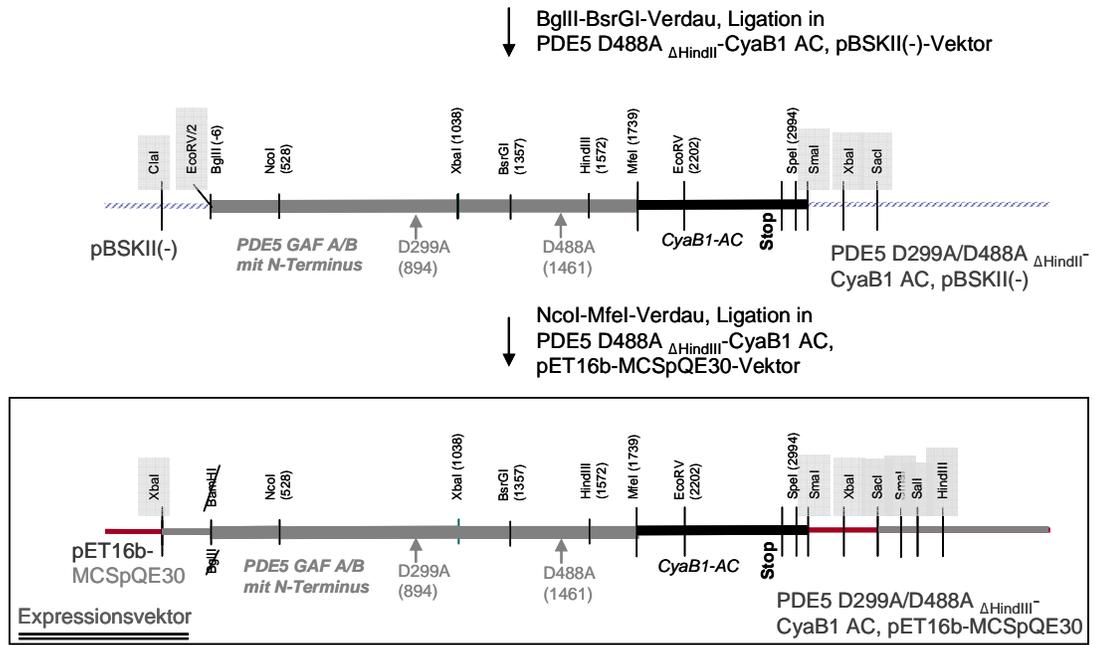
produkte keine Überhänge oder A's vorhanden sein, weswegen die PCRs mit der *Pfu-DNA-Polymerase* (und nicht mit der *Taq-DNA-Polymerase*) durchgeführt wurden.



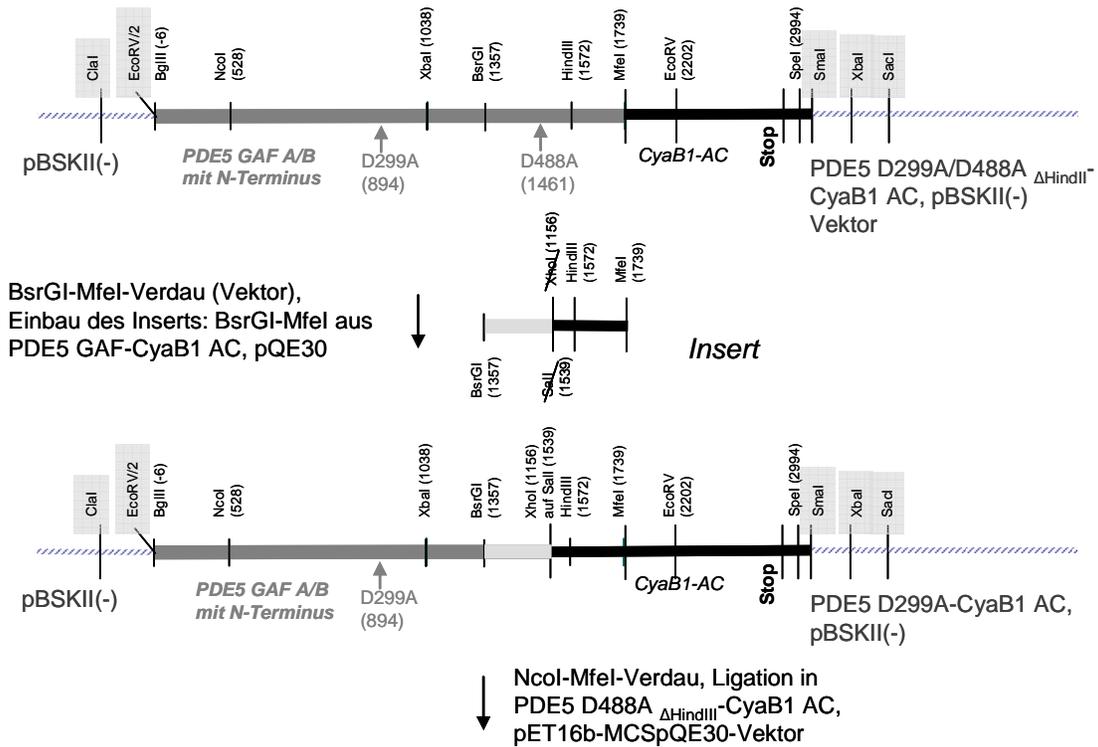


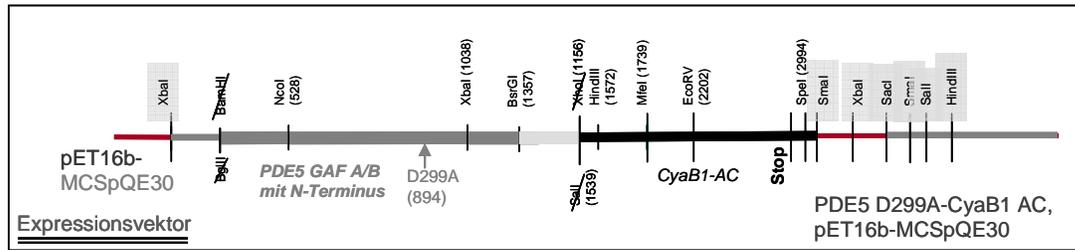
### 3.14.3.3 PDE5 D299A/D488A–CyaB1 AC



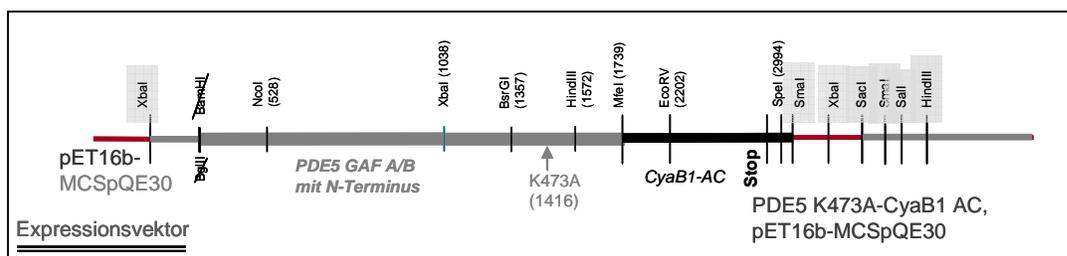
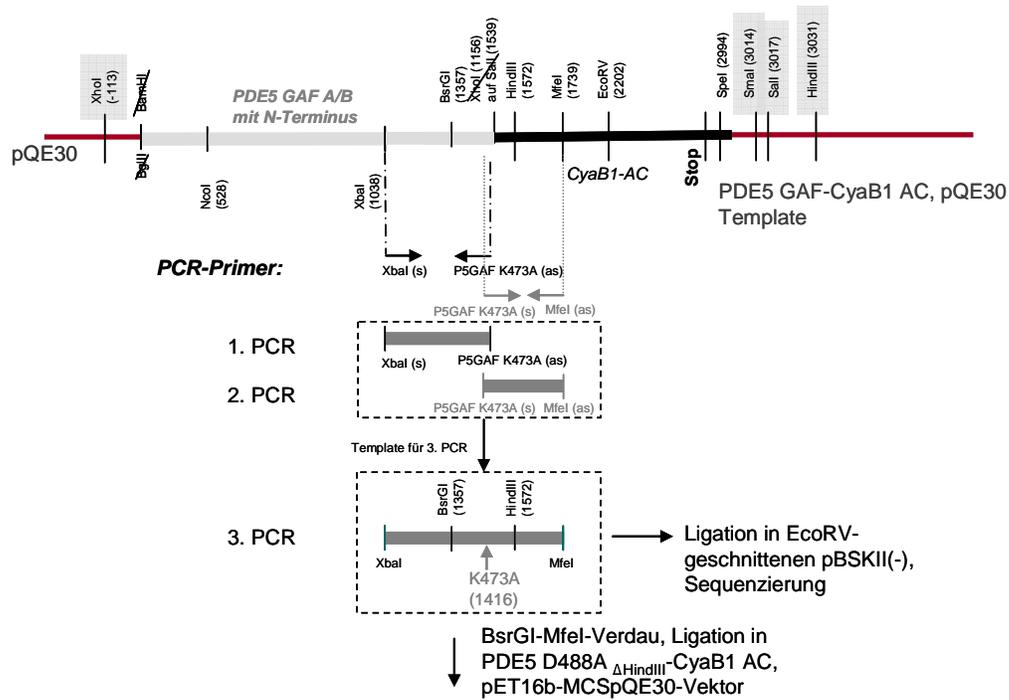


### 3.14.3.4 PDE5 D299A-CyaB1 AC

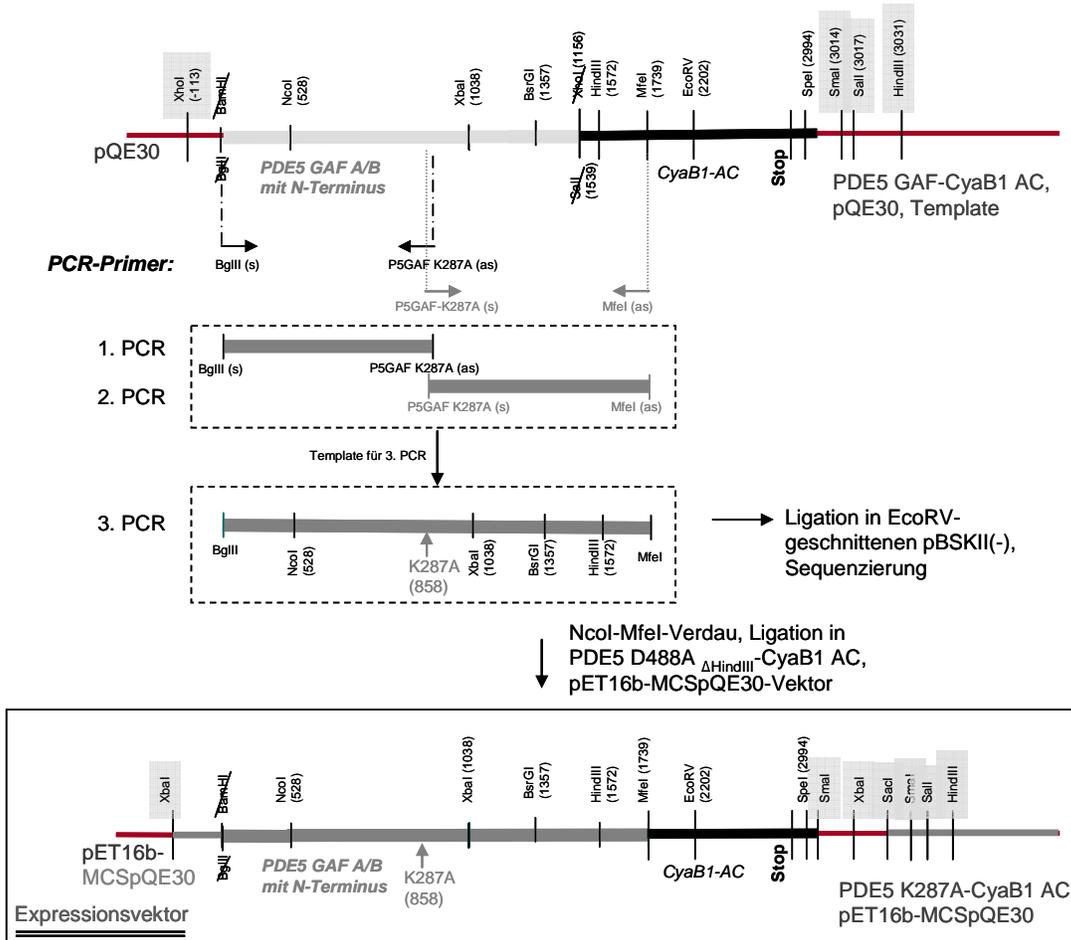




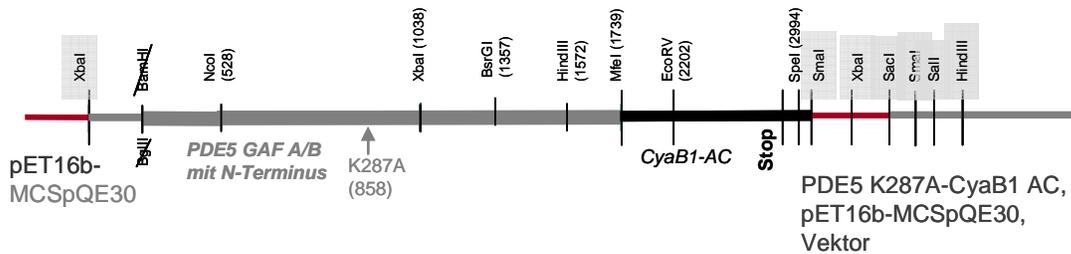
## 3.14.3.5 PDE5 K473A-CyaB1 AC



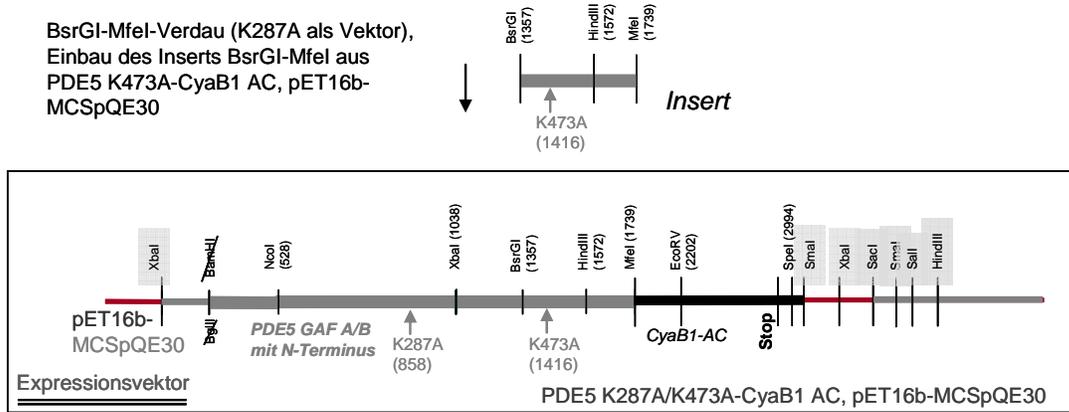
### 3.14.3.6 PDE5 K287A–CyaB1 AC



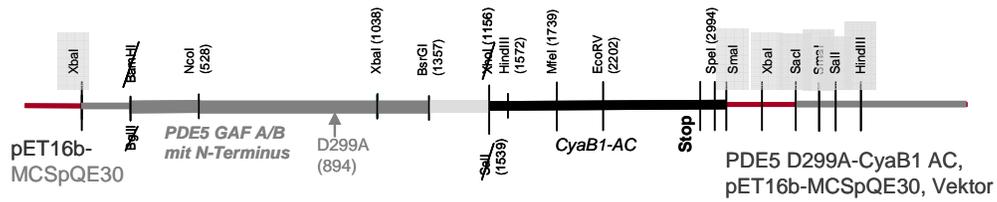
### 3.14.3.7 PDE5 K287A/K473A–CyaB1 AC



BsrGI-MfeI-Verdau (K287A als Vektor),  
Einbau des Inserts BsrGI-MfeI aus  
PDE5 K473A-CyaB1 AC, pET16b-  
MCSpQE30



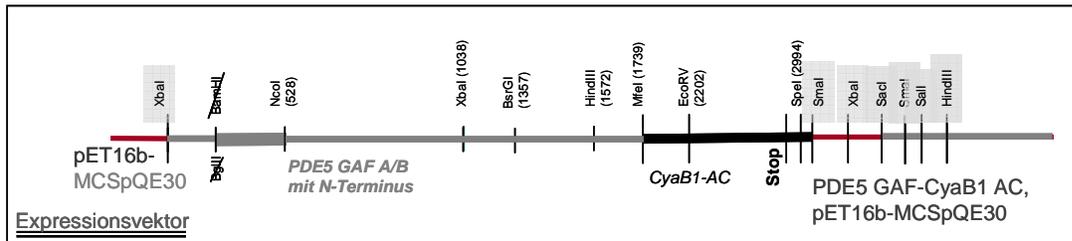
### 3.14.3.8 PDE5 GAF-CyaB1 AC, pET16b-MCSpQE30



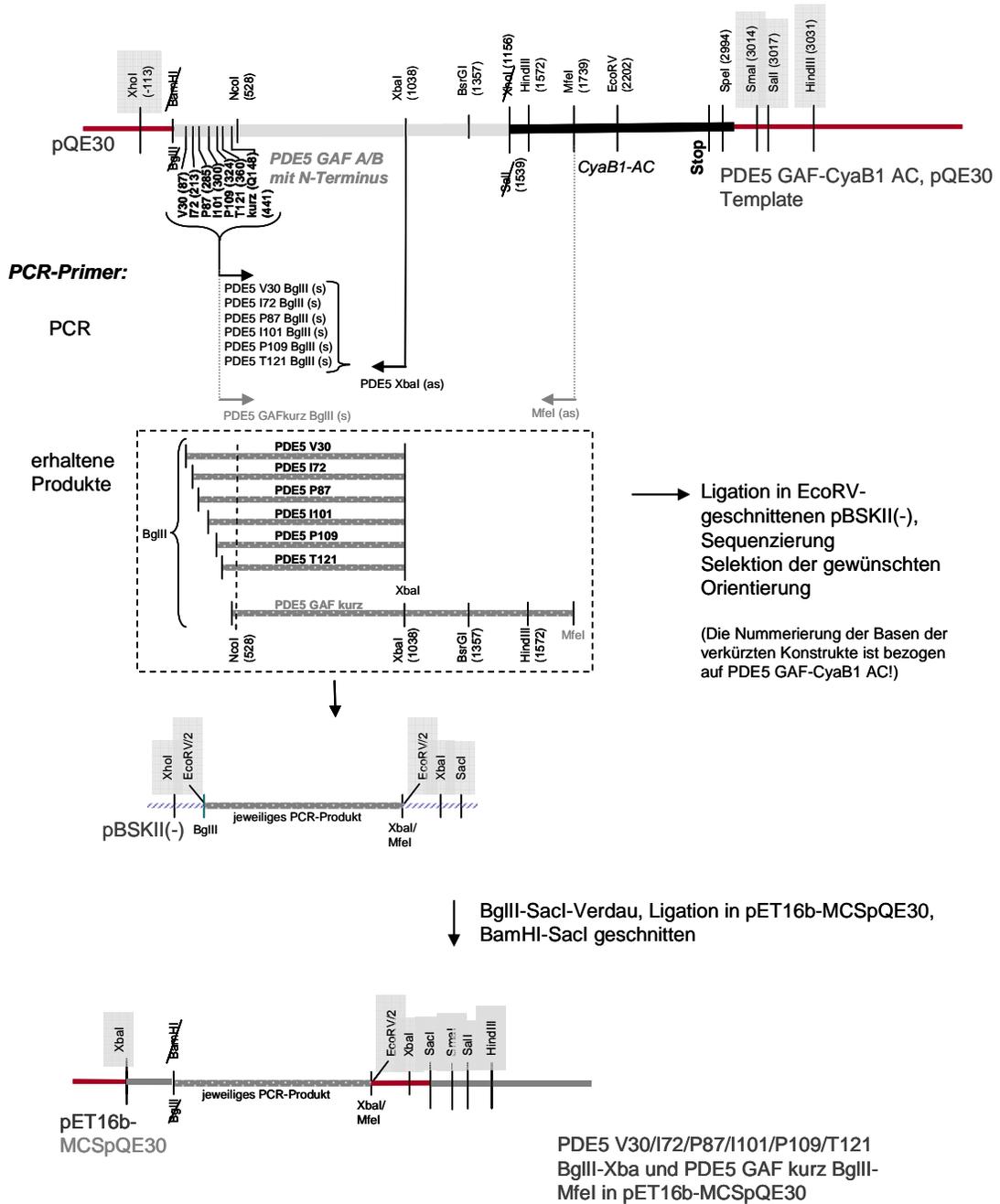
+  
**Insert**

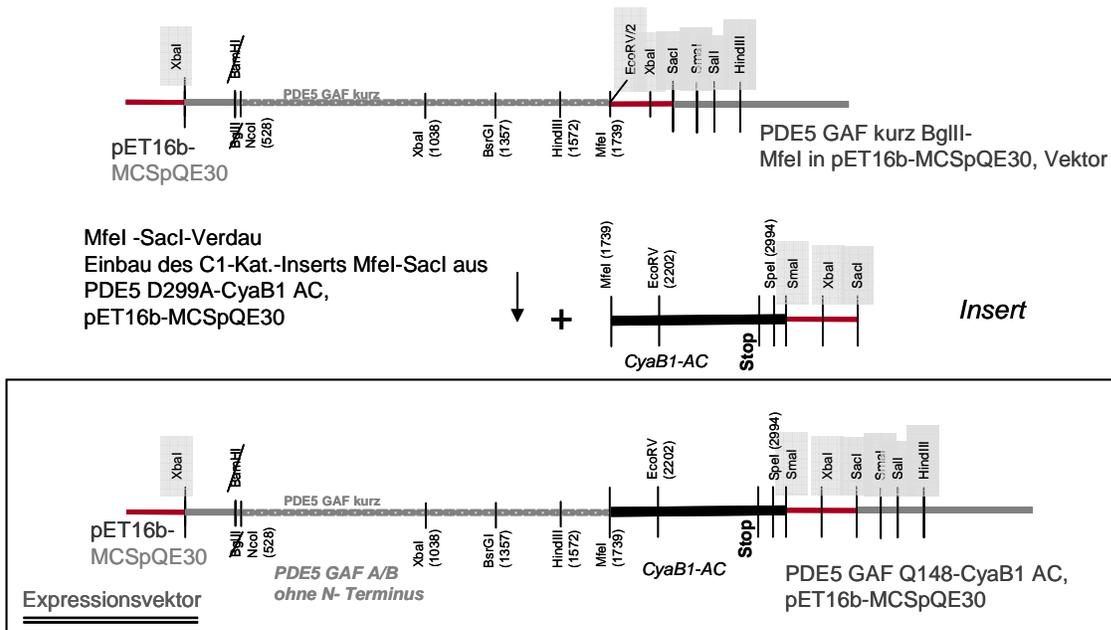
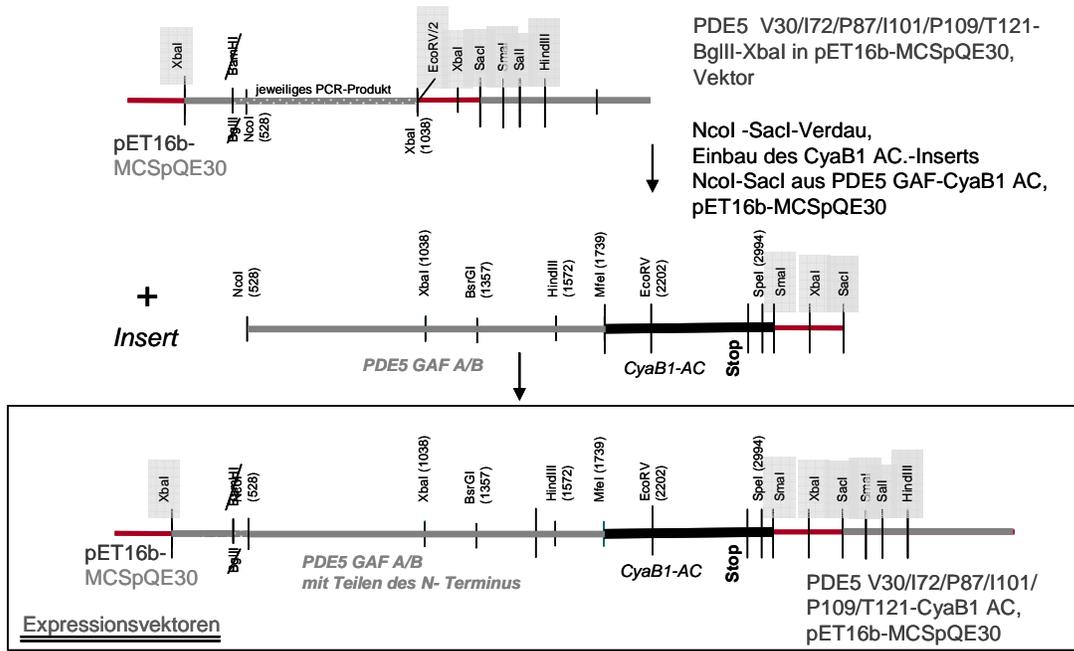
PDE5 GAF kurz

NcoI-MfeI-Verdau (D299A als Vektor),  
Einbau des Inserts NcoI-MfeI aus  
PDE5 GAF kurz PCR BglIII-MfeI, pBSKII(-)  
(s. folgende Seite)

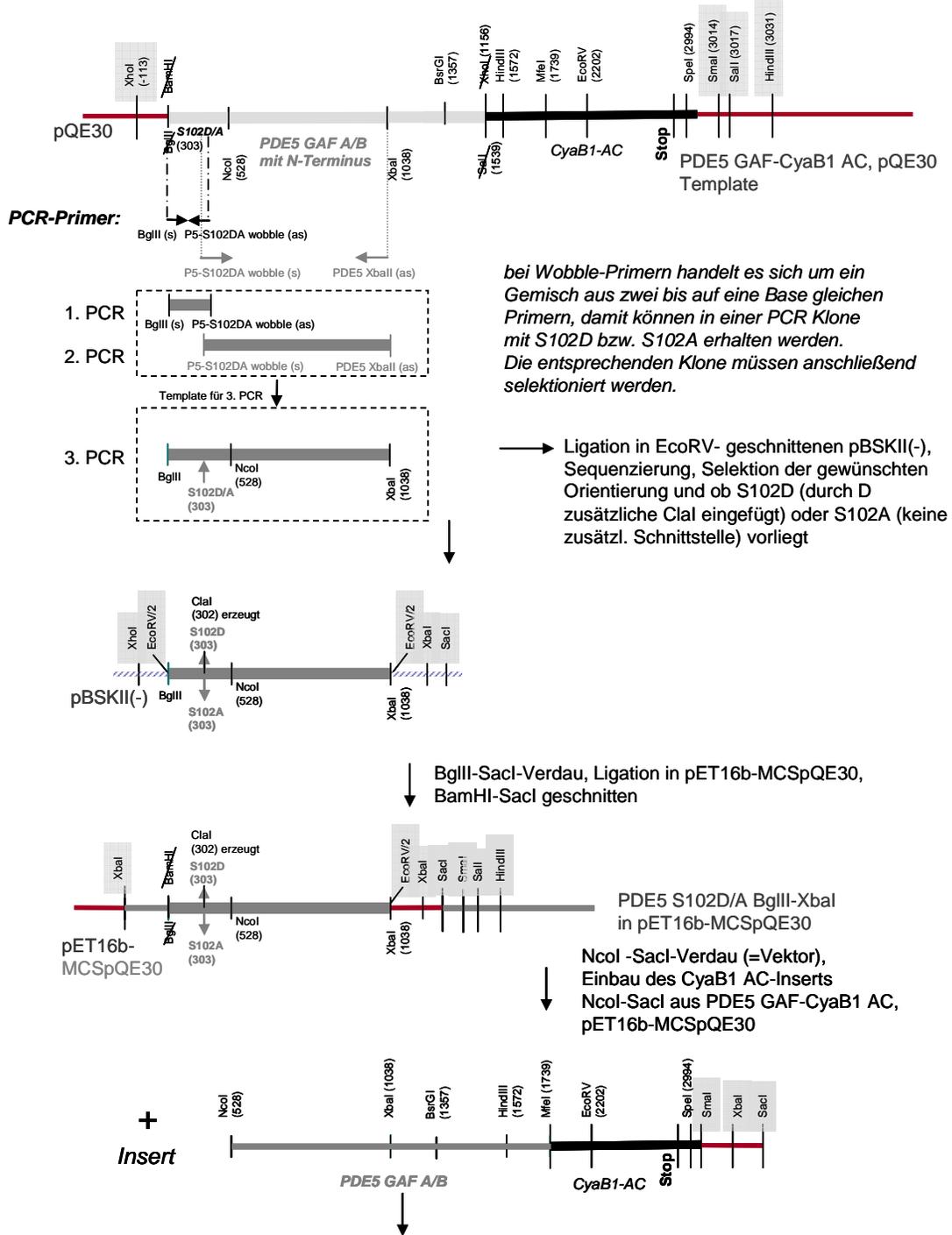


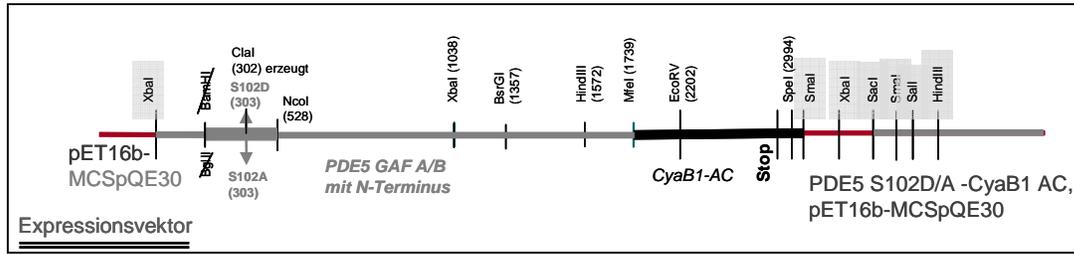
### 3.14.3.9 PDE5 N-terminal-verkürzte Konstrukte-CyaB1 AC



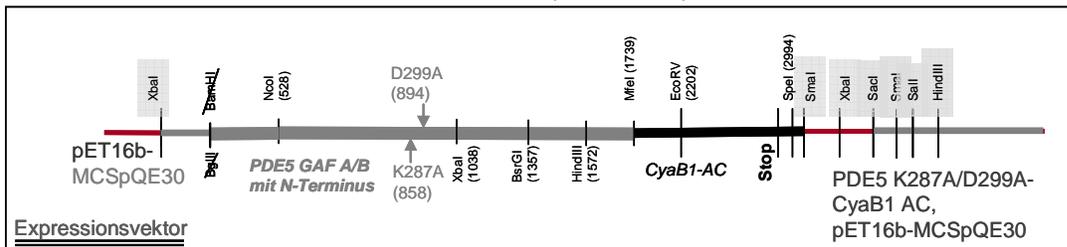
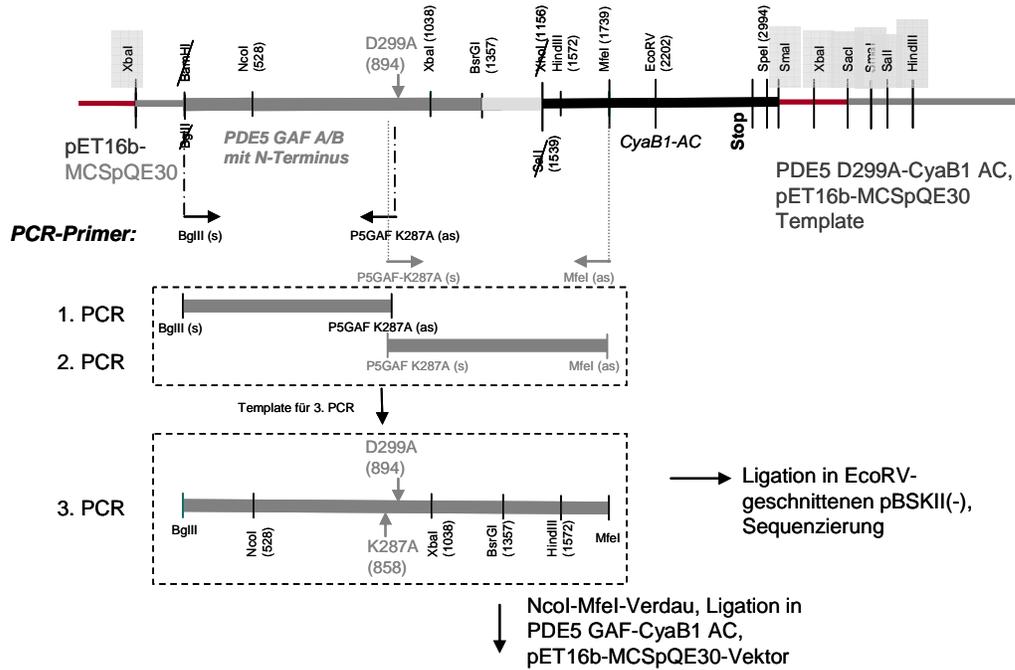


### 3.14.3.10 PDE5 S102D/A-CyaB1 AC

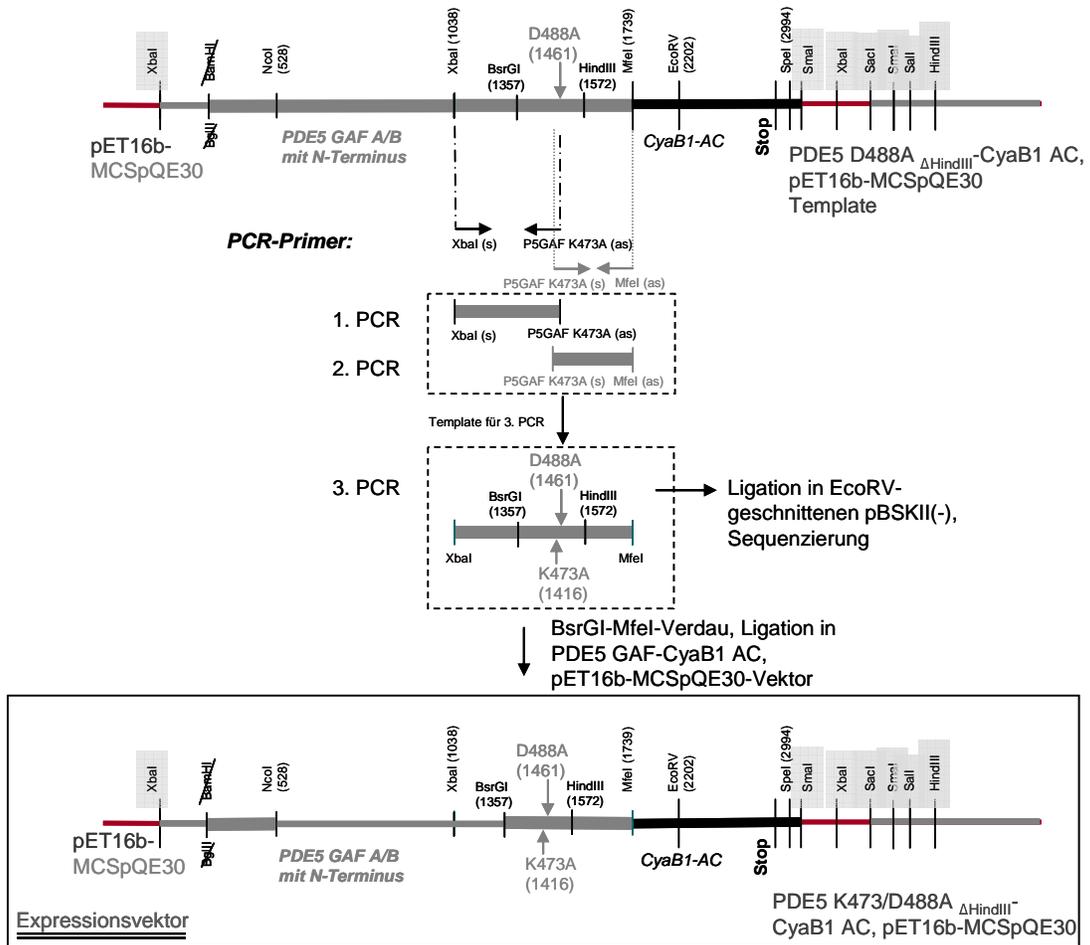




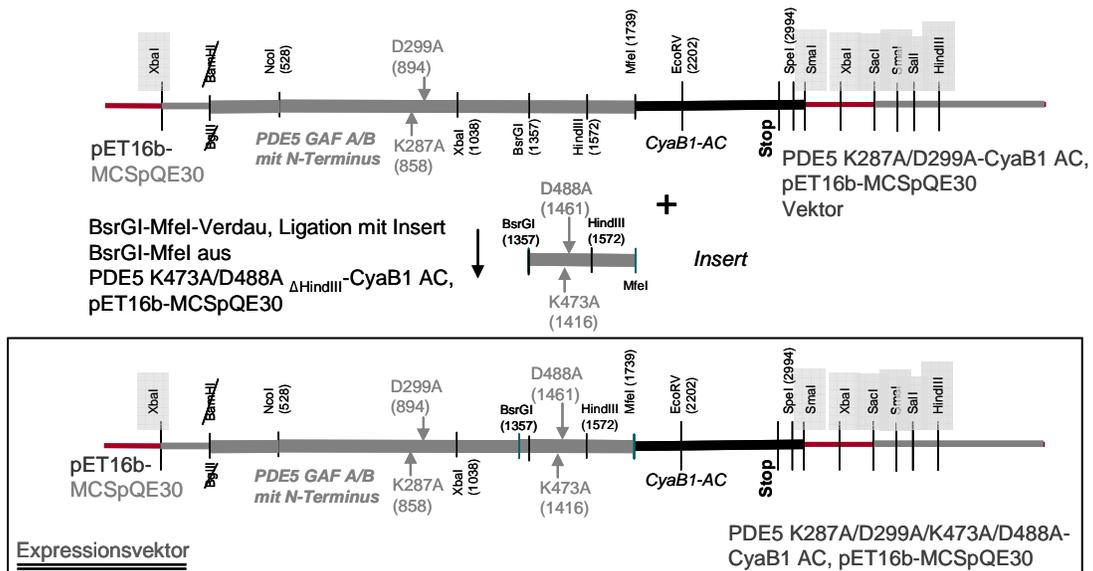
## 3.14.3.11 PDE5 K287A/D299A-CyaB1 AC



### 3.14.3.12 PDE5 K473A/D488A-CyaB1 AC



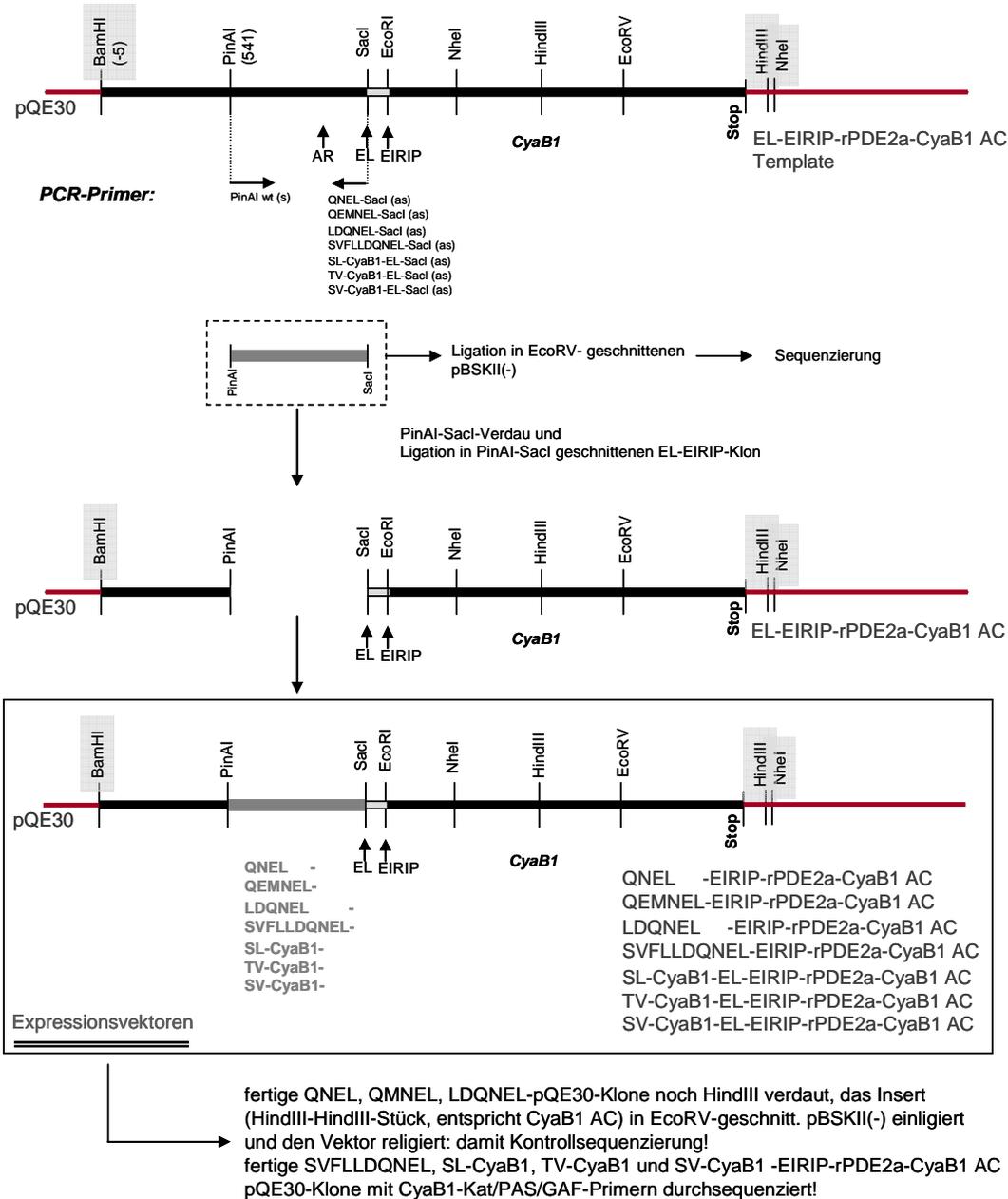
### 3.14.3.13 PDE5 K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC



### 3.14.4 CyaB1-[EL-EIRIP-PDE2]-Konstrukte

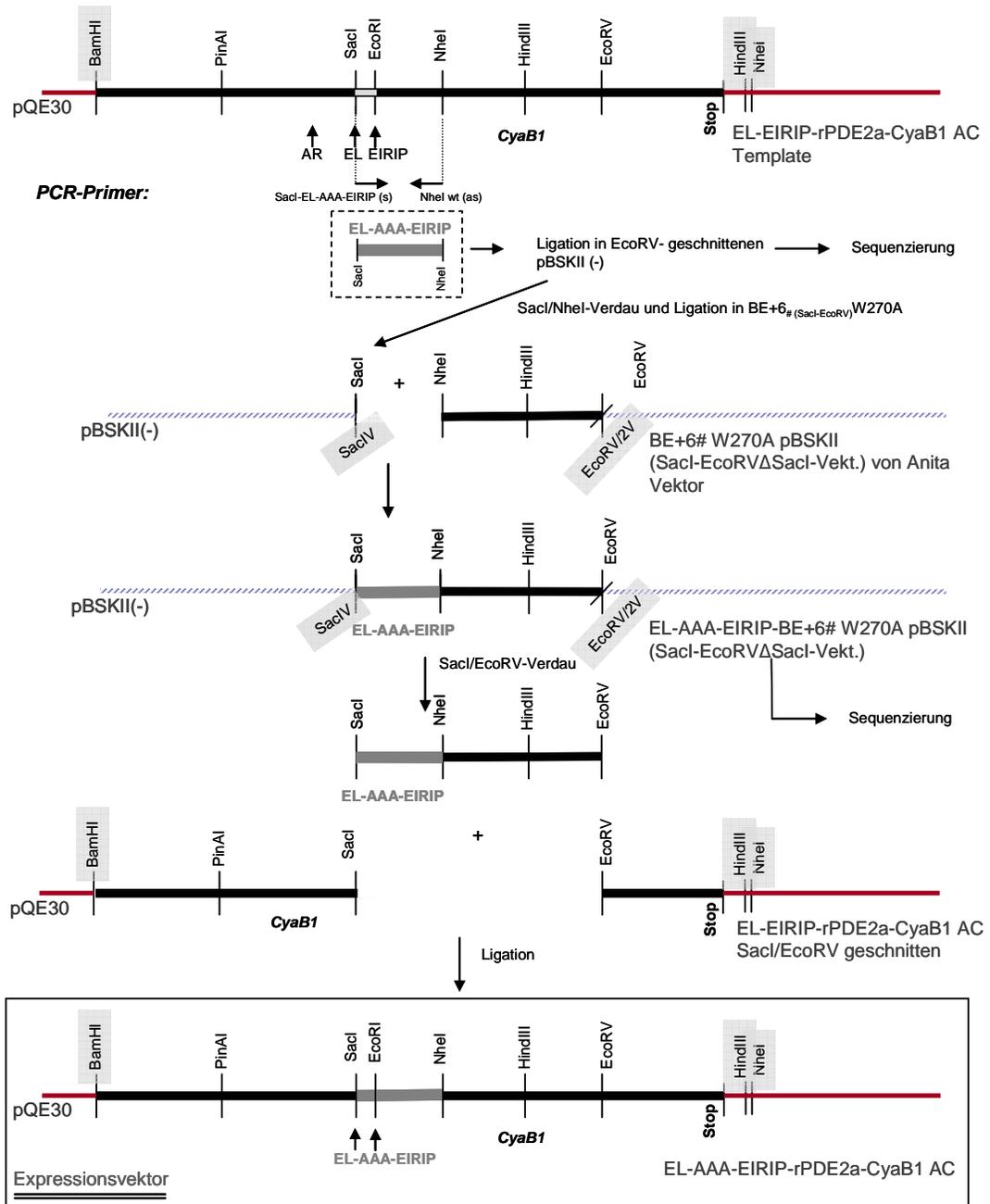
Bei allen CyaB1-EL-EIRIP-rPDE2a-Konstrukten wurde *pQE30* als Expressionsvektor verwendet, die Expressionskonstrukte wurden in *BL21(DE3)[pRep4]* exprimiert.

#### 3.14.4.1 QNEL-, QEMNEL-, LDQNEL-, SVFLLDQNEL-, SL-CyaB1-, TV-CyaB1-, SV-CyaB1-EIRIP-PDE2-CyaB1 AC-Konstrukte [maximal Austausch der AS T258 bis I283 aus CyaB1 gegen S419 bis Y443 aus rPDE2a, genaue Beschreibung unter 4.4]



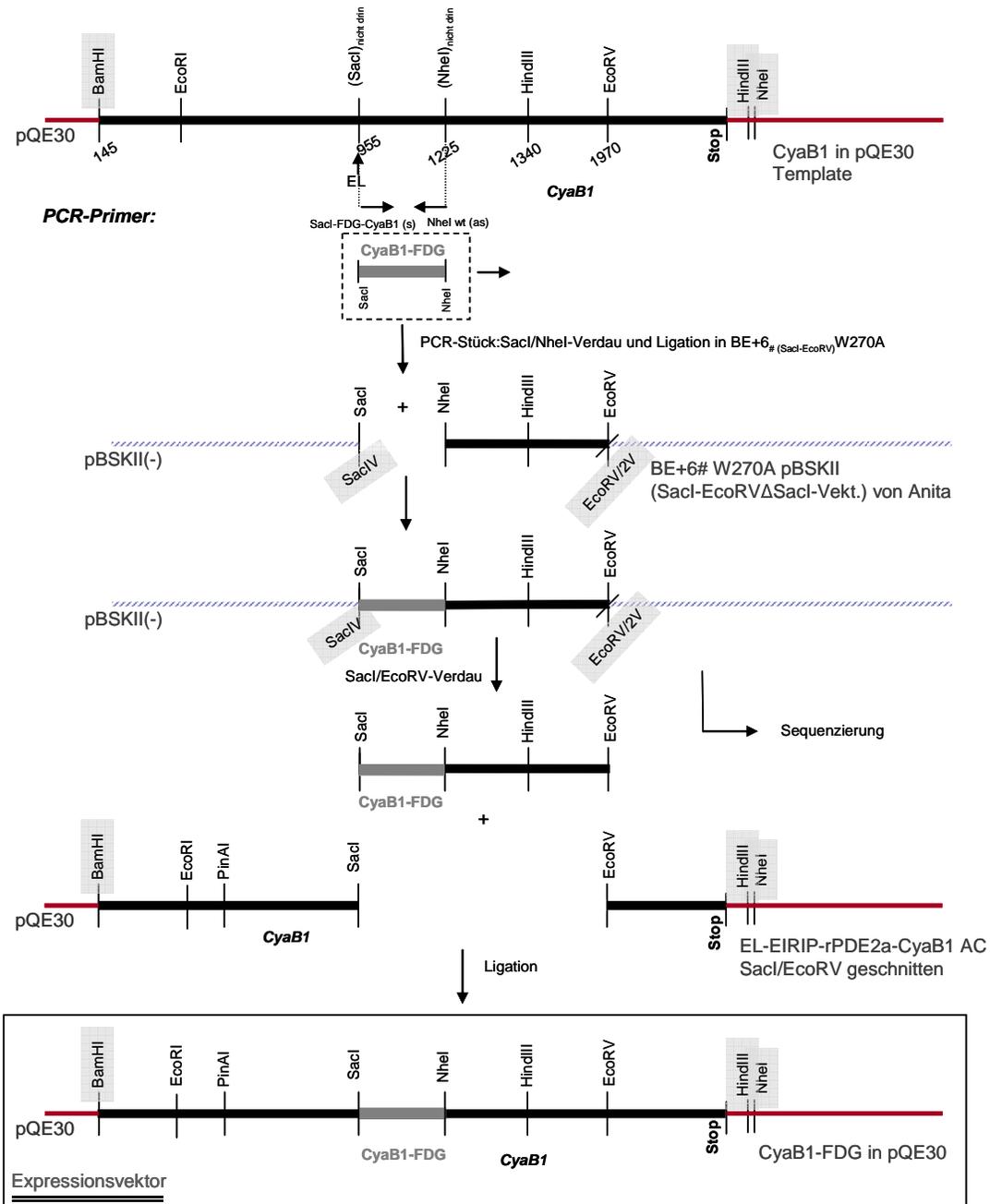
### 3.14.4.2 EL-AAA-EIRIP-PDE2-CyaB1 AC

[Austausch der AS W270 bis V273 und A277 bis I283 aus CyaB1 gegen V429 bis V432 und G436 bis Y443 aus rPDE2a]



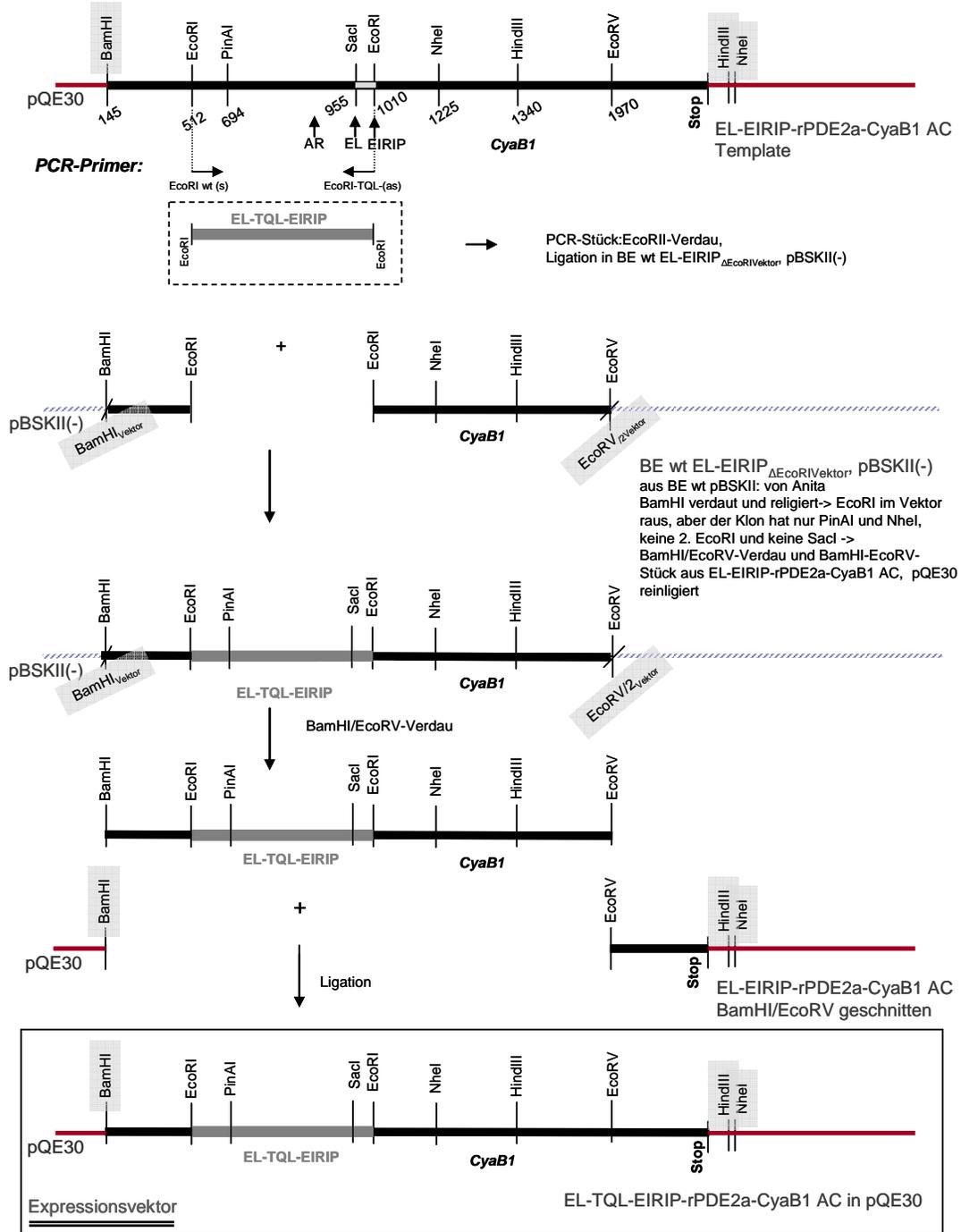
## 3.14.4.3 CyaB1-FDG Holo

[Austausch der AS A274 bis A276 aus CyaB1 gegen F433 bis G435 aus rPDE2a]



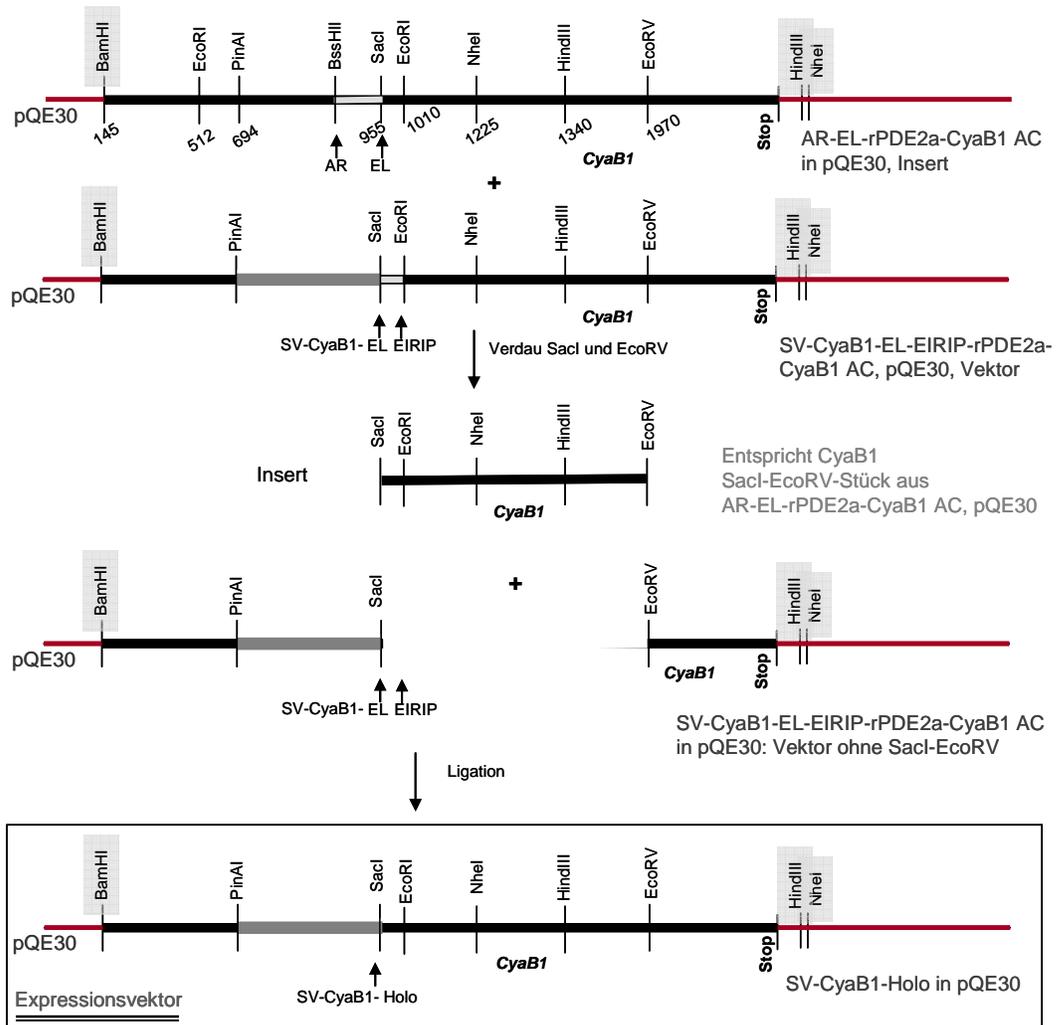
### 3.14.4.4 EL-TQL-EIRIP-PDE2-CyaB1 AC

[Austausch der AS W270 bis T279 und I283 aus CyaB1 gegen V429 bis V438 und Y443 aus rPDE2a]



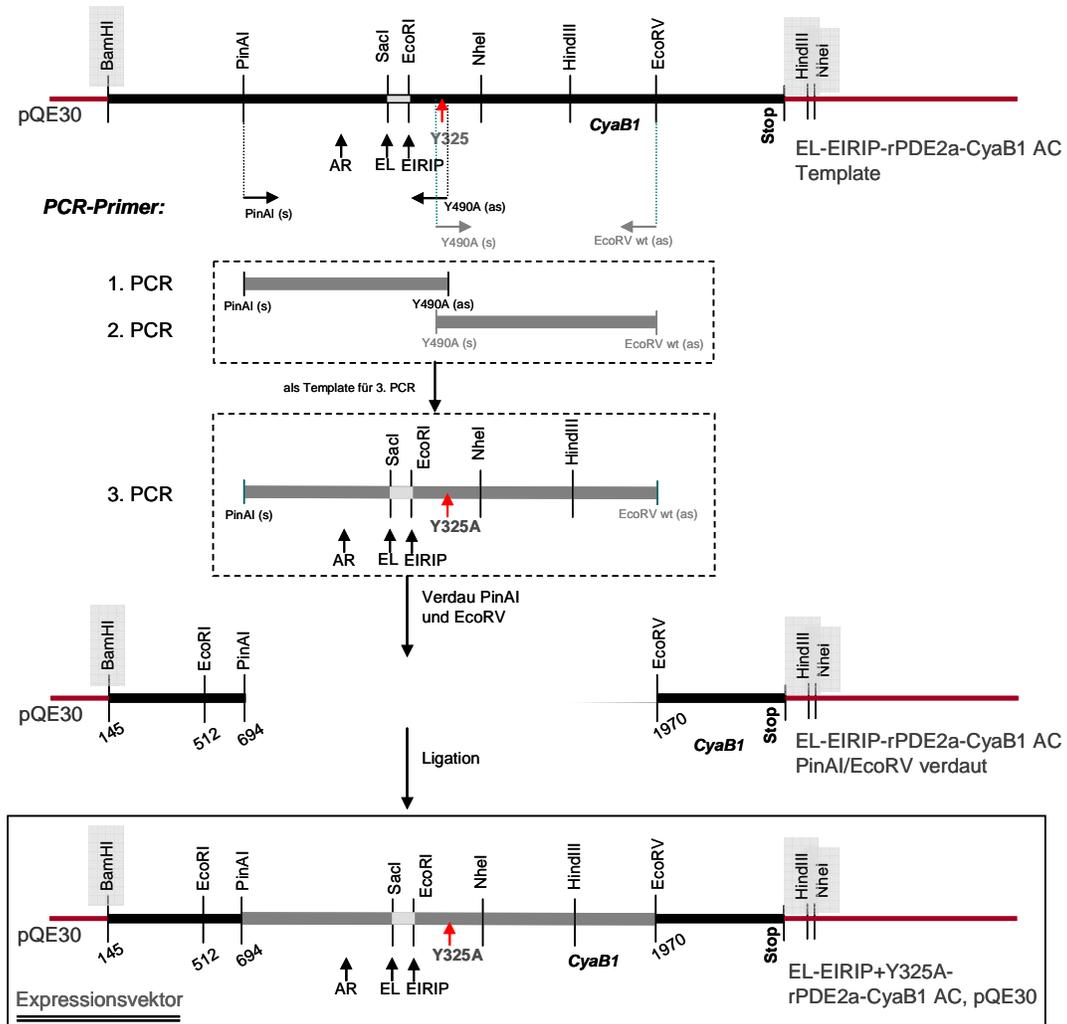
## 3.14.4.5 SV-CyaB1-Holo

[Austausch der AS T258 und L259 aus CyaB1 gegen S419 und V420 aus rPDE2a]



### 3.14.4.6 EL-EIRIP+Y325A-PDE2-CyaB1 AC

[Austausch der AS W270 bis I283 aus CyaB1 gegen V429 bis Y443 aus rPDE2a und Y325A]



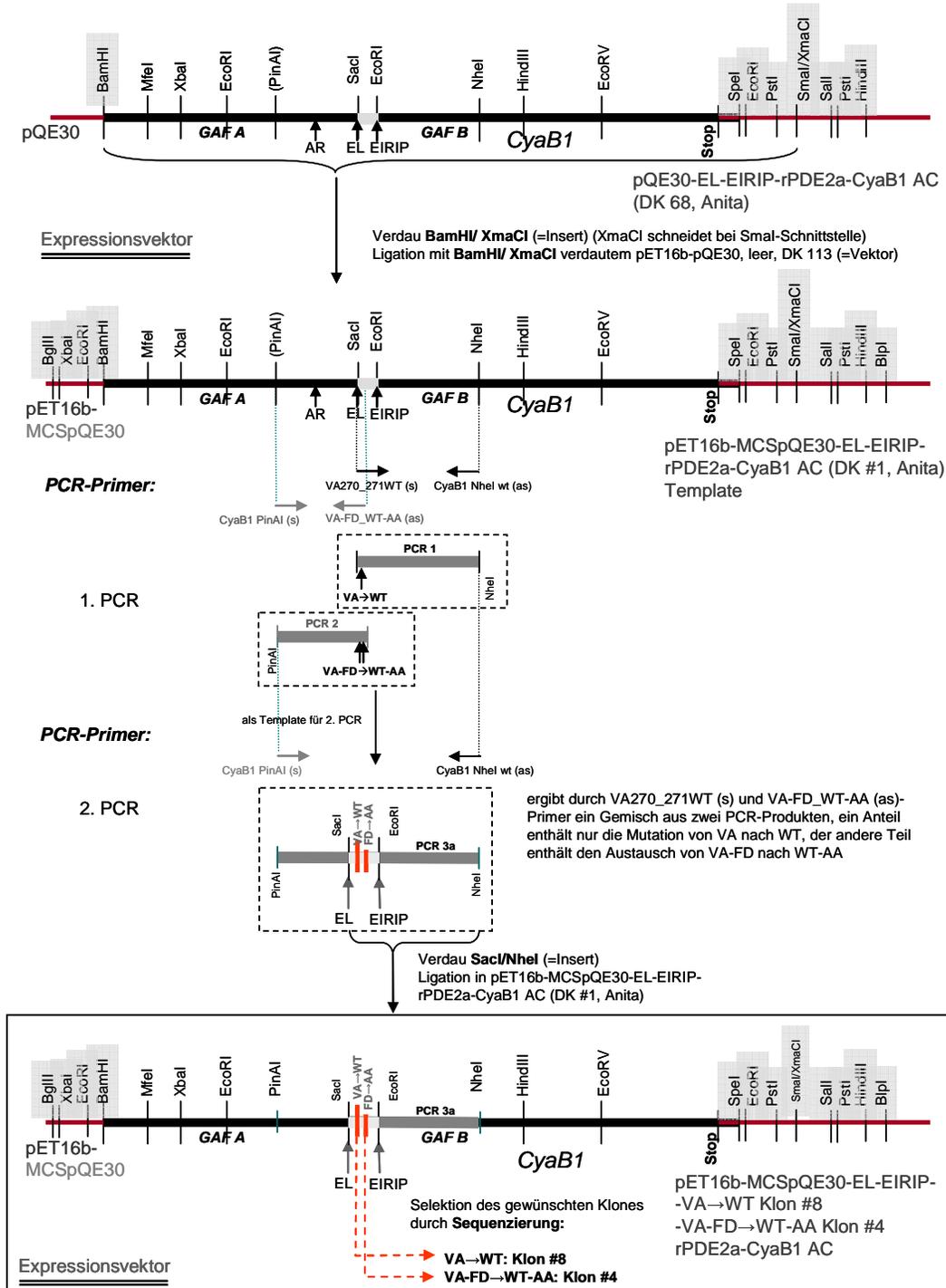
Primer versehentlich falsch als Y490A (s) und (as) bezeichnet – meint Y325A!

## 3.14.4.7 CyaB1 EL-VA-FD→WT-AA-EIRIP PDE2-CyaB1 AC

[Austausch der AS A276 bis I283 aus CyaB1 gegen G435 bis Y443 aus rPDE2a]  
 und CyaB1 EL-VA→WT-EIRIP PDE2-CyaB1 AC

[Austausch der AS A274 bis I283 aus CyaB1 gegen F433 bis Y443 aus rPDE2a]

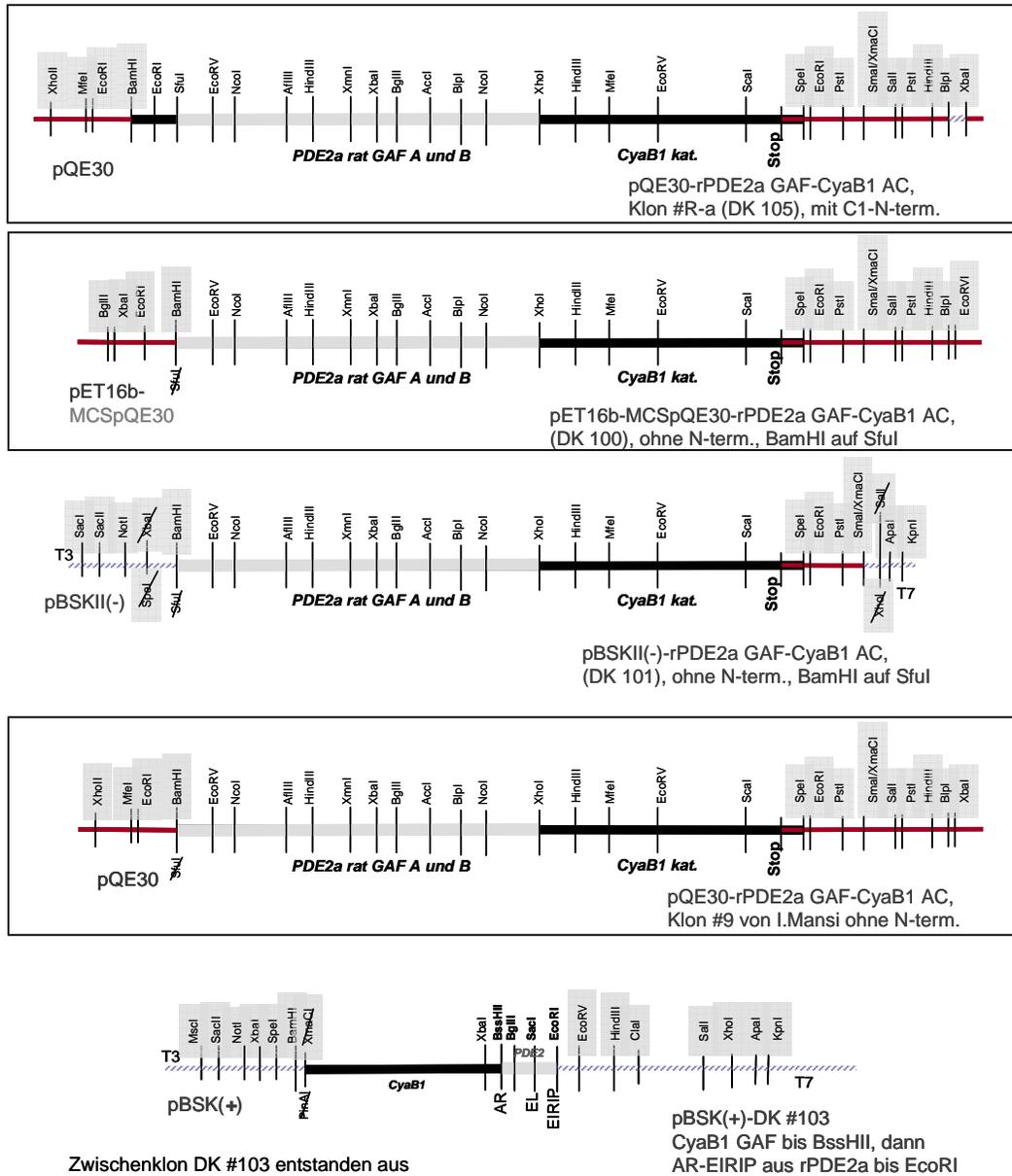
Die folgenden Klone wurden von Anita Schultz kloniert, exprimiert wurde in *BL21-(DE3)[pRep4]*-Zellen.



### 3.14.5 rPDE2a GAF-[EL-EIRIP-CyaB1]-Konstrukte

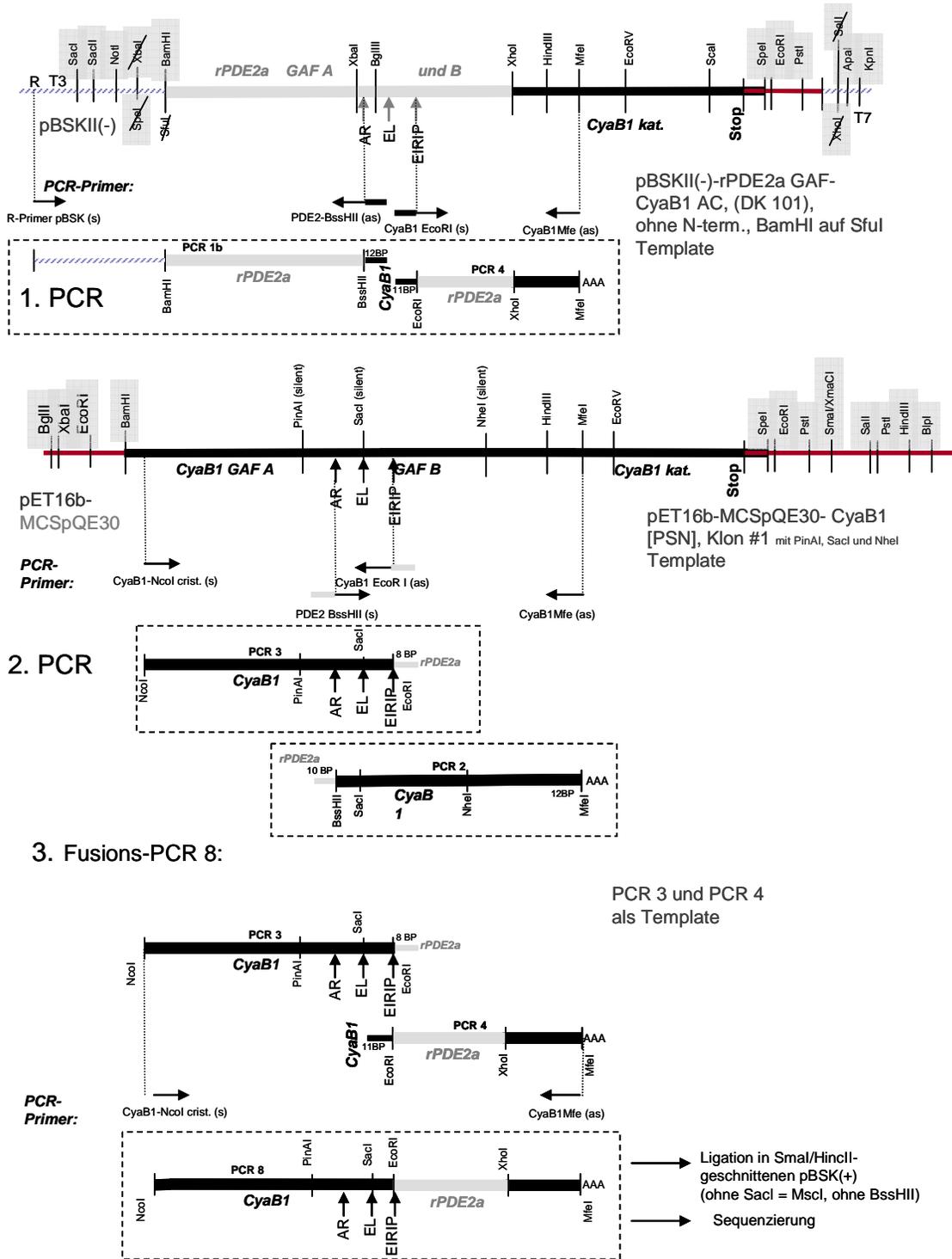
Von den im folgenden aufgeführten Konstrukten wurden nur die Konstrukte rPDE2a-[AR-EL, -AR-EIRIP- und -EL-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC, mit und ohne CyaB1-N-Terminus, (DK 117-3, 118-6, 119-8, 125-2, 126-2 und 127-2) in *BL21(DE3)[pLysS]* exprimiert. Alle anderen Klone sind nur Zwischenkonstrukte zur Einführung der nötigen Schnittstellen. Die Klonierung und Expression wurde von Anita Schultz durchgeführt.

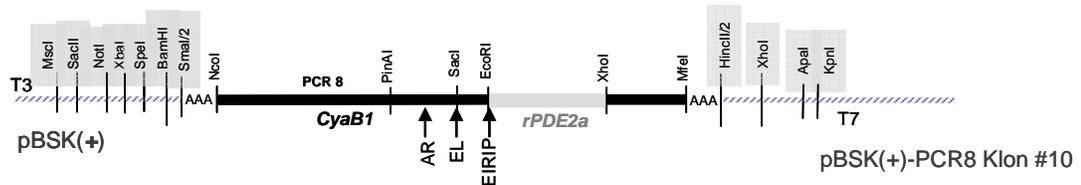
#### 3.14.5.1 Ausgangs- und Zwischenklone für die Herstellung der rPDE2a-GAF-[EL-EIRIP-CyaB1]-Konstrukte



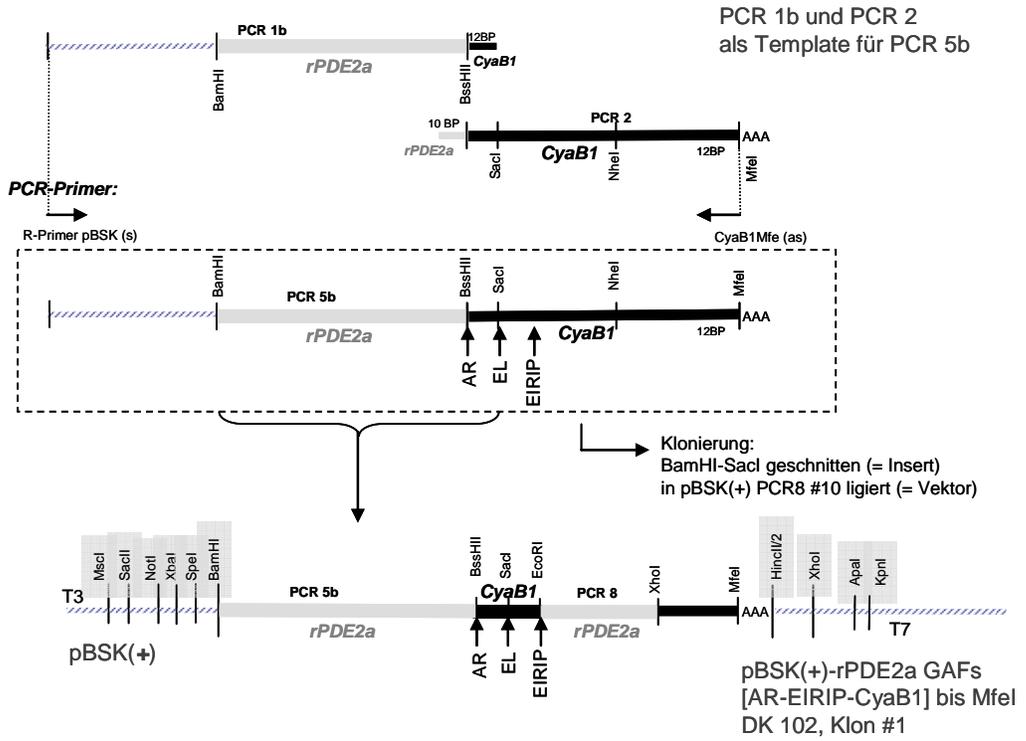
Zwischenklon DK #103 entstanden aus pBSK(+)-Δ XmaCI/EcoRI (= Vektor) und pQE30-CyaB1[AR-EIRIP-PDE2a]-CyaB1 AC Klon #2, PinAI/EcoRI geschnitten (= Insert)

pBSK(+)-DK #103  
CyaB1 GAF bis BssHII, dann  
AR-EIRIP aus rPDE2a bis EcoRI

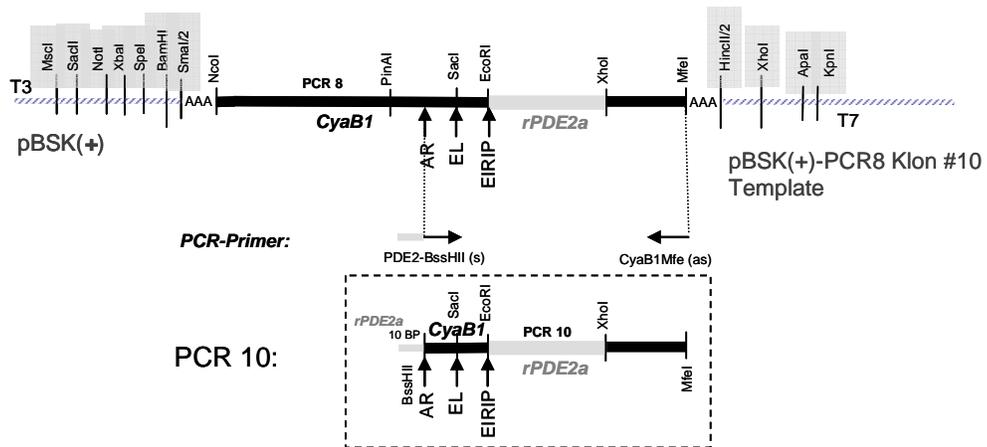




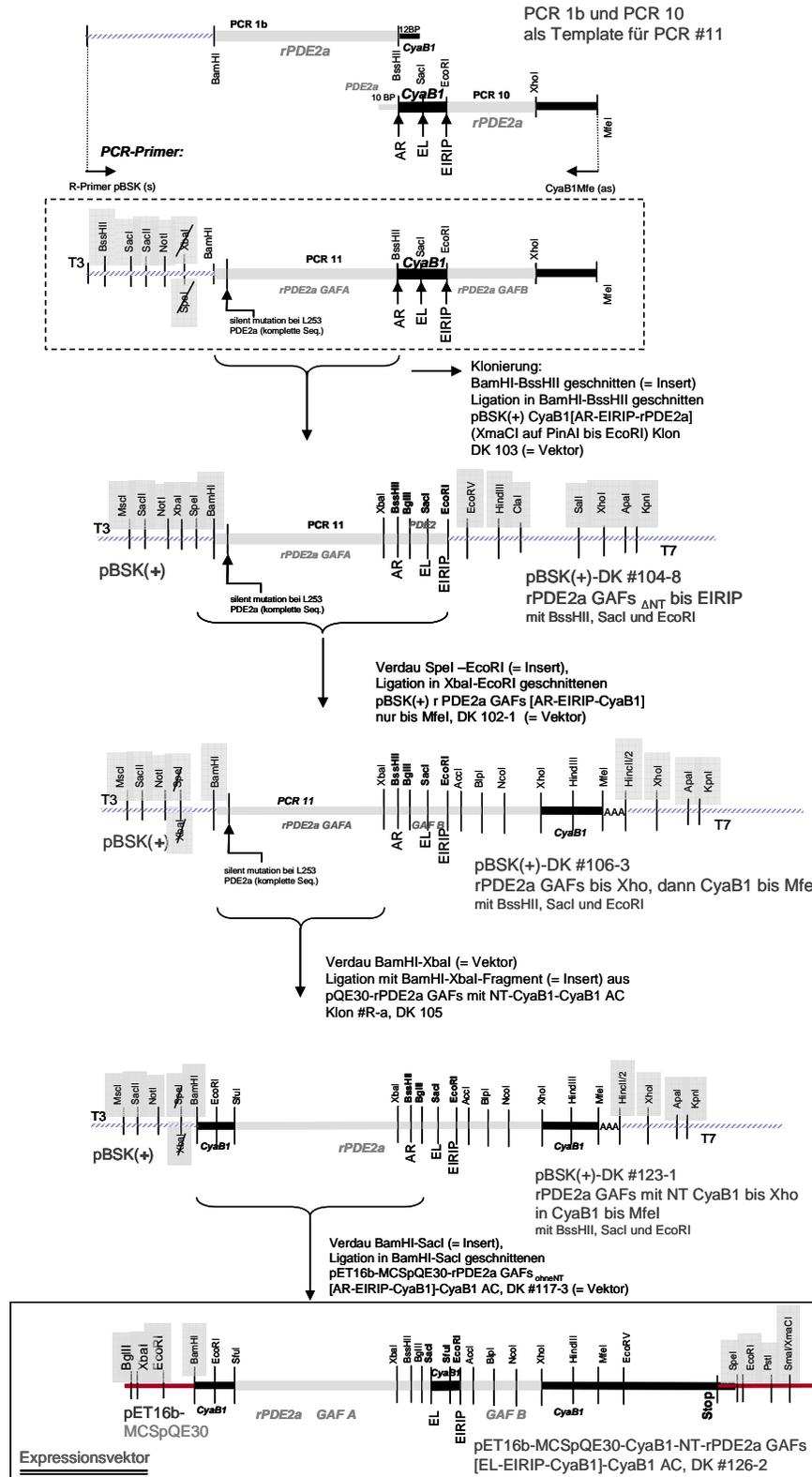
4. Fusions-PCR 5b:



Zwischenklon DK 106 pBSK(+)-rPDE2a GAFs [AR-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC

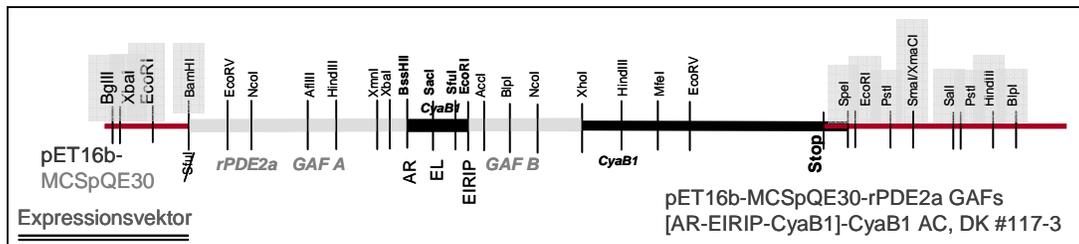


Fusions-PCR 11:



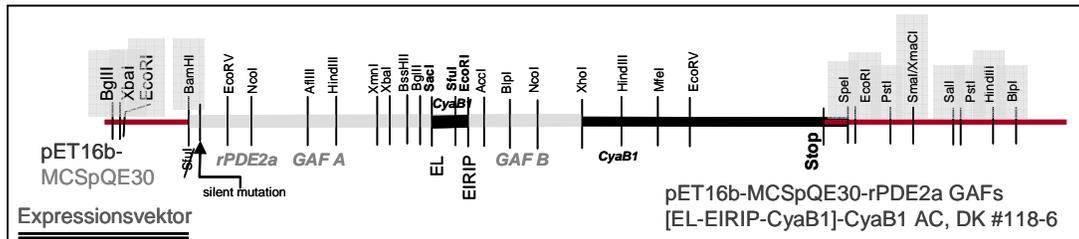
## 3.14.5.2 rPDE2a-GAF-[EL-EIRIP-CyaB1]-Konstrukte ohne N-Terminus

[maximal Austausch der AS N411 bis Y443 aus rPDE2a gegen I250 bis I283 aus CyaB1, genaue Beschreibung unter 4.5]



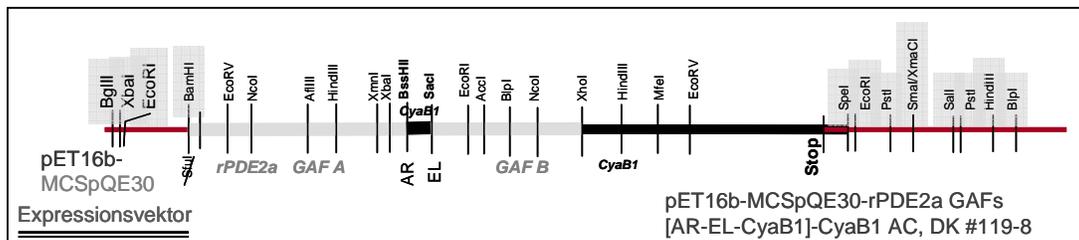
entstanden aus  
**DK #100-2**  $\Delta$  BamHI/MfeI  
 (bei AS 852 fehlt eine Base (Base 25 vor Stop)  
 (=Vektor) und  
**DK #102-1** BamHI/MfeI  
 geschnitten (=Insert)

ergab mutierten Klon **DK #109-2**, der BamHI/MfeI verdaut in **pET16b-MCSpQE30-CyaB1[EL-(VA-FD $\rightarrow$ WT-AA) EIRIP- rPDE2a]-CyaB1 AC, Klon #4** ligiert wurde und den fertigen Klon **DK #117-3** ergab, der in BL21(DE3)[pLysS]-Zellen exprimiert wurde.



entstanden aus  
**DK #109-2**  $\Delta$  BamHI/SacI  
 (mutiert 25 AS vor Stop)  
 (=Vektor) und  
**DK #106-3** BamHI/SacI  
 geschnitten (=Insert)

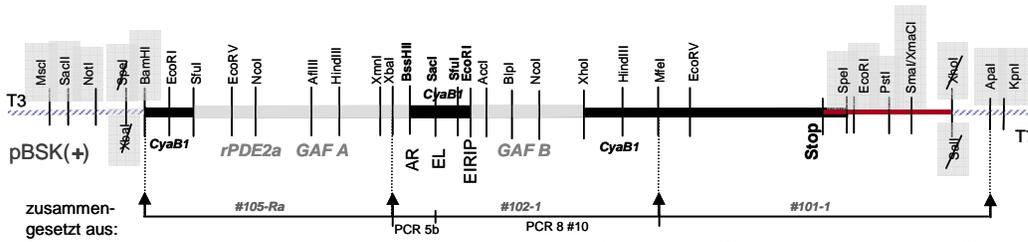
ergab mutierten Klon **DK #112-4**, der BamHI/MfeI verdaut in **pET16b-MCSpQE30-CyaB1[EL-(VA-FD $\rightarrow$ WT-AA) EIRIP- rPDE2a]-CyaB1 AC, Klon #4** ligiert wurde und den fertigen Klon **DK #118-6** ergab, der in BL21(DE3)[pLysS]-Zellen exprimiert wurde.



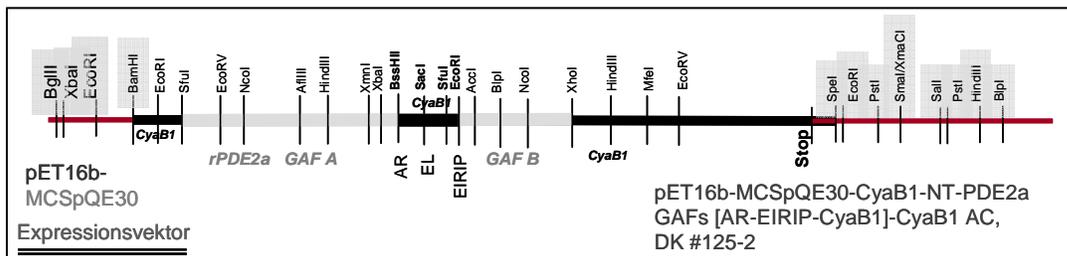
entstanden aus  
**DK #109-2**  $\Delta$  SacI/MfeI  
 (mutiert 25 AS vor Stop)  
 (=Vektor) und  
**DK #106-3** SacI/MfeI  
 geschnitten (=Insert)

ergab mutierten Klon **DK #113-7**, der BamHI/MfeI verdaut in **pET16b-MCSpQE30-CyaB1[EL-(VA-FD $\rightarrow$ WT-AA) EIRIP- rPDE2a]-CyaB1 AC, Klon #4** ligiert wurde und den fertigen Klon **DK #119-8** ergab, der in BL21(DE3)[pLysS]-Zellen exprimiert wurde.

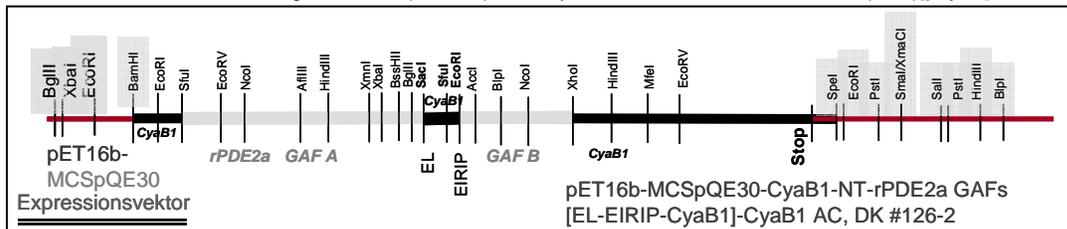
### 3.14.5.3 rPDE2a-GAF-[EL-EIRIP-CyaB1]-Konstrukte mit CyaB1-N-Terminus [maximal Austausch der AS N411 bis Y443 aus rPDE2a gegen I250 bis I283 aus CyaB1, genaue Beschreibung unter 4.5]



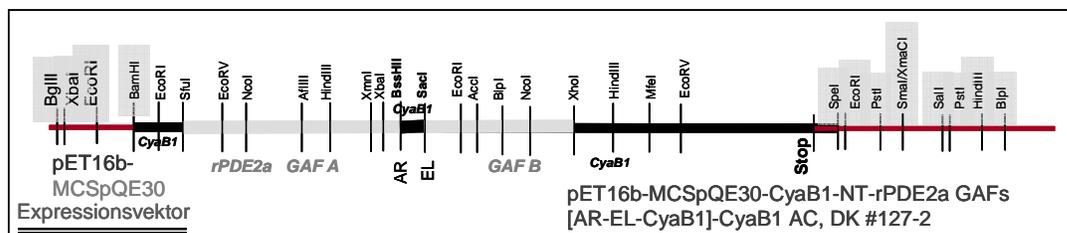
Zwischenklon DK #124 entstanden aus:  
 DK #123-1 NotI/XbaI geschnitten (= Insert) und  
 DK #107-1 Δ NotI/XbaI (=Vektor)  
 mit Klon #107 (pBSK(+)-rPDE2a GAFs[AR-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC) aus:  
 DK #102-1 Δ MfeI/ApaI (=Vektor)  
 und DK #101-1 MfeI/ApaI geschnitten (= Insert)



entstanden aus  
 DK #117-3 Δ BamHI/SacI (=Vektor) und  
 DK #124-1 BamHI/SacI geschnitten (= Insert) → Expression von DK #125-2 in BL21(DE3)[pLysS]-Zellen



entstanden aus  
 DK #117-3 Δ BamHI/SacI (=Vektor) und  
 DK #123-1 BamHI/SacI geschnitten (= Insert) → Expression von DK #126-2 in BL21(DE3)[pLysS]-Zellen



entstanden aus  
 DK #119-8 Δ BamHI/SacI (=Vektor) und  
 DK #124-1 BamHI/SacI geschnitten (= Insert) → Expression von DK #127-2 in BL21(DE3)[pLysS]-Zellen



# 4 Ergebnisse

## 4.1 Ergebnisse der Kristallisation der CyaB2-GAF-Domänen

Die folgenden Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J.A. Beavo vom Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, USA erhalten. In Tübingen erfolgte die Klonierung und Reinigung des Kristallisationskonstruktes (CyaB2 GAF A und B, AS 58-445-GSRS-H<sub>6</sub>) und die Kristallisation wurde etabliert (3.9).

Die weitere Optimierung der Expression, Kristallisation, Datenaufnahme und Strukturaufklärung erfolgte im Labor Beavo in Seattle mit dem von uns zur Verfügung gestellten Plasmid und den entsprechenden experimentellen Angaben.

Die Strukturaufklärung führte im Februar 2005 zu folgender Veröffentlichung [105]:

S. E. Martinez, S. Bruder, A. Schultz, N. Zheng, J. E. Schultz, J. A. Beavo und J.U. Linder. *Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**:3082-3087, 2005.

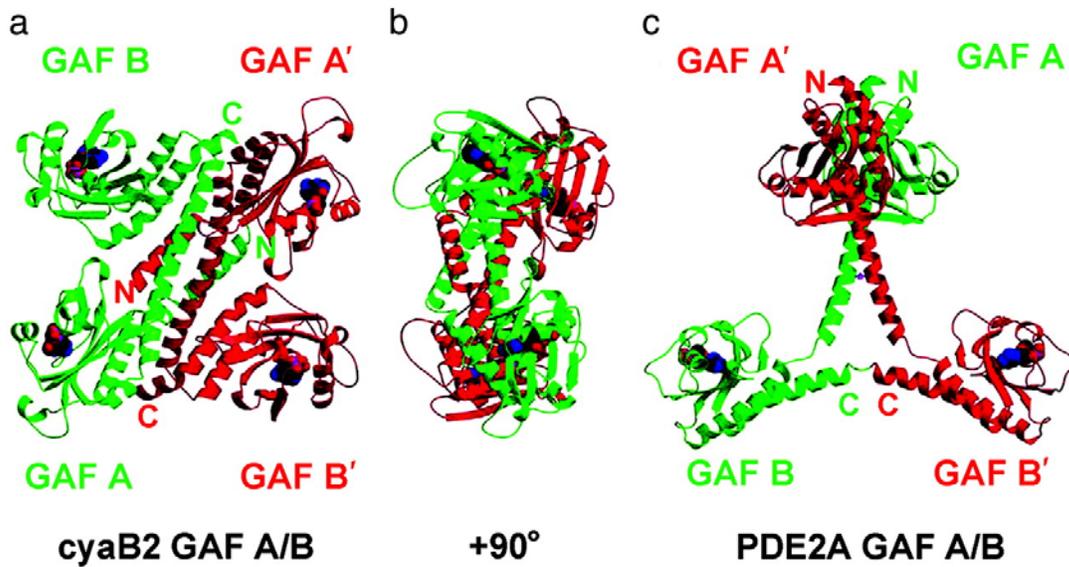
Die Ergebnisse dieser Veröffentlichung werden im Folgenden zusammengefaßt. Sie hatten wesentlichen Einfluß auf die weiteren Untersuchungen, unter anderem für die Fragen, welche Aminosäuren an der Nucleotidbindung beteiligt sind und welche Bedeutung das NKFDE-Motiv in CyaB2 besitzt.

### 4.1.1 Gesamtstruktur des Tandem-CyaB2-GAF-Dimers

Die Tandem GAF A/GAF B-Domäne der CyaB2 kristallisierte als Homodimer und bildete eine asymmetrische Einheit (Abb. 4.1).

Jedes CyaB2 Monomer besitzt eine ähnliche Struktur mit einer identischen Topologie, mit Ausnahme der  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleife, die eine zentrale Rolle bei der Purinbindung einnimmt und im konservierten NKFDE-Motiv, das die Bindungstasche zu stabilisieren scheint (4.1.4).

Das CyaB2-GAF-Dimer ist im Kristall antiparallel und kompakt angeordnet. Wie für PDE2A beschrieben [1], sind GAF A und B jeweils durch eine lange  $\alpha$ -Helix verbunden. In jedem Monomer sitzen die beiden GAF-Domänen auf der gleichen Seite der Helix und haben wahrscheinlich nur über eine einzige Salzbrücke Kontakt miteinander. Ein einzelnes GAF-Monomer ist in der größten Ausdehnung 86 Å lang und



**Abb. 4.1: Strukturvergleiche der CyaB2 und PDE2A Tandem-GAF-Domänen**

- (a) Quartärstruktur des regulatorischen Abschnitts der cyanobakteriellen *Anabaena sp. PCC 7120*-AC CyaB2. Jedes Monomer (rot oder grün) enthält eine GAF A und eine GAF B-Domäne, jede mit einer cAMP-Bindungsstelle (cAMP jeweils als Kalottendarstellung). Die cAMP-bindenden Domänen, die verbindenden Helices und die N- bzw. C-terminalen Verlängerungen bilden die Berührungspunkte des Dimers. GAF A dimerisiert mit GAF B' und GAF A' mit GAF B. Die Gesamtgröße beträgt  $111 \times 102 \times 55 \text{ \AA}$ . Im Monomer geht eine N-terminale, helicale Verlängerung (AS 58-78) der GAF A-Domäne (AS 79-224) voraus. Der GAF A folgt ein Linker (AS 225-230), eine Verbindungshelix (AS 231-263), ein zweiter Linker (AS 264-270) und dann GAF B (271-430). Als letzte geordnete Struktur schließt sich C-terminal eine Helix (AS 431-440 oder 441) an.
- (b) gleiche Ansicht wie in (a), nur Drehung um  $90^\circ$  um die vertikale Achse.
- (c) parallele GAF-Domänen der PDE2A (vertikale Dimerachse). [aus 105].

damit 15% kürzer als ein PDE2A-GAF-Monomer. Die Ursache hierfür liegt darin, dass sich GAF B in CyaB2 scharf zurück zur Verbindungshelix biegt (vergl. Abb. 4.1). Die Dimersierung zweier Monomere erfolgt überwiegend im Bereich der Verbindungshelix. Auch eine C- und zwei N-terminale Helices von GAF A bzw. GAF B bewirken eine dichte Anlagerung der GAF A-Domäne des einen Monomers an die GAF B-Domäne des anderen Monomers. Das Dimer liegt in der Gesamtauf sicht in einer flachen, rechtwinkligen Form vor, obwohl in Realität die beiden Paare aus GAF A, B' und GAF B, A' über die Verbindungshelix um einen Winkel von ca.  $30^\circ$  gegeneinander verdreht sind.

### 4.1.2 Dimerisierung der CyaB2 GAF-Domänen im Vergleich zu PDE2A

Die antiparallele Dimerisierung der CyaB2 GAF-Domänen steht im völligen Widerspruch zum parallelen Dimer der GAF A/B in PDE2A (vgl. Abb. 4.1a und c). Im Falle der PDE2A ist GAF A die für die Dimerisierung zuständige Domäne, wohingegen die GAF B-Domänen in keinem Kontakt miteinander stehen [1]. Auch innerhalb eines Monomers sind die GAF A- und B-Domänen weit voneinander entfernt.

Die Verbindungshelices in CyaB2 laufen etwas mehr parallel und bilden damit eine vergrößerte Interaktionsfläche aus. Die Sequenzähnlichkeiten der Verbindungshelices aus PDE2A und CyaB2 sind mit 16% gering, nur ihre Länge ist identisch. Dies läßt vermuten, dass die Art der Dimerisierung in beiden Proteinen individuell verläuft.

### 4.1.3 Nucleotidbindung in CyaB2 GAF A und B

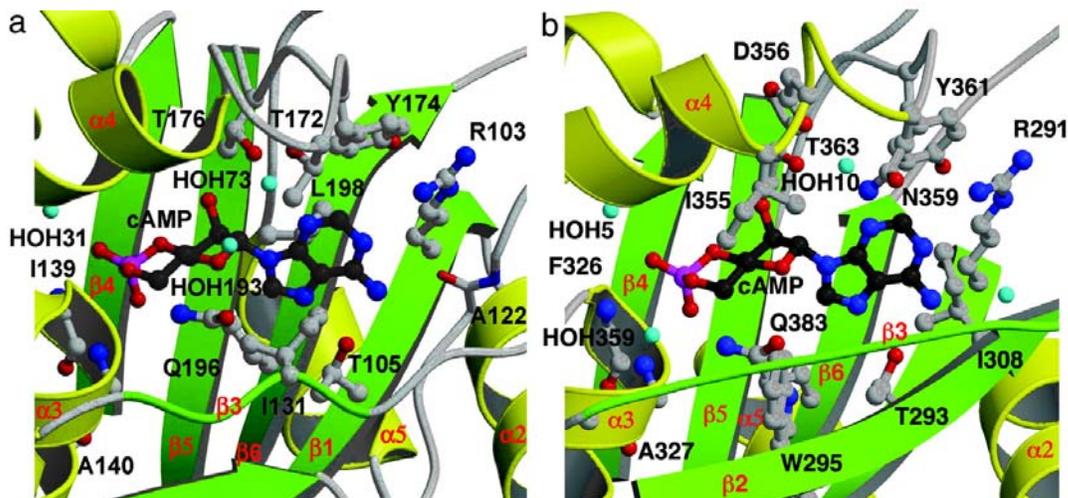
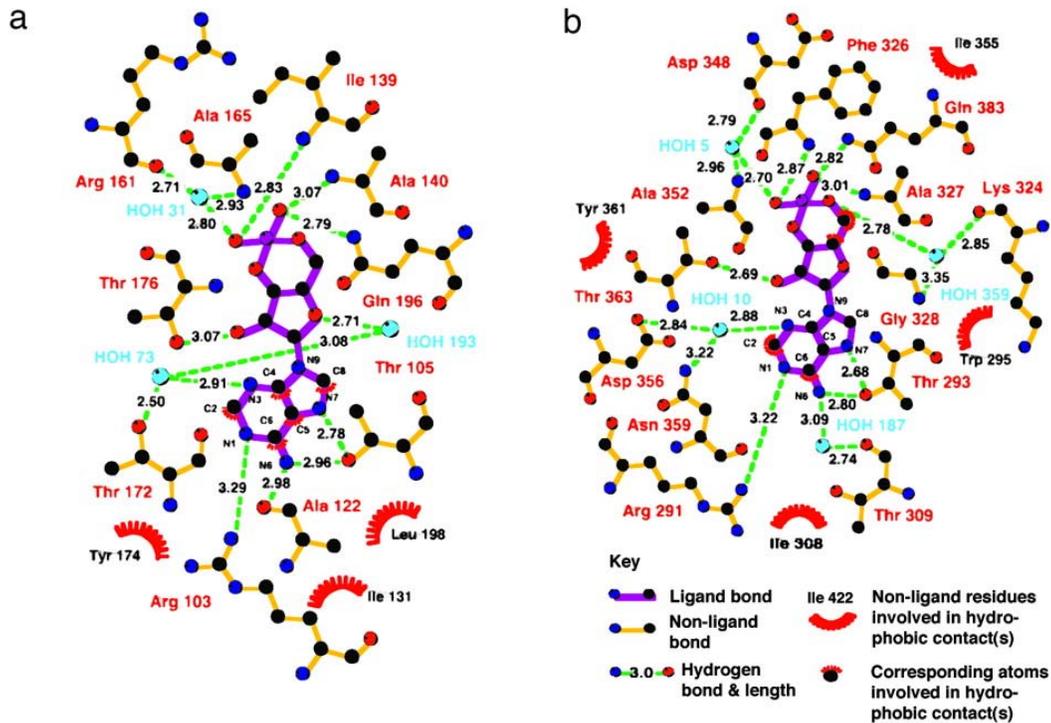


Abb. 4.2: Bindungstaschen für cAMP in CyaB2 GAF A (a) und GAF B (b).

Je vier polare Reste stehen in direktem Kontakt mit cAMP (GAF A: R103, T105, T176 und Q196; GAF B: R291, T293, T363 und Q383). In der GAF A kontaktiert die Hydroxylgruppe von T172 cAMP über ein Wasser-Molekül. In GAF B ist dies bei N359 und D356 der Fall. Rückgrat-Amid oder -Carbonylreste von zwei bzw. fünf Resten kontaktieren cAMP über Wasser (GAF A: A161 und A165, GAF B: T309, K324, G328, D348 und A352). In Abhängigkeit von der GAF-Domäne sind drei bis vier Moleküle Wasser gebunden. Schließlich existieren drei bis vier hydrophobe Kontakte (GAF A: I131, L198 und Y174; GAF B: R295, I308, I355 und Y361). [aus 105].

Im Kristall hat jede GAF A- und GAF B-Domäne ein cAMP-Molekül gebunden, welches zu circa 97% von den umgebenden AS verdeckt ist, d.h. cAMP sitzt augenscheinlich in einer geschlossenen Tasche. Alle vier cAMP-Moleküle sind wie in PDE2A [1]

in der anti-Konformation gebunden. Abb. 4.2 zeigt eine Nahaufnahme der cAMP-Bindungsstellen in GAF A (a) und GAF B (b).



**Abb. 4.3:** Das Diagramm (lig-plot) zeigt alle direkten Interaktionen zwischen cAMP und den cyanobakteriellen GAF A (a)- und GAF B (b)-Domänen der CyaB2 in der A-Kette. [aus 105].

Die schematische Darstellung in Abb. 4.3 (ein lig-plot) zeigt die Interaktionen zwischen cAMP und GAF A bzw. B. Aufgrund der Ähnlichkeit der cAMP-Bindung in GAF A und GAF B (vgl. Abb. 4.2 und 4.3), wird im weiteren Verlauf lediglich die GAF B der A-Kette betrachtet.

Mit Ausnahme des Purin-bindenden Teils zeigt die Bindungstasche von CyaB2 GAF B Ähnlichkeiten zur PDE2A GAF B mit gebundenem cGMP. Den Hauptunterschied stellt die Wasserstoffbrücke von R291 zum N1 des cAMPs dar (Abb. 4.2b). Dies scheint eine wichtige AS für die Bindung von cAMP zu sein, R291 kann keine Wasserstoffbrücke zu dem protonierten N1 im Guaninring ausbilden. Damit ist diese Wasserstoffbrücke vermutlich ein die cAMP-Bindung bestimmendes Merkmal. In PDE2A GAF B ist R291 durch I422 ersetzt, dieses Isoleucin steht im Kontakt mit dem Guaninring. Die Orientierung von R291 scheint durch die Seitenketten zweier anderer Reste erzwungen zu werden. Von C $\gamma$  bis zur Guanidiniumgruppe liegt die Seitenkette von R291 fast flach im Abstand von 3,6 Å an der Seitenkette von Y361. Zwischen der Carbonylseitenkette von Q310 besteht eine 3,3 Å lange Wasserstoffbrücke zum NH1 von R291. In GAF A ist Y361 als Y174 konserviert. Q310 hat keine Entsprechung in

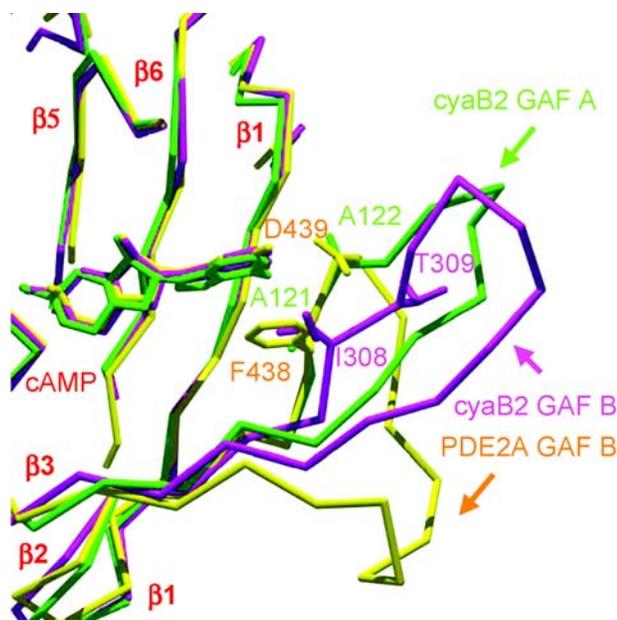
GAF A, es liegt in der  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleife, die sich in GAF A und B unterscheidet.

Zwei Reste weiter bildet T293 zwei direkte 2,8 und 2,7 Å lange Wasserstoffbrücken zu N6 und N7 des cAMPs aus. In PDE2A bildet an dieser Stelle das äquivalente S424 eine 2,7 Å lange Wasserstoffbrücke zum N7 des cGMPs aus. In jeder GAF-Domäne der CyaB2 ist die Konformation dieser Seitenkette um ca. 130° gedreht. Das ermöglicht H-Brücken gleicher Länge sowohl zu N6 als auch zu N7.

D356 und N359 nehmen über das Wassermolekül HOH10 Kontakt zur Position N3 im cAMP auf. Diese beiden AS sind in der PDE2A als D485 und T488 konserviert. Dort koordinieren sie HOH1, welches zwei H-Brücken zur N2-Aminogruppe und zum N3 des cGMPs ausbildet. Damit ist in allen bisher bekannten GAF-Domänen ein Wassermolekül an dieser Position konserviert.

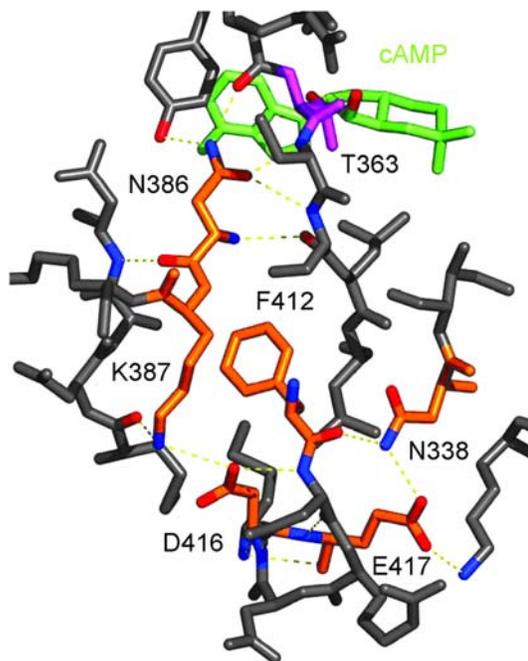
In PDE2A bildet D439 über seine Seitenkette eine Wasserstoffbrücke zu N1 des cGMPs aus, über das Amid wird eine H-Brücke zur O6-Carbonylfunktion des cGMPs ausgebildet [1]. Das vorausgehende F438 geht eine *stacking* Wechselwirkung mit dem Guaninring ein. In der GAF B von CyaB2 sind die entsprechenden Reste I308 und T309. Das Rückgrat dieser Reste ist jedoch vom cAMP abgewandt. I308 steht im hydrophoben Kontakt zum Adeninring und T309 ist für eine Wasserstoffbrücke zu weit entfernt (Abb. 4.4).

**Abb. 4.4:** Die  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleife der cNMP-bindenden GAF-Domänen hat eine variable Konformation und Länge. GAF A (grün) und B (violett) der CyaB2-AC und GAF B der PDE2A (gelb) wurden übereinandergelegt. Die den AS F438 und D439 aus PDE2A entsprechenden AS sind gekennzeichnet. [aus 105].



In PDE2A bildet die 2'-Hydroxygruppe des cGMPs eine H-Brücke zu T492 aus [1]. Obwohl dieses Threonin in CyaB2 GAF A und B als T176 und T363 konserviert ist, war hier 2'-Desoxy-cAMP als Aktivator genauso effektiv wie cAMP (Daten nicht gezeigt). Damit blieb die Bedeutung dieser konservierten AS für die Funktion im Moment ungeklärt.

Die 1,9 Å Auflösung der Struktur der CyaB2-GAF-Domänen erlaubt einen genauen



**Abb. 4.5:** Wasserstoffbrücken des *NKFDE*-Motivs in CyaB2 GAF B. *NKFDE*-AS sind orange, cAMP ist grün und T363 violett. [aus 105].

Blick auf die Bindung des cyclischen Phosphates. In der Gesamtbetrachtung ist die Bindung ähnlich wie die des cGMPs in PDE2A GAF B. Das N-terminale Ende der Helix  $\alpha 3$  zeigt auf die Phosphatgruppe. Die äquatorialen und axialen Sauerstoffatome des Phosphates bilden H-Brücken zu den aufeinanderfolgenden Resten I139 und A140 in CyaB2 GAF A und zu F326 und A327 in GAF B aus. Der Phosphoester des cAMPs liegt in GAF A und B in der Sesselkonformation vor.

#### 4.1.4 Bedeutung des konservierten *NKFDE*-Motivs

Beide GAF-Domänen in CyaB2 enthalten das konservierte *NKFDE*-Motiv, das auch in allen PDE Tandem-GAF-Domänen gefunden wurde [30]. Übereinstimmend mit der PDE2A-Struktur [1] ist in beiden CyaB2-GAF-Domänen das *NKFDE*-Motiv kein Bestandteil der Bindungstasche oder der Dimer-Interaktionsfläche. Das Übereinanderlegen der drei GAF-Strukturen mit gebundenem cAMP bzw. cGMP zeigte jedoch, dass dieses typische Motiv von einem konservierten Netzwerk von H-Brücken, einer Salzbrücke und einer gegenseitigen Nähe der *NKFDE*-Aminosäuren begleitet wird (Abb. 4.5). Im Folgenden wurde CyaB2 GAF B exemplarisch für eine Darstellung verwendet.

In der Struktur in Abb. 4.5 ist die Seitenkette von N386 verdeckt. Sie bildet H-Brücken zum Rückgrat der vorhergehenden AS und T363 aus. T363 selbst bildet eine Wasserstoffbrücke zur 2'-OH-Gruppe der cAMP-Ribose aus. Die Salzbrücke zwischen K387 und D416 steht nicht isoliert, die Aminogruppe des Lysins und die Carboxylgruppe des Aspartates gehen weitere H-Brücken mit M287 und D413 ein (nicht sichtbar in Abb. 4.5). Die Carbonylgruppe von F412 bildet eine H-Brücke zu der Seitenkette



Die AS-Sequenzen der CyaB2 unterscheiden sich im Bereich des NKFDE-Motivs von der Sequenz der PDE2A. Sie haben eine viel längere Schleife zwischen NK und F eingeschoben (19 AS in CyaB2 GAF A und 24 AS in GAF B im Vergleich zu 5 AS in PDE2A GAF B (Abb. 4.6)). In CyaB2 GAF A zeigt diese Schleife von der cAMP-Bindungsstelle weg, in GAF B jedoch liegt sie auf der  $\alpha$ 4-Helix. Diese Helix bildet mehrere Kontakte zum cAMP aus (weitere Untersuchungen und Erklärungen dazu in 4.2, [107] und in Abb. 4.8).

## 4.2 Ergebnisse der biochemischen Untersuchung der CyaB2-GAF-CyaB1 AC-Chimären

Die im Folgenden geschilderten Untersuchungsergebnisse einer Chimäre aus CyaB2 GAF-Domänen und der katalytischen Domäne aus CyaB1 führten nach Diskussion mit der Arbeitsgruppe von J.A. Beavo vom Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, USA im Februar 2005, zu folgender Veröffentlichung:

S. Bruder, J.U. Linder, S. E. Martinez, N. Zheng, J. A. Beavo, und J. E. Schultz  
*The cyanobacterial tandem GAF domains from the cyaB2 adenyl cyclase signal via both cAMP-binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:3088-3092, 2005.*

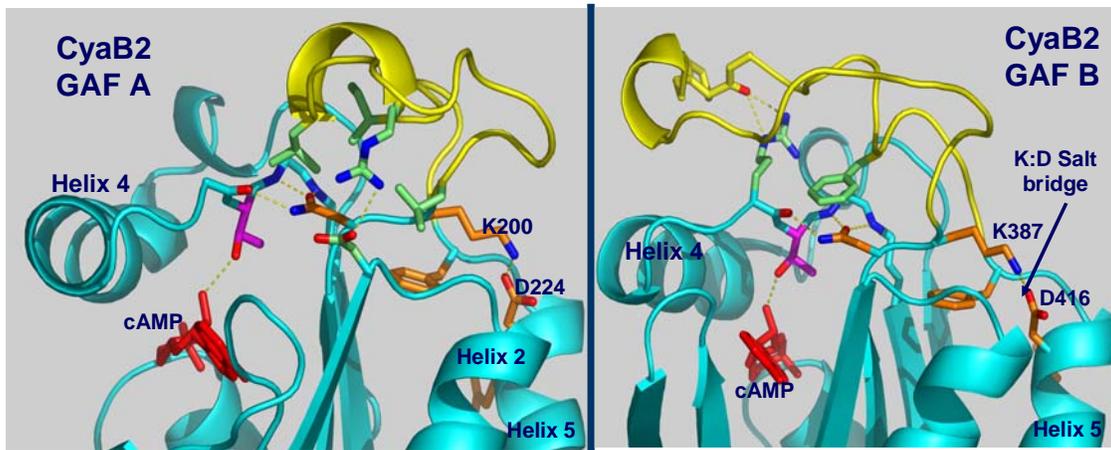
Die Veröffentlichung der hier gezeigten Daten erfolgte zusammen mit der unter 4.1 beschriebenen Kristallstruktur der CyaB2 GAF-Domänen (4.1 und [105]). Die in diesem Paper veröffentlichten Ergebnisse werden nachfolgend zusammengefaßt dargestellt.

Ausgangspunkt für die durchgeführten Untersuchungen war zum einen die Tatsache, dass sich das CyaB2 Holoenzym, welches wie CyaB1 durch cAMP stimulierbar ist, schlecht exprimieren, reinigen und im AC-Test untersuchen ließ. Nachdem jedoch von T. Kanacher [14,15] gezeigt wurde, dass die GAF-Domänen der CyaB1 gegen die GAF-Domänen der rPDE2a ausgetauscht werden können und man eine funktionsfähige, cGMP-stimulierbare AC erhält, bestand die Aussicht, dass auch ein Austausch der CyaB1 GAF-Domänen gegen die CyaB2 GAF-Domänen funktionieren würde. Mit dieser möglicherweise stabileren Chimäre sollte im Anschluß die Signalübertragung der CyaB2 GAF-Domänen auf das katalytische Zentrum der CyaB1 untersucht werden.

rPDE2GAFB:	502	VIGVAELV	NKII	-----	NGPWFSK	FDEDLATA	AFSI	530	
hPDE5GAFA:	278	VVGVAQA	IN	KS	SG	-----	NGGTFTE	KDKFAAYLA	308
cyaB1GAF B:	342	LIGVTQL	INKQ	-----	QGSFTAS	DEEFMRAF	NI	369	
cyaB2GAF A:	191	LVAVVQL	LNK	LPYSPP	DALLAERI	-----	DNQGFTS	ADEQLFQEFAP	233
cyaB2GAF B:	378	LIGVTQL	VNKK	KTGE	FFPNPETWPIA	PECF	QAS	FRNDEEFMEAFNI	425

**Abb. 4.7:** Alignment der NKFDE-Motive von GAF B aus rPDE2a, GAF A aus hPDE5, GAF B aus CyaB1 und GAF A und B aus CyaB2. Die konservierten AS des NKFDE-Motivs sind durch schwarze Punkte oben und unten gekennzeichnet. Erwähnenswert sind die Einschübe in den CyaB2 GAF A- und B-Domänen. Sie sind durch vertikale Linien markiert, [aus 107].

Nachdem in der unter 4.1 beschriebenen Kristallstruktur der CyaB2 GAF-Domänen cAMP an allen vier möglichen Ligandbindungsstellen gebunden war, wurde versucht zu bestimmen, ob tatsächlich alle dieser Bindungsstellen an der intramolekularen Signalübertragung beteiligt sind. Außerdem wurde die Rolle der in der Kristallstruktur

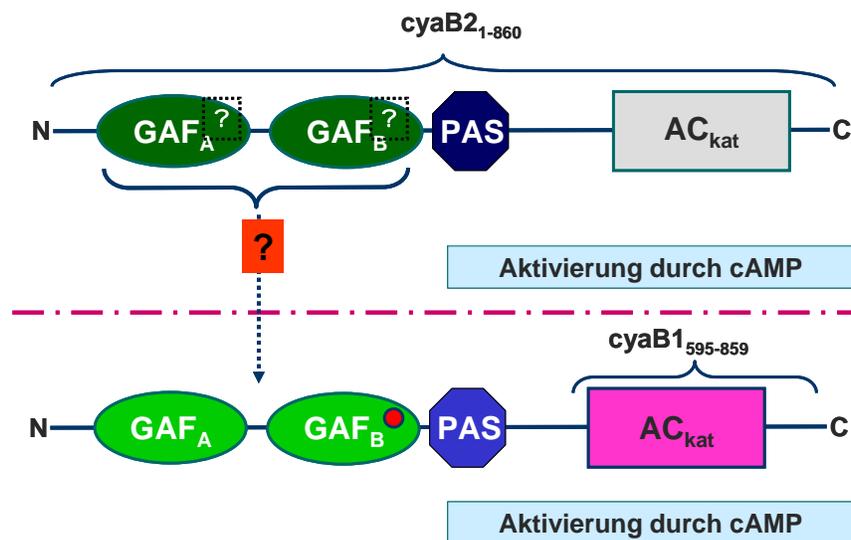


**Abb. 4.8:** Eine Nahaufnahme zeigt die in das NKFD-E-Motiv der CyaB2 eingeschobenen Schleifen in GAF A (links) und GAF B (rechts). Die eingeschobenen Schleifen sind gelb, die fünf NKFD-E-Reste orange, cAMP rot und T176 in GAF A bzw. T363 in GAF B violett dargestellt. Einige der AS, die zu Wechselwirkungen zwischen den Einschüben und dem Rest der GAF-Domäne führten, sind grün gefärbt. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte gelbe Linien gekennzeichnet, [nach 107].

erkennbaren Salzbrücke zwischen Lys und Asp im NKFD-E-Motiv und die Rolle der in die CyaB2 GAF-Domänen eingeschobenen Schleifen (Abb. 4.8, 4.7 und 4.6) biochemisch mit entsprechenden molekularbiologisch hergestellten Proteinen hinterfragt.

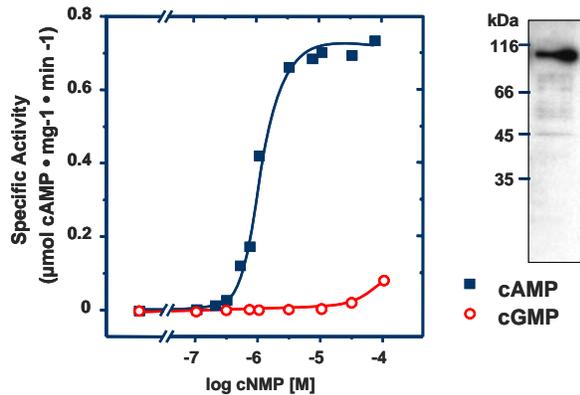
#### 4.2.1 Untersuchung der CyaB2 GAF-CyaB1 AC

Zur Untersuchung der Austauschbarkeit der CyaB1 GAF-Domänen gegen die GAF-Domänen aus CyaB2 wurde die Chimäre CyaB2 GAF-CyaB1 AC kloniert (s. 3.14.2.1).



Die Expression des Konstruktes bei 19°C über Nacht, die Lyse mit Frenchpress (3.6), eine Reinigung mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (3.7 und [107]) und anschließende Dialyse ergaben eine für die Aktivitätsbestimmung im AC-Test ausreichende Menge an löslichem Protein. Im Westernblot (3.3.3) zeigten sich kleinere Verunreinigungen von C-terminalen Abbruchbanden (Abb. 4.9).

Im AC-Test stimulierte cAMP die enzymatische Aktivität der Chimäre dosisabhängig mehr als 500-fach, wohingegen cGMP bis 100  $\mu$ M fast keinen Effekt zeigte.



**Abb. 4.9:** Aktivierung von CyaB2 GAF-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP, rechts ist der Westernblot mit 0,05  $\mu$ g aufgetragenem Protein gezeigt, [aus 107].

Der EC<sub>50</sub>-Wert betrug für cAMP 1,3  $\mu$ M und war damit fast identisch mit von CyaB1 [14, 15]. Bemerkenswerterweise zeigte die cAMP-Aktivierungskurve, dass die maximale Aktivität über einen nur 10-fachen Konzentrationsbereich von 0,3 bis 3  $\mu$ M erreicht wurde. Dementsprechend lag der Hill-Koeffizient bei 2,2, ein Hinweis auf eine starke positive Kooperativität (auch Tab. 4.1).

Dies stellte einen Unterschied zur Aktivierung durch cAMP in CyaB1 dar, dort betrug der Hill-Koeffizient nur 0,7, d.h. es bestand keine Kooperativität. Die  $k_{on}$ - und  $k_{off}$ -Werte für CyaB2 GAF-CyaB1 AC waren sehr niedrig (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die allosterischen Änderungen als Antwort auf eine cAMP-Bindung sehr schnell verlaufen.

#### 4.2.2 Untersuchungen der NKFDE-Motive der CyaB2 GAF-Domänen: CyaB2 GAF D224A-, CyaB2 GAF D416A- und CyaB2 GAF D224A/D416A-CyaB1 AC

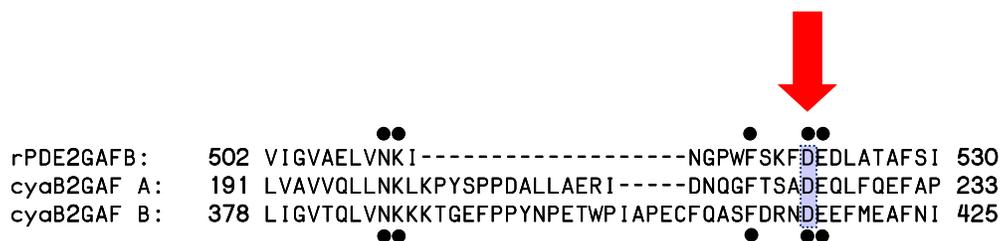
Die CyaB2 GAF-Domänen besitzen das o.a. konservierte NKFDE-Motiv in GAF A und B (vgl. Abb. 4.7). Die Aminosäuren dieses Motivs sind nicht an der cAMP-Bindung beteiligt [105].

Sie müssen die Signalübertragung der Bindungsstelle jedoch indirekt beeinflussen, denn mehrere Arbeiten bestimmten über D/A-Mutanten, welche der beiden GAF-Domänen, A oder B, für die Aktivierung des katalytischen Zentrums verantwortlich sein sollten [2, 14, 27, 30]. Diese Studien zeigten, dass in PDE2 GAF B, in PDE5 GAF A, in CyaB1 GAF B und in *T.brucei* PDE2B GAF A die cNMP-bindenden

Domänen darstellen [1, 14, 24, 25, 32]. Die Kristallstruktur der CyaB2 GAF-Domänen (4.1, [105]) zeigte jedoch überraschend, dass cAMP sowohl in GAF A als auch in GAF B gebunden war.

Dies warf die Frage auf, ob beide cAMP-bindenden GAF-Domänen an der Aktivierung beteiligt sind. Der im Gegensatz zum CyaB1 Holoenzym sehr hohe Hill-Koeffizient von 2,2 (Tab. 4.1) deutete auf eine starke kooperative Aktivierung der AC durch cAMP hin. Dies ließ die Vermutung zu, dass beide GAF-Domänen für das Erreichen der vollen Aktivierung nötig sein könnten.

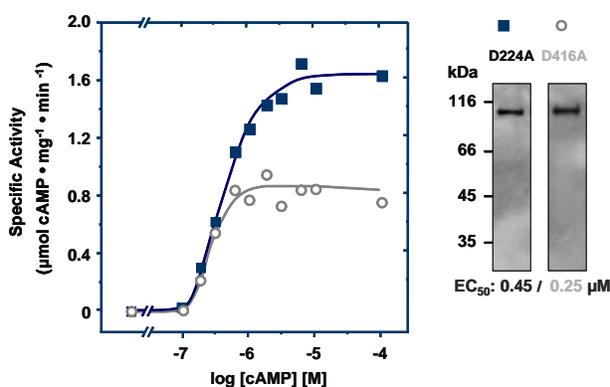
Um diese Frage zu klären wurden in CyaB2 die konservierten Aspartate des NKFDE-Motivs in je einer oder beiden CyaB2 GAF-Domänen zum Alanin mutiert.



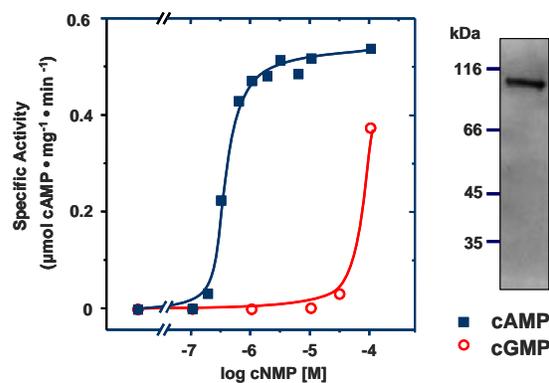
Die Konstrukte CyaB2 GAF D224A-CyaB1 AC, CyaB2 GAF D416A-CyaB1 AC und CyaB2 GAF D224A/D416A-CyaB1 AC wurden wie unter 3.14.2.3, 3.14.2.4 und 3.14.2.5 beschrieben, kloniert und exprimiert. Im AC-Test zeigte sich, dass alle drei Konstrukte durch cAMP aktivierbar waren (Abb. 4.10 und 4.11). Auch die hohen Aktivierbarkeitsfaktoren von 430 für D224A, 850 für D416A und 625 für D224A/D416A ließen auf keinerlei Funktionsverlust durch die Asp zu Ala-Mutationen in beiden GAF-Domänen schließen. Die Bevorzugung von cAMP gegenüber cGMP blieb in allen Konstrukten erhalten, auch wenn in D224A/D416A der  $EC_{50}$ -Wert für cGMP sank.

Die Aktivierbarkeitskurven verliefen bei CyaB2 GAF D224A-, D416A-, und D224A/D416A-CyaB1 AC weniger steil als bei CyaB2 GAF-CyaB1 AC. Dies zeigte sich in einem Absinken der Hill-Koeffizienten auf 1,4, 1,6 und 1,7 (Tab. 4.1). Die  $EC_{50}$ -Werte für cAMP betragen bei D224A  $0,5 \mu\text{M}$ , bei D416A und D224A/D416A  $0,3 \mu\text{M}$  und entsprachen damit dem Ausgangskonstrukt. Die ca. 100-fach höhere Affinität für cAMP im Vergleich zu cGMP blieb in allen Konstrukten erhalten.

Das Fehlen eines Effekts der D/A-Mutationen im NKFDE-Motiv beider CyaB2 GAF-Domänen stand im völligen Gegensatz zu den Beobachtungen mit entsprechenden Mutationen in PDE2, PDE5 und CyaB1 [2, 14, 25, 27–30]. Die konservierten Aspartate sind in dieser Tandem GAF-Domäne damit nicht für eine intramolekulare Signalübertragung erforderlich.



**Abb. 4.10:** Aktivierung von CyaB2 GAF D224A-CyaB1 AC und CyaB2 GAF D416A-CyaB1 AC durch cAMP. Die Quadrate stehen für D224A (Mutation von Asp in GAF A), die Kreise kennzeichnen D416A (Mutation von Asp in GAF B). Rechts sind die Westernblots mit je 1,5 µg aufgetragenem Protein gezeigt. Die Kurven für cGMP sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt, [aus 107].



**Abb. 4.11:** Aktivierung von CyaB2 GAF D224A/D416A-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP, rechts ist der Westernblot mit 1,5 µg aufgetragenem Protein gezeigt, [aus 107].

### 4.2.3 Untersuchung der verkürzten CyaB2 GAF-CyaB1 AC-Chimären

Nachdem bisher die Mutation von Asp **oder** Lys im NKFDE-Motiv von PDE2, 5, 6 und CyaB1 die cNMP-Bindung signifikant reduziert oder verhindert hatte [2, 14, 25–27, 30] und in den Kristallstrukturen von PDE2A [1] und CyaB2 [105] eine Salzbrücke zwischen Lys und Asp sichtbar geworden war, wurde postuliert, dass diese Salzbrücke die cNMP-Bindungstasche stabilisieren könnte.

Genaue Betrachtungen der Kristallstrukturen von CyaB2 GAF ergaben, dass N386 in GAF B bzw. N199 in GAF A (d.h. die konservierten Asparagine in jedem NKFDE-Motiv) H-Brücken zu Hauptketten-Amiden und einer Carbonylgruppe im  $\alpha 4$ - $\beta 5$ -Linker ausbilden (Abb. 4.8) und dadurch wahrscheinlich die Bindungstasche stabilisieren. Die benachbarte Salzbrücke zwischen dem Lysin und Aspartat des NKFDE-Motivs sorgt damit für eine starke Wechselwirkung mit der  $\alpha 5$ -Helix und stabilisiert so die Orientierung dieser beiden Strukturelemente.

Nachdem die D/A-Mutationen in CyaB2 keinen Effekt gezeigt hatten, wurde vermutet, dass die 14 und 19 AS langen Einschübe zwischen dem konservierten Lys und Phe im NKFDE-Motiv der CyaB2 GAF-Domänen für diese unerwarteten Ergebnisse verantwortlich sein könnte (Abb. 4.8 und S. 99).

Diese zusätzlichen AS liegen nahe am  $\alpha 4$ -helicalen Rand der Bindungstasche, vor allem in GAF B. Es gibt auch Kontakte zwischen AS des Einschubs und dem  $\alpha 4$ - $\beta 5$ -Linker, der die  $\alpha 4$ -Helix mit dem  $\beta$ -Faltblatt oder einer Einheit bestehend aus  $\beta$ -

Faltblatt und den Helices  $\alpha 2$  und  $\alpha 5$  verbindet. Aufgrund der strukturellen Eigenheiten der CyaB2 GAF-Domänen bestand die Möglichkeit, dass die Einschübe die Lage und Orientierung der  $\alpha 4$ -Helix und die wichtigen AS T176 und T363 innerhalb der cAMP-Bindungstasche stabilisieren, so dass die ansonsten essentiell erscheinende Lys-Asp-Salzbrücke entbehrlich wird.

Um dies zu überprüfen wurden die AS L202 bis I215 in GAF A und L389 bis C407 in GAF B entfernt. Damit wurden die CyaB2 GAF-Domänen auf die gleiche Länge wie PDE2A GAF B gebracht. Um die Beweglichkeit dieses Bereichs zu erhalten wurde in GAF B K388 durch ein Glycin ersetzt. Abb. 4.12 stellt das erhaltene Konstrukt [im Folgenden als CyaB2 GAFverk.-CyaB1 AC bezeichnet] dar.

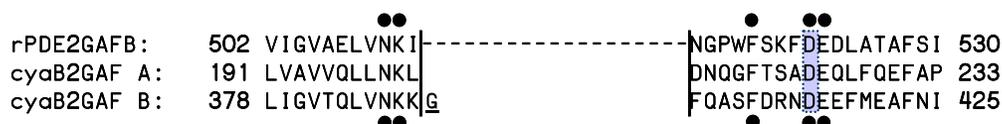


Abb. 4.12: Die verkürzten GAF A- und B-Domänen von CyaB2 im Vergleich mit PDE2 GAF B, [nach 107].

Das Konstrukt CyaB2 GAFverk.-CyaB1 AC wurde kloniert (3.14.2.6) und auf Aktivierbarkeit durch cAMP getestet. Nachdem die Ausbildung einer Lysin-Aspartat-Salzlücke in diesem Konstrukt noch möglich sein sollte, wurde angenommen, dass die Dosis-Wirkungskurven für cAMP und cGMP der unverkürzten CyaB2 GAF-CyaB1 AC entsprechen würden. Diese Vermutung traf zu, der  $EC_{50}$ -Wert für cAMP lag bei  $1 \mu\text{M}$  und cGMP wirkte kaum aktivierend. Allerdings lag der Aktivierbarkeitsfaktor mit nur 103-fach deutlich unter den Werten der unverkürzten Konstrukte (Abb. 4.13 und Tab. 4.1).

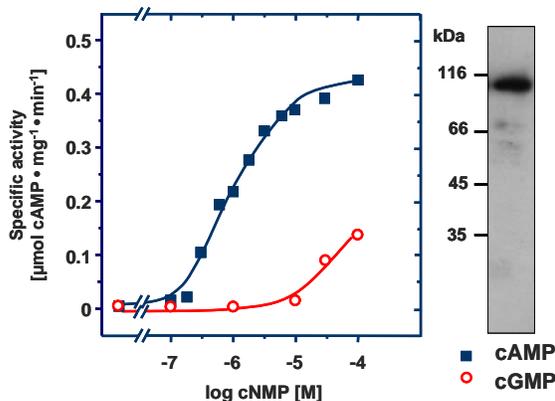
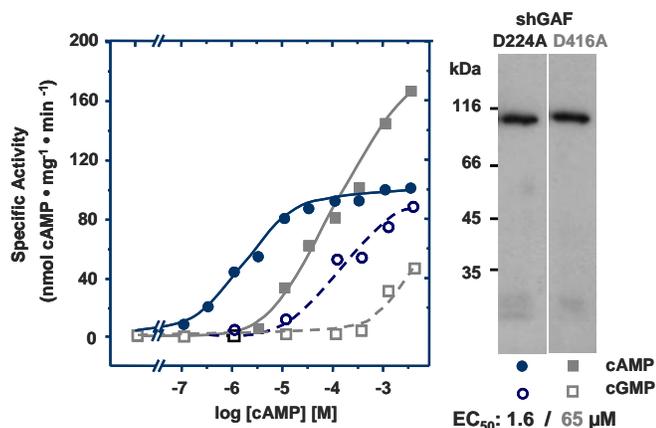


Abb. 4.13: Aktivierung von CyaB2 GAFverk.-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP, rechts ist der Westernblot mit  $0,2 \mu\text{g}$  aufgetragenem Protein gezeigt, [aus 107].

Der Hill-Koeffizient sank auf 0,7, d.h. keine Kooperativität (Tab. 4.1). Dieses Ergebnis paßte zu früheren Versuchsergebnissen mit den CyaB1 und rPDE2a GAF-Domänen. Das CyaB1 Holoenzym hatte einen Hill-Koeffizienten von 0,7, die Chimäre aus

**Abb. 4.14:** Aktivierung von CyaB2 D224Averk.-CyaB1 AC (Kreise) und D416Averk.-CyaB1 AC (Quadrate) durch cAMP und cGMP, rechts sind die Westernblots mit je 0,2  $\mu\text{g}$  aufgetragenen Protein gezeigt, [nach 107].



rPDE2a GAF-Domänen und CyaB1 AC [15] von 0,9. Damit scheinen die Einschübe in CyaB2 für eine positive Kooperativität verantwortlich.

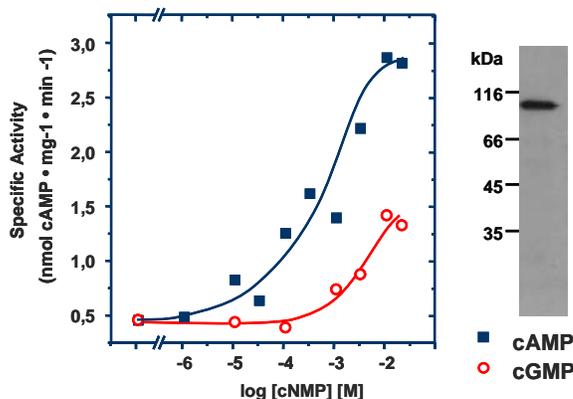
Anschließend wurde der Effekt der D/A-Mutation im verkürzten Konstrukt untersucht. Die erhaltenen Konstrukte CyaB2 D224verk.-CyaB1 AC und CyaB2 D416Averk.-CyaB1 AC (3.14.2.7, 3.14.2.8) zeigten unterschiedliche  $EC_{50}$ -Werte und Aktivierbarkeitsfaktoren für cAMP (Abb. 4.14).

In CyaB2 D224verk.-CyaB1 AC betrug der  $EC_{50}$ -Wert für cAMP 1,6  $\mu\text{M}$  und war damit nur wenig größer als im Ausgangskonstrukt (Tab. 4.1), die Aktivierbarkeit sank auf nur noch 23-fach.

Bei CyaB2 D416Averk.-CyaB1 AC war die Stimulation durch cAMP mit 76-fach, der  $EC_{50}$ -Wert stieg auf 65  $\mu\text{M}$ . Der  $EC_{50}$ -Wert lag damit bei D416Averk. 30-fach höher als bei D224Averk.. Die Hill-Koeffizienten betragen 0,50 bzw. 0,55. Damit war der Verlust der Kooperativität in beiden Konstrukten offensichtlich. Dies deckte sich mit den Ergebnissen von CyaB2 GAFverk.-CyaB1 AC. Auffallend an den CyaB2 D224Averk.- und CyaB2 D416Averk.-CyaB1 ACn war, dass ihre maximal erreichbare spezifische Aktivität bei Stimulation mit cAMP mit ca. 100  $\text{nmol cAMP} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  (D224Averk.) und ca. 170  $\text{nmol cAMP} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  (D416Averk.) deutlich unter den Aktivitäten der bisherigen Konstrukte (größer 400  $\text{nmol cAMP} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ ) lagen. Die verringerte Aktivität korreliert mit den reduzierten Aktivierbarkeitsfaktoren und dem Verlust der Kooperativität (Tab. 4.1).

Die D/A-Mutationen in der verkürzten CyaB2 GAF-Domäne konnten damit eine Aktivierung des katalytischen Zentrums nicht unterbinden, ihre unterschiedlichen Auswirkungen in GAF A bzw. GAF B lassen jedoch darauf schließen, dass beide GAF-Domänen in unterschiedlichem Ausmaß an der Aktivierung der AC beteiligt sind. Dies war beim unverkürzten Konstrukt nicht erkennbar. Dort machte der kompensatorische Effekt der  $\beta 2$ - $\beta 3$ -Schleife die Salzbrücke zwischen Lys und Asp entbehrlich. Trotz D/A-Mutation in einer oder beiden GAF-Domänen konnte cAMP an beide binden und stimulieren.

Im letzten Schritt wurden nun die Aspartate in beiden GAF-Domänen der CyaB2



**Abb. 4.15:** Aktivierung von CyaB2 D224Averk./D416Averk.-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP, rechts ist der Westernblot mit 0,2  $\mu\text{g}$  aufgetragenem Protein gezeigt, [nach 107].

GAFverk.-CyaB1 AC zu Ala mutiert und damit die Mutante CyaB2 D224Averk./D416Averk.-CyaB1 AC (s. 3.14.2.9) erzeugt. Die exprimierte Proteinmenge und gemessene AC-Aktivität waren bei diesem Konstrukt geringer als bei den bisher untersuchten. Die Basalaktivität lag mit  $0,4 \pm 0,1 \text{ nmol cAMP} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  ( $n=6$ ) im Vergleich mit den anderen CyaB2-CyaB1 AC-Konstrukten im unteren Bereich. Die AC-Aktivität war linear mit Proteinmenge und Zeit. Die Aktivität wurde durch 1 mM  $\beta, \gamma$ -ImidogTP (= GMPPNP) um mehr als 75% gehemmt. Im gleichen Ausmaß hemmte 1 mM GMPPNP auch die Aktivitäten von CyaB2 GAF-CyaB1 AC, CyaB2 D224Averk.-CyaB1 AC, CyaB2 D416Averk.-CyaB1 AC und CyaB1 (nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die enzymatischen Eigenschaften der katalytischen Domäne in CyaB2 D224Averk./D416Averk.-CyaB1 AC mit denen anderer Mutanten mit CyaB1 als katalytischem Zentrum übereinstimmen. Dies wurde als Beweis dafür gewertet, dass die geringere Aktivität und Aktivierbarkeit dieser Chimäre nicht auf Fehlfaltung zurückzuführen ist.

Es zeigte sich, dass CyaB2 D224Averk./D416Averk.-CyaB1 AC nur mit sehr hohen cAMP-Konzentrationen 6-fach aktiviert wurde (Abb. 4.15). Die  $EC_{50}$  für cAMP betrug  $450 \mu\text{M}$ , der Hill-Koeffizient von 0,69 zeigte den Verlust der positiven Kooperativität an. Die 6-fache Aktivierbarkeit bestätigte, dass die Signalübertragung in CyaB D224Averk./D416Averk.-CyaB1 AC prinzipiell erhalten war.

Eine Übersicht über die Aktivierbarkeitsfaktoren,  $EC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten aller untersuchten CyaB2-CyaB1 AC-Konstrukte gibt Tabelle 4.1.

Um die Auswirkungen der Entfernung der  $\beta 2$ - $\beta 3$ -Schleife im NKFDE-Motiv zu verdeutlichen, wurden die Hill-Plots (cAMP) für CyaB1, für CyaB2 GAF-CyaB1 AC und CyaB2 GAFA+Bverk.-CyaB1 AC in einem Diagramm dargestellt (Abb. 4.16). Die Kurven von CyaB1 und CyaB2 GAFA+Bverk.-CyaB1 AC sind parallel, während CyaB2 GAF-CyaB1 AC mit einer Steigung von 2,2 steiler ist.

Konstrukt	EC <sub>50</sub> cAMP [μM]	Aktivierbarkeitsfaktor cAMP [×]	Hill-Koeffizient für cAMP	Korrelationskoeffizient
Wildtyp (CyaB2 GAF-CyaB1 AC)	1,3	200-1000	2,2	0,97
D224A	0.45	430	1.4	0.95
D416A	0.25	850	1.57	0.90
D224A/D416A	0.32	625	1.7	0.94
GAF verkürzt	1	103	0.65	0.96
GAF D224A verkürzt	1.6	23	0.50	0.95
GAF D416A verkürzt	65	76	0.55	0.97
GAF D224A/D416A verkürzt	450	6	0.69	0.92

Tab. 4.1: Übersicht über die Aktivierbarkeitsfaktoren, EC<sub>50</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten aller untersuchten CyaB2-CyaB1 AC-Konstrukte, [nach 107].

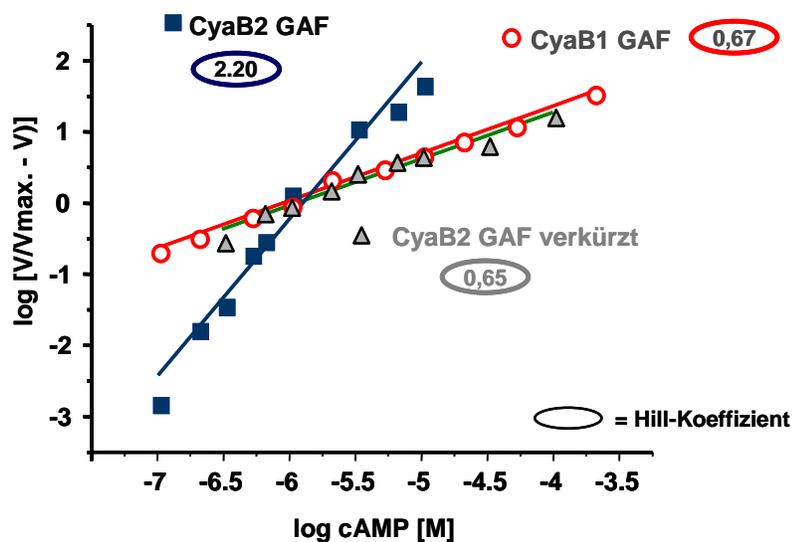


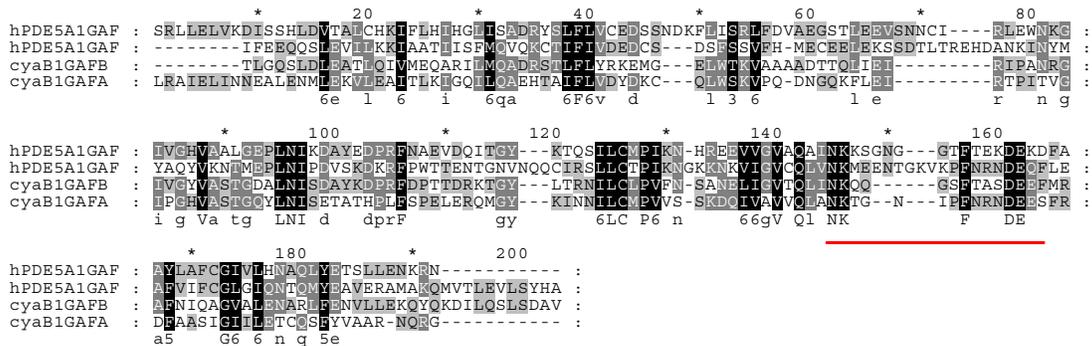
Abb. 4.16: Vergleich der Hill-Plots (cAMP) für CyaB1 (= CyaB1 GAF), für CyaB2 GAF-CyaB1 AC (= CyaB2 GAF) und CyaB2 GAF+A+Bverk.-CyaB1 AC (= CyaB2 GAF verkürzt).

### 4.3 PDE5 GAF-CyaB1 AC

Durch T. Kanacher [14, 15] wurde gezeigt, dass cAMP über Bindung an die GAF B-Domäne von CyaB1 autoaktiviert. Er zeigte auch, dass die GAF-Domänen der CyaB1 funktionell gegen die der Ratten-PDE-2A ausgetauscht werden können [14, 15] und man dadurch eine cGMP stimulierbare AC erhält. Die Funktion der GAF-Domäne ist somit über 3 Milliarden Jahre konserviert [14]. Aus der Struktur der Maus-PDE-2A [1] ist bekannt, dass die GAF A-Domäne für die Dimerisierung und die GAF B-Domäne für die Nucleotid-Bindung und Aktivierung des katalytischen Zentrums der PDE verantwortlich ist (Abb. 4.1, [1, 25]). Da auch in CyaB1 die Bindung des cAMPs und die Aktivierung der AC über GAF B erfolgt [14], erscheint ein funktioneller Austausch der CyaB1 GAF-Domänen durch die PDE2A GAF-Domänen eher möglich, als wenn ein über die GAF A signalisierendes GAF-Domänen-Tandem vor das katalytische Zentrum der CyaB1 gesetzt würde.

Dieser Versuch, ob eine Signalweitergabe über einen größeren Abstand zwischen Nucleotidbindungsstelle und katalytischem Zentrum der CyaB1 möglich ist, wurde mit dem Einbau der GAF-Domänen aus humaner PDE5A1 unternommen.

Die PDE5 besitzt wie CyaB1 [14] zwei N-terminale GAF-Domänen (Abb. 4.18). Die Sequenzähnlichkeiten zwischen den CyaB1- und PDE5-GAF-Domänen zeigt Alignment 4.17.



**Abb. 4.17:** Alignment der Tandem-GAF-Domänen von CyaB1 und hPDE5A1, je dunkler die Hintergrundbalken, desto größer die Ähnlichkeit. Das *NKFD*-Motiv ist in allen vier GAF-Domänen konserviert und mit einem Balken unterlegt.

Von der Tandem PDE5 GAF-Domäne ist bekannt, dass sie über Bindung von cGMP an die GAF A-Domäne stimuliert [24, 34, 108].

PDE5 besitzt in Position S102 eine Phosphorylierungsstelle, die Ergebnisse zur Phosphorylierung sind bisher widersprüchlich. Eine Phosphorylierung steigert die katalytische Aktivität der PDE und verstärkt die Bindung von cGMP an die GAF-Domänen [33, 35, 37, 38]. In einigen Untersuchungen wird die Besetzung einer oder beider GAF-Domänen mit cGMP jedoch als Voraussetzung für eine Phosphorylierung gesehen [28, 34, 41]. Auch gehen die Erkenntnisse darüber, ob die Phosphorylierung

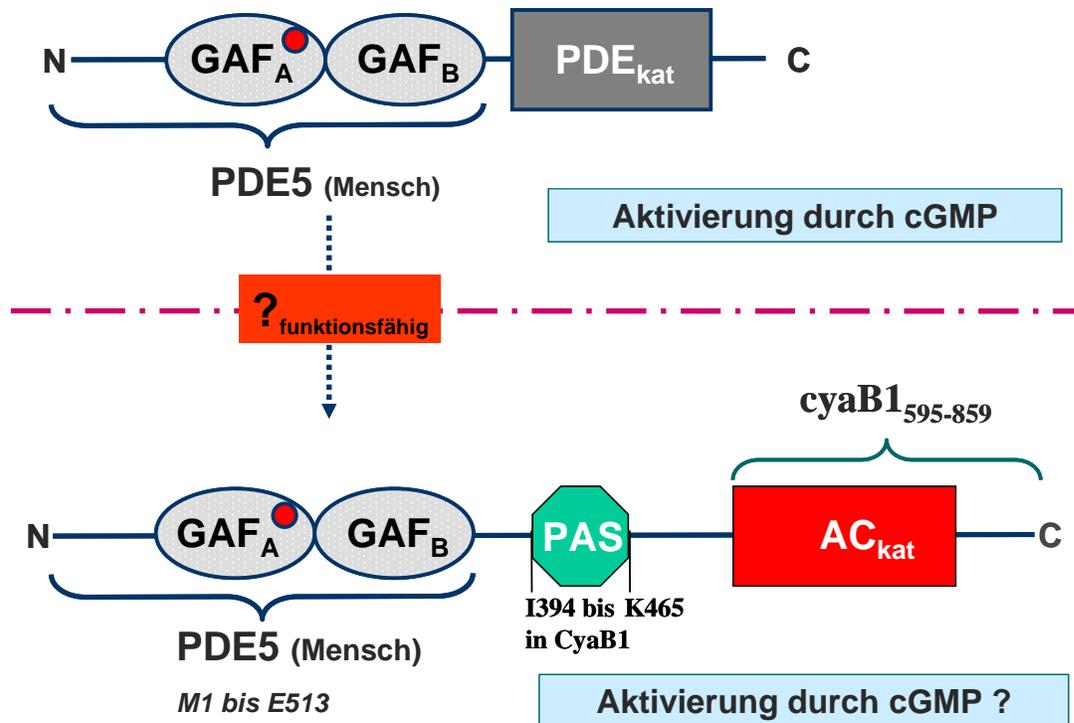


Abb. 4.18: Übersicht über den Einbau der PDE5-GAF-Domänen in CyaB1.

durch PKA oder nur PKG erfolgt, auseinander [34, 35, 37–39, 41]. Die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung bleibt mit der Vermutung, dass damit eine hohe PDE-Aktivität auch bei niedrigen cGMP-Spiegeln erhalten bleibt, spekulativ [37, 38].

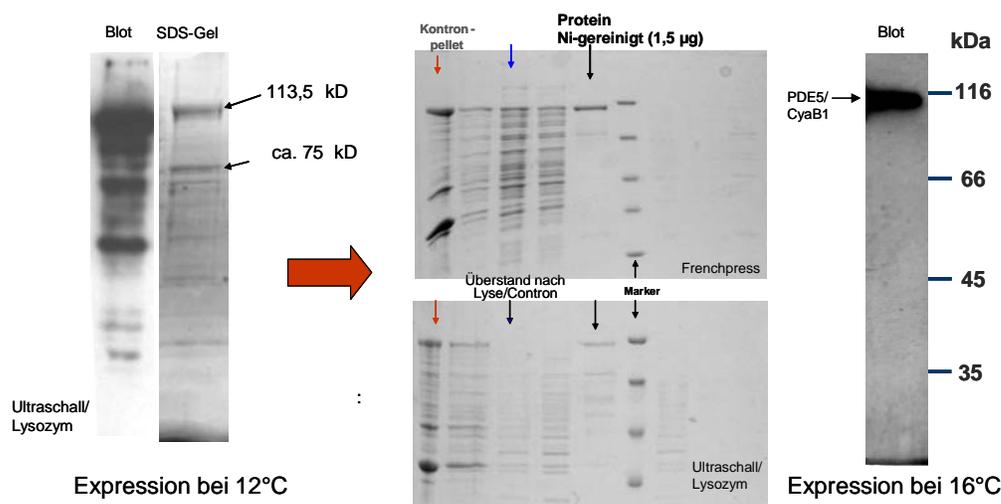
### 4.3.1 Biochemische Charakterisierung von PDE5 GAF-CyaB1 AC

In der Chimäre *PDE5 GAF-CyaB1 AC* ersetzt das PDE5-GAF-Tandem inklusive des 147-AS-langen N-Terminus (M1–E513) CyaB1 M1–L386 (Abb. 4.18). Die nachfolgenden Untersuchungen fragten, ob dieses Konstrukt (als PDE5 GAF-CyaB1 AC bezeichnet) exprimierbar, katalytisch aktiv und durch cGMP stimulierbar ist. Alle Meßwerte (z.B. Aktivierbarkeitsfaktoren oder  $EC_{50}$ -Werte) stellen den Mittelwert aus mindestens 4 Einzelwerten dar. Die Standardabweichung wurde als SEM angegeben<sup>1</sup>. Die angegebenen n-Werte geben die Anzahl der AC-Tests an und sind damit halb so groß wie die Anzahl der Einzelwerte. Kurven zeigen i. d. R. das Ergebnis eines AC-Testes (Mittelwert von zwei Bestimmungen). Die Bedingungen beim AC-Test waren 10 min, 37°C, 10 mM  $Mg^{2+}$  als Cofaktor, 75  $\mu$ M ATP, pH 7.5 Tris/HCl (sofern nicht anders angegeben).

<sup>1</sup>wenn keine SEM angegeben ist, sind nur zwei Einzelwerte vorhanden.

### 4.3.1.1 Expression und Reinigung von PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die Chimäre im pQE30-Vektor (3.14.3.1) besitzt einen N-terminalen Histag zur Reinigung mit Ni-NTA und eine Masse von 113,5 kDa. Der errechnete IP liegt bei pH 5,6. Die erste Expression der *PDE5 GAF-CyaB1 AC* erfolgte bei 12°C und 15 µM IPTG über Nacht (ca. 18 h). Diese Bedingungen waren von T. Kanacher und A. Schultz bei anderen Konstrukten erprobt worden. Die Zellen wurden gerettet, einem Stickstoffschock unterzogen und durch einstündige Lysozymeinwirkung aufgeschlossen. Anschließend wurde 3 mal 30 sec. mit Ultraschall (Stufe 4, 0°C) behandelt und über Nacht an Ni<sup>2+</sup>-NTA gebunden. Die Proteinausbeute war mit ca. 15 µg/200 ml *E. coli*-Kultur gering, außerdem war die Reinheit mangelhaft (Abb. 4.19).



**Abb. 4.19:** Expression und Reinigung von PDE5 GAF-CyaB1 AC:

Links: Expression bei 12° und Lyse mit Ultraschall/Lysozym. Im Western-Blot und SDS-Gel sind viele Abbruchprodukte bzw. Verunreinigungen erkennbar.

Rechts: Optimierte Expression bei 16°C - die Lyse mit *Frenchpress* ergibt mehr lösliches Protein, es sind wenige Verunreinigungen im SDS-Gel, bzw. keine Abbruchprodukte im Westernblot erkennbar.

Reinigungsversuche mit FPLC (verwendete Säulen: Mono Q und Superose 12) brachten keine Verbesserung. Ausbeute und Reinheit wurden durch Variation folgender Bedingungen verbessert:

- Temperatur (Expression bei 16°C, 18°C, 20°C, 22°C)
- Lyse durch Frenchpress statt Ultraschall/Lysozym
- Erhöhung der IPTG-Konzentration
- Variation der zur Bindung verwendeten Ni-NTA-Menge

Die besten Reinigungserfolge und Proteinausbeuten wurden bei 16°C über Nacht mit 25  $\mu\text{M}$  IPTG erreicht. Die Lyse erfolgte durch Frenchpress-Aufschluß. Es wurde 1,5 h an 110  $\mu\text{l}$  Ni-NTA/200 ml *E. coli*-Kultur gebunden (Abb. 4.19). Die Ausbeuten betragen 110-170  $\mu\text{g}$  Protein/200 ml *E. coli*-Kultur. Der Zusatz von *Complete-EDTA-free*-Proteaseinhibitortabletten während der Reinigung reduzierte Abbruchprodukte.

Bei der Durchführung von Western-Blots mußte mindestens 3 h geblottet werden. Bei kürzerer Zeit wurde nur ein Teil des gewünschten Proteins transferiert.

#### 4.3.1.2 Aktivierbarkeit von PDE5 GAF-CyaB1 AC mit cGMP und cAMP

Gereinigte PDE5 GAF-CyaB1 AC wurde mit cGMP und cAMP auf Aktivität getestet.

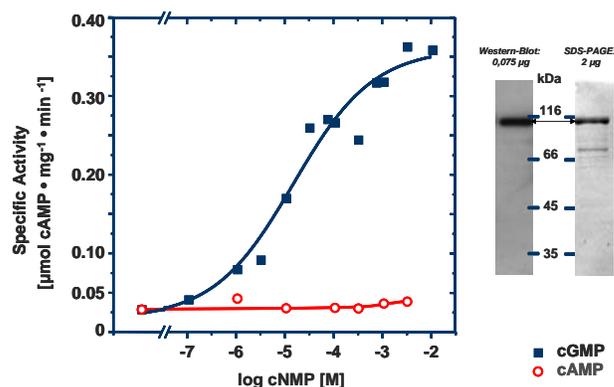


Abb. 4.20: Aktivierbarkeit von PDE5 GAF-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP.

PDE5 GAF-CyaB1 AC ist nicht nur katalytisch aktiv, sondern wird auch durch cGMP stimuliert, cAMP zeigt keine Aktivierung (Abb. 4.20). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für cGMP lag bei  $9,6 \pm 1,81 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ), der Aktivierbarkeitsfaktor betrug  $10,2 \pm 0,4$  ( $n=34$ ). Damit ist der Austausch der GAF-Domänen vor CyaB1 AC nicht nur durch die rPDE2a GAF-Domänen, sondern auch durch die über GAF A signalisierenden PDE5-GAF-Domänen möglich und man erhält eine selektiv durch cGMP stimulierbare AC.

#### 4.3.1.3 Weitere Charakterisierung von PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die Proteinabhängigkeit zeigte eine konstante spezifische Aktivität  $\pm 100 \mu\text{M}$  cGMP (Abb. 4.21). Die eingesetzte Menge der gereinigten *PDE5 GAF-CyaB1 AC* lag zwischen 3,4 und 910 ng.

Eine Aktivierung der PDE5 GAF-CyaB1 AC durch im Test gebildetes cAMP ist ausgeschlossen, da cAMP auch bei einer Konzentration von 3 mM keine Stimulation der AC-Aktivität bewirkt (Abb. 4.20). Offensichtlich ist das Protein schon bei sehr kleinen Konzentrationen dimerisiert, denn nur dann ist die AC aktiv.

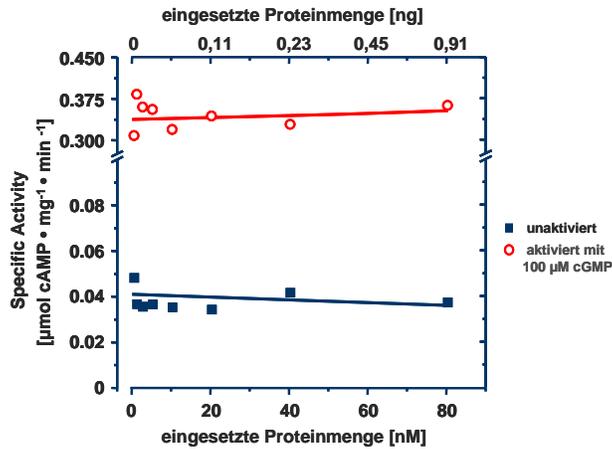


Abb. 4.21: Proteinabhängigkeit von *PDE5 GAF-CyaB1 AC*, 0,3–80 nM gereinigtes Protein.

Das pH-Optimum liegt  $\pm 100 \mu\text{M}$  cGMP zwischen pH 7.0 und 9.0 (Abb. 4.22). Eine deutlich geringere Aktivität als bei Tris/HCl zeigte sich mit Tes/NaOH als Puffer. Auch mit Hepes/NaOH wurde eine geringere Aktivität festgestellt. Alle folgenden Tests wurden in Tris/HCl pH 7,5 durchgeführt. So ist ein Datenvergleich mit CyaB1 möglich.

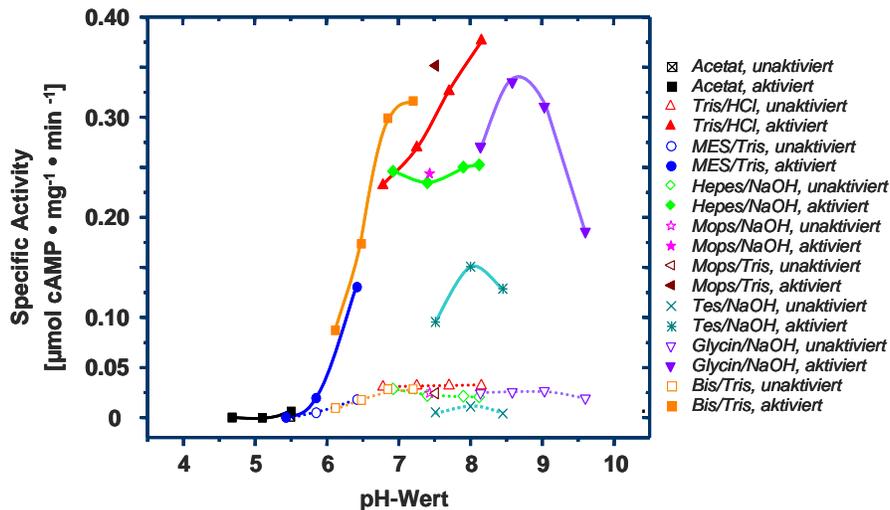


Abb. 4.22: pH-Abhängigkeit von *PDE5 GAF-CyaB1 AC* in verschiedenen Puffersystemen (Testbedingungen: 10 min,  $37^\circ\text{C}$ , 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  als Cofaktor,  $75 \mu\text{M}$  ATP).

Das Temperaturoptimum lag für die unaktivierte Chimäre bei  $54^\circ\text{C}$ , für die mit  $100 \mu\text{M}$  cGMP aktivierte Chimäre bei  $50^\circ\text{C}$  (Abb.4.23) und entspricht in etwa demjenigen des katalytischen Zentrums der CyaB1. CyaB1 selbst hat ein um ca.  $12^\circ\text{C}$  nied-

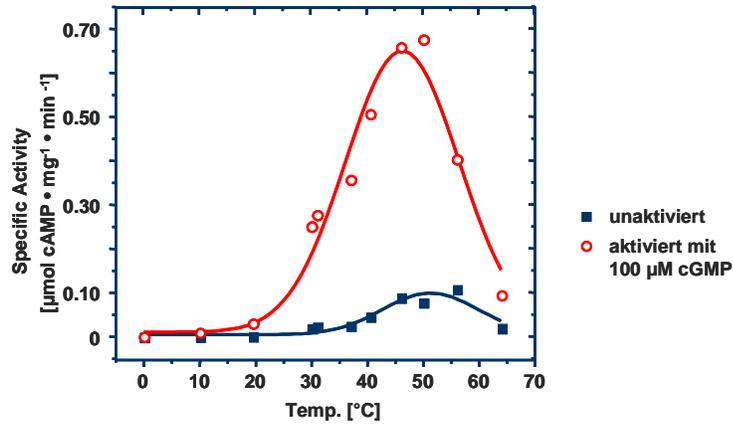


Abb. 4.23: Temperatur-Abhängigkeit von *PDE5 GAF-CyaB1 AC*  
(Testbedingungen: 10 min, 10 mM  $Mg^{2+}$ , 75  $\mu$ M ATP, pH 7.5 Tris/HCl).

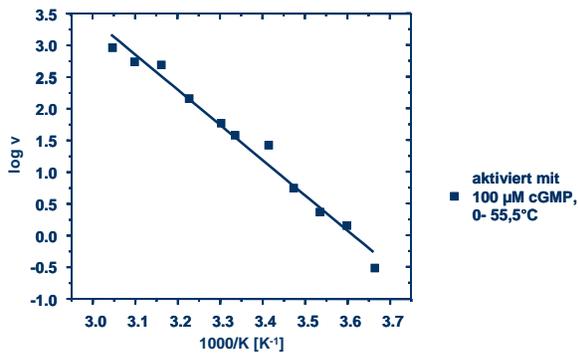


Abb. 4.24: Arrhenius-Plot zur Bestimmung von  $E_A$ , aktiviert mit 100  $\mu$ M cGMP.

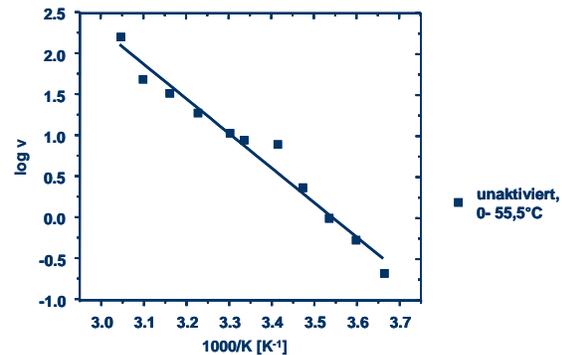


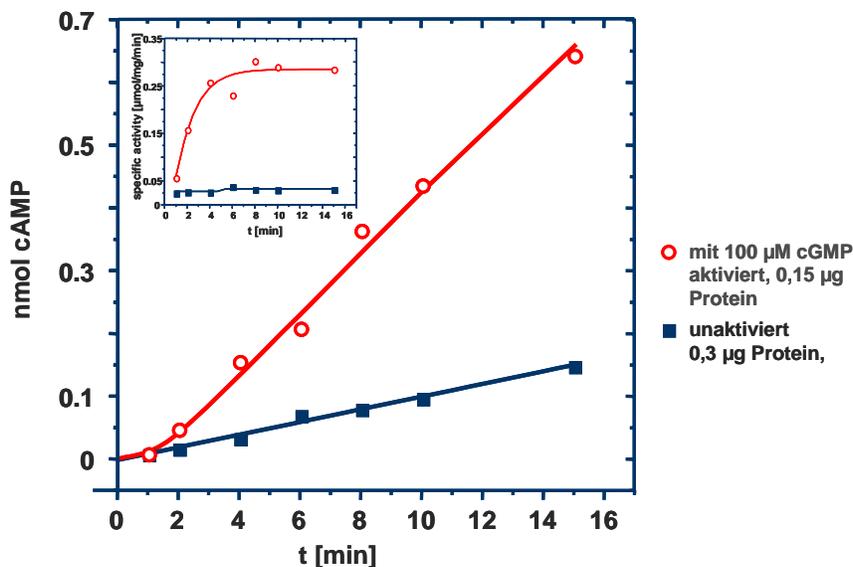
Abb. 4.25: Arrhenius-Plot zur Bestimmung von  $E_A$ , unaktiviert.

rigeres Temperaturoptimum [15].

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie  $E_A$  für das aktivierte und unaktivierte Konstrukt wurden mit den im linearen, ansteigenden Bereich liegenden Werten Arrheniusplots durchgeführt. Daraus berechneten sich Aktivierungsenergien von  $E_A = 100$  kJ/(mol·K) für das mit 100  $\mu$ M cGMP aktivierte Konstrukt und von 70 kJ/(mol·K) für das unaktivierte Konstrukt. Diese Werte liegen im gleichen Bereich wie die katalytische Domäne von CyaB1 ( $E_A = 97$  kJ/(mol·K)) und wie das CyaB1 Holoenzym ( $E_A = 65$  kJ/(mol·K)).

Um meine Daten mit den Ergebnissen von CyaB1 vergleichen zu können, wurde bei 37°C getestet.

Die Zeitabhängigkeit der Bildung von cAMP durch PDE5 GAF-CyaB1 AC war  $\pm 100 \mu\text{M}$  cGMP linear (Abb. 4.26). Da der Reaktionsansatz nicht vorgewärmt wurde, steigt die spezifische Aktivität bis zur vierten Testminute an (eingefügte Abbildung links oben). Erst danach wurde volle AC-Aktivität erhalten.



**Abb. 4.26:** Zeitabhängigkeit von *PDE5 GAF-CyaB1 AC*  $\pm 100 \mu\text{M}$  cGMP (Testbedingungen: 1 bis 15 min,  $37^\circ\text{C}$ ,  $10 \text{ mM Mg}^{2+}$ ,  $75 \mu\text{M ATP}$ ,  $\text{pH } 7.5$  Tris/HCl).

#### 4.3.1.4 Kinetische Charakterisierung von PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die Substratkinetik für ATP mit  $\text{Mg}^{2+}$  als Cofaktor wurde  $\pm 100 \mu\text{M}$  cGMP bestimmt. Die  $K_M$ -Werte wurden aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb. 4.28) berechnet. Sie betragen gleichermaßen  $13 \mu\text{M}$ . Der AC-Test konnte damit weiterhin mit  $75 \mu\text{M ATP}$  als Substrat durchgeführt werden.  $V_{max}$  lag für das unaktivierte Konstrukt bei  $51 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ , für das aktivierte bei  $435 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ . Die Hill-Koeffizienten lagen bei  $0,98$  (aktiviert) bzw.  $0,93$  (unaktiviert). Damit kann von keiner Kooperativität ausgegangen werden.

#### 4.3.1.5 Die Geschwindigkeit der Aktivierung und Deaktivierung durch cGMP ( $k_{on}$ ; $k_{off}$ )

Es stellte sich die Frage, wie schnell cGMP an die GAF-Domänen der PDE5 bindet und die AC aktiviert. Dieser  $k_{on}$ -Wert ist neben dem Interesse an der Geschwindigkeit der cGMP-Bindung und der Signalweitergabe ans katalytische Zentrum auch von praktischem Interesse. Aus dem Wert leitet sich ab, wie lange man den Testansatz mit cGMP vorinkubieren muss, um die volle Stimulation zu messen.

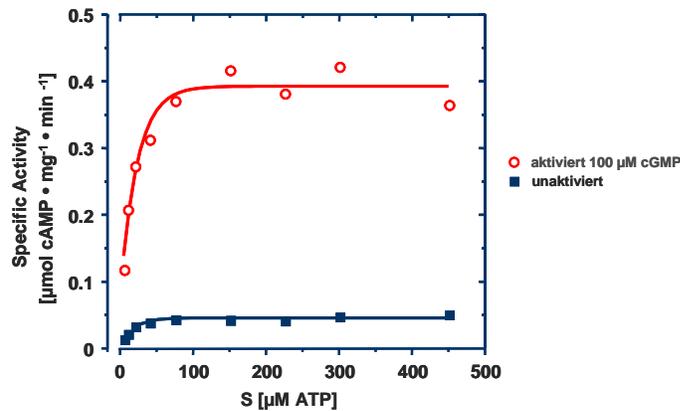


Abb. 4.27: Michaelis-Menten-Kinetik von *PDE5 GAF-CyaB1 AC*,  $\pm 100 \mu\text{M}$  cGMP (Testbedingungen: 10 min, 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 37°C, 5 bis 450  $\mu\text{M}$  ATP, pH 7.5 Tris/HCl).

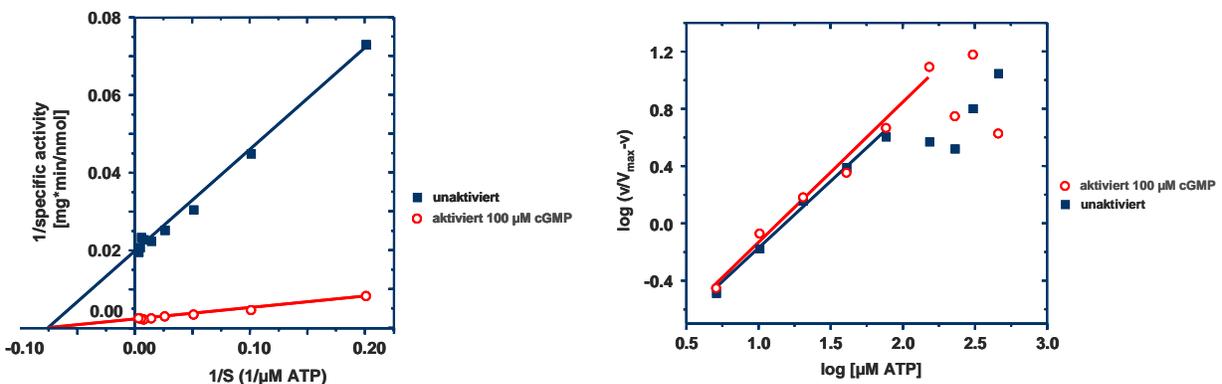
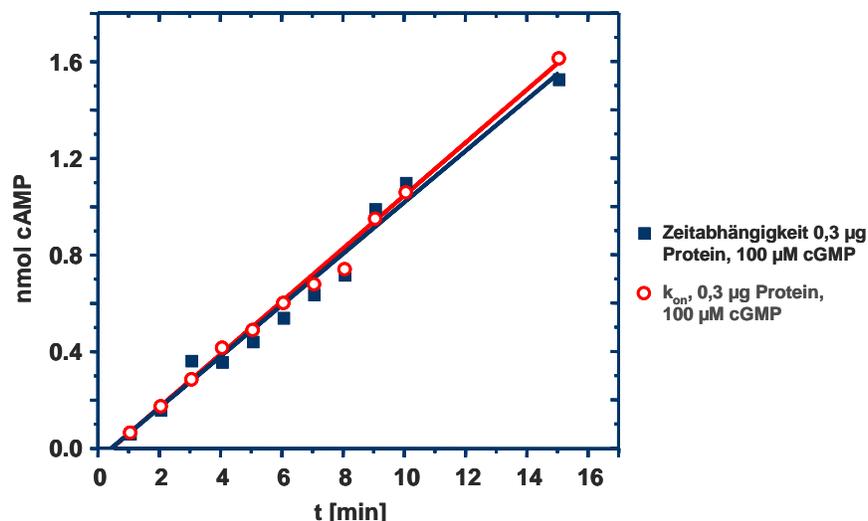


Abb. 4.28: Lineweaver-Burk zur Darstellung der Daten aus Abb. 4.27.

Abb. 4.29: Hill-Plot, *PDE5 GAF-CyaB1 AC*,  $\pm 100 \mu\text{M}$  cGMP.

Die Messung wurde analog der Zeitabhängigkeitsmessung durchgeführt. Reaktionspuffer, radioaktiv-markiertes Substrat (ATP) und 100  $\mu\text{M}$  cGMP zur Aktivierung wurden vorgelegt, dann wurde 30 s bei 37°C vorgewärmt und durch die Zugabe von Proteinlösung gestartet. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 15 min wurde abgestoppt. Die Umsätze wurden mit Werten verglichen, die erhalten wurden, wenn Proteinlösung 15 min mit cGMP vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des radioaktiv-markierten Substrats (ATP) gestartet wurde.

Wenn die Aktivierung der AC durch cGMP sehr schnell erfolgt, sollte für die durch Proteinzugabe gestarteten Ansätze der gleiche Umsatz resultieren wie für die mit cGMP vorinkubierten Ansätze. Wenn die Aktivierung durch cGMP langsam erfolgt, ist eine hyperbole Kurve zu erwarten, da die spezifische Aktivität der AC nur langsam ansteigt. Um den bei der Bestimmung der Zeitabhängigkeit gezeigten Temperatureffekt am Anfang der Messung auszuschließen, wurde hier für 30 s bei 37°C vorgewärmt.



**Abb. 4.30:** Zeitabhängigkeit und  $k_{on}$  der mit  $100 \mu\text{M}$  cGMP aktivierten *PDE5 GAF-CyaB1 AC*-Chimäre (Testbedingungen: 1 bis 15 min,  $37^\circ\text{C}$ ,  $10 \text{ mM Mg}^{2+}$ ,  $75 \mu\text{M ATP}$ ,  $\text{pH } 7.5$  Tris/HCl).

Beide Kurven weisen einen linearen Verlauf auf (Abb. 4.30). Somit bindet cGMP sehr schnell an die GAF-Domänen und die Signalübertragung ans katalytische Zentrum der AC erfolgt innerhalb der ersten Minute nach cGMP-Zugabe. Eine Vorinkubation zum Erreichen einer vollen AC-Stimulation ist damit unnötig.

Die Abdissoziationsgeschwindigkeit von cGMP von den GAF-Domänen bzw. die Dauer der Aktivierung nach Entfernen von cGMP (Verdünnung) ( $= k_{off}$ ) wurde bestimmt. *PDE5 GAF-CyaB1 AC* wurde 10 min mit  $100 \mu\text{M}$  cGMP inkubiert, dann wurde auf  $119 \text{ nM}$  cGMP verdünnt und nach verschiedenen Zeiten getestet. Aus technischen Gründen lag der früheste Meßpunkt bei 5 min. Es zeigte sich, dass cGMP innerhalb der ersten 5 min nach Verdünnen abdissoziiert und damit die Aktivierung des Konstruktes endete (Abb. 4.31).

Die für die *PDE5 GAF-CyaB1 AC* gefundenen schnellen  $k_{on}$  und  $k_{off}$ -Werte decken sich nicht mit den für die *PDE5* erhaltenen Ergebnissen bei cGMP-Bindungsstudien. Für diese wurden sehr viel langsamere Kinetiken (ca. 15 min für die vollständige on-Reaktion [24] und 2-7 h für die vollständige off-Reaktion [27, 34]) festgestellt. Man könnte die Unterschiede jedoch auf eine Wechselwirkung mit der katalytischen Domäne der *PDE5* zurückführen. Bindungsassays mit den isolierten GAF-Domänen ergaben ebenfalls Hinweise auf eine langandauernde cGMP-Bindung (30 min bis 4,5 h) [31, 34, 35, 40].

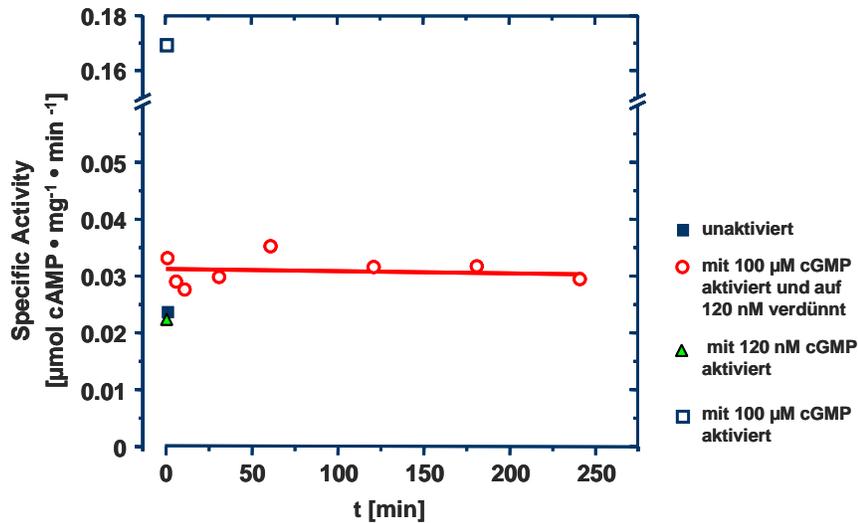


Abb. 4.31:  $k_{off}$ : Geschwindigkeit der Abdissoziation cGMP von *PDE5 GAF-CyaB1 AC*, nach Vorinkubation mit 100  $\mu\text{M}$  cGMP und Verdünnen auch 119 nM cGMP.

#### 4.3.1.6 Bindung von cAMP und cGMP an PDE5 GAF-CyaB1 AC

Um eine Bindung von cGMP an die PDE5-GAF-Domänen nachzuweisen, wurde ein Bindungsassay (3.11) mit PDE5 GAF-CyaB1 AC durchgeführt. Im Test wurden 1,5  $\mu\text{g}$  der Chimäre eingesetzt, dies entspricht 13,37 pmol PDE5 GAF-CyaB1 AC, bei Zusatz von 30  $\mu\text{M}$  cAMP oder cGMP konnte unter den gewählten Bedingungen nur eine Bindung von 0,1 pmol cAMP bzw. von 0,34 pmol cGMP gemessen werden (Kurve nicht gezeigt).

Nachdem cGMP jedoch die AC mit einer  $EC_{50}$  von 9,6  $\mu\text{M}$  aktiviert (vgl. 4.3.1.2), müßte eine Bindung an die GAF-Domänen der Chimäre erfolgt sein. Dass im Bindungstest nur eine minimale Bindung nachgewiesen werden kann, mag zum einen an einem nicht geeigneten Testsystem liegen. In allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungstests wurden wenig reproduzierbare Ergebnisse erhalten. Bei allen untersuchten Konstrukten wurde nur geringste Bindung festgestellt. Dies mag weniger an den sehr alten verwendeten Filtern liegen als vielmehr an ungleichen Reaktionsbedingungen: Waren die Inkubations- und vor allem Spülzeiten nicht exakt gleich, erhielt man unterschiedliche Werte. Außerdem wurde eine sehr hohe und schwankende Bindung der Nukleotide an BSA festgestellt, was den Basalwert verfälschte. Der zweite Grund für eine minimale Bindung könnten die kleinen  $k_{on}$  und  $k_{off}$ -Werte (4.3.1.5) für PDE5 GAF-CyaB1 AC sein. Das gebundene cGMP würde in diesem Fall während des Waschvorgangs wieder ausgespült.

#### 4.3.1.7 Einfluß von PDE5-Hemmstoffen auf PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die Wirkung von drei für die Behandlung der erektilen Dysfunktion zugelassenen PDE5-Hemmern (Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil) auf PDE5 GAF-CyaB1 AC wurde getestet. Für diese Hemmstoffe wurde eine selektive Bindung an die katalytische Domäne der PDE5 nachgewiesen [109–111]. Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil wurden in DMSO gelöst und pro 100  $\mu$ l AC-Testansatz wurde je 1  $\mu$ l zugesetzt (Endkonzentrationen 500 nM, 5  $\mu$ M, Kontrolle mit DMSO).

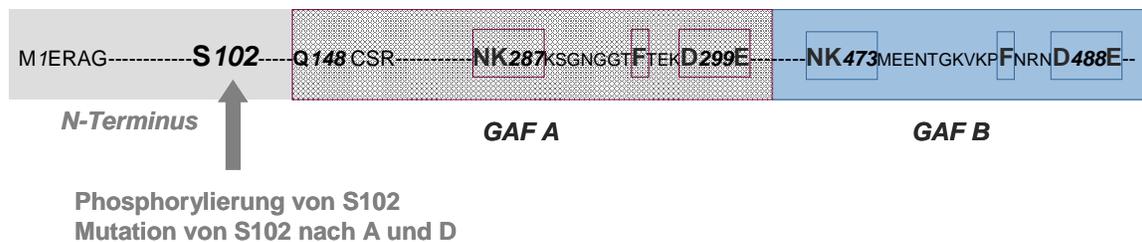
Weder durch DMSO noch durch einen der Hemmstoffe wurde die Aktivität der AC  $\pm$  cGMP beeinträchtigt (nicht gezeigt).

#### 4.3.1.8 Lagerbarkeit und Stabilität von PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die gereinigte und dialysierte PDE5 GAF-CyaB1 AC ließ sich mit 35% Glycerin für 4 bis 8 Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern, auch häufigeres, kurzes Auftauen war unschädlich. Bei längerer Lagerung stieg die Basalaktivität langsam an, der Aktivierbarkeitsfaktor durch cGMP und vor allem der maximale Aktivitätswert sanken jedoch. Die Chimäre zeigt somit eine viel bessere Stabilität und Lagerbarkeit als das PDE5 Holoenzym, das nach 1-2 Wochen Lagerung nicht mehr durch cGMP stimulierbar ist [24]. Der Anstieg der Basalaktivität deckt sich jedoch mit den in [24] beschriebenen Ergebnissen.

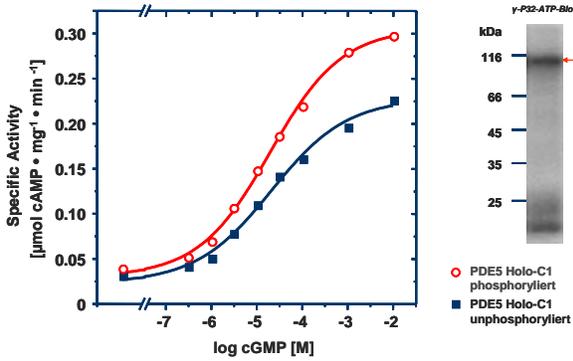
### 4.3.2 Einfluß der Phosphorylierung von S102

Nachdem über die Auswirkungen der S102-Phosphorylierung am PDE5 Holoenzym widersprüchliche Ergebnisse vorlagen (4.3), sollte der Effekt in PDE5 GAF-CyaB1 AC untersucht werden.

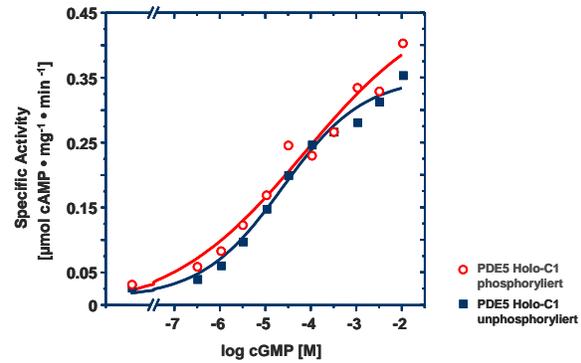


#### 4.3.2.1 Phosphorylierung von PDE5 GAF-CyaB1 AC

PDE5 GAF-CyaB1 AC wurde in Anlehnung an das Protokoll von Zoraghi et al. [34] phosphoryliert (s. 3.12). Anschließend wurde die Aktivität und Aktivierbarkeit der phosphorylierten PDE5 GAF-CyaB1 AC bestimmt. Zur Überprüfung der Stabilität des Enzyms bei  $30^{\circ}\text{C}$  über 2 h diente ein Ansatz ohne PKA. Bei wiederholten Messungen wurden unterschiedliche Kurven erhalten (Abb. 4.32 und 4.33).



**Abb. 4.32:** PDE5 GAF-CyaB1 AC, phosphoryliert und unphosphoryliert: Aktivierbarkeit mit cGMP, Test 1, rechts ist das Autoradiogramm gezeigt.



**Abb. 4.33:** PDE5 GAF-CyaB1 AC, phosphoryliert und unphosphoryliert: Aktivierbarkeit mit cGMP, Test 2.

Die  $EC_{50}$ -Werte für cGMP lagen bei  $16,4 \pm 2,8 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) für die 2 h bei  $30^\circ\text{C}$  gelagerte Chimäre und bei  $27,5 \pm 11,4 \mu\text{M}$  ( $n=4$ ) für das phosphorylierte Protein. Der große SEM für phosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC rührt von den Partial-cGMP-Aktivierungs-Kurven (Abb. 4.33). Für diese konnte  $V_{max}$  nur durch Extrapolation bestimmt werden. Der erhaltene Wert (Kalkulation durch *Microcal Origin*) lag meistens sehr hoch, was sich in großen  $EC_{50}$ -Werten auswirkte. Die mit unphosphoryliertem Protein erhaltenen Kurven zeigten eine bessere Sättigung und damit auch kleinere  $EC_{50}$ -Werte. Der Unterschied zwischen den  $EC_{50}$ -Werten war nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ). Wurden jedoch die spezifischen Aktivitäten von phosphorylierter und unphosphorylierter PDE5 GAF-CyaB1 AC miteinander verglichen, so lagen sie für das phosphorylierte Konstrukt bei allen 5 durchgeführten Tests signifikant über den Werten des unphosphorylierten Proteins ( $p \leq 0,03$ ), nur die Basalaktivität unterschied sich nicht ( $p = 0,131$ ). Die Signifikanz war bei kleinen cGMP-Konzentrationen größer (bis  $10 \mu\text{M}$  cGMP  $p \leq 0,001$ ). Dies deckt sich mit den in [33] beschriebenen Beobachtungen, dass der Aktivierungsunterschied durch cGMP im phosphorylierten und unphosphorylierten PDE5 Holoenzym bei niedrigen cGMP-Konzentrationen stärker ausgeprägt ist.

Die Aktivierbarkeitsfaktoren waren  $10,8 \pm 1,6$  ( $n=5$ ) für das unphosphorylierte Kontrollprotein und  $11,3 \pm 2,2 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) für die phosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC.

Der geringe Effekt der Phosphorylierung warf die Frage auf, ob das Protein überhaupt phosphoryliert wurde. Daher wurde ein Autoradiogramm angefertigt (3.13). Schon nach 22 h war bei  $0,6 \mu\text{g}$  aufgetragenem Protein eine Bande erkennbar, die nach 4 Tagen ein deutliches Signal bei der erwarteten Größe von 113 kDa lieferte (Abb. 4.32). Ein Ansatz ohne PKA, dem die gleiche Menge  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  zugesetzt wurde, lieferte nach 7 Tagen kein Signal. Der PKA-freie Vergleichsansatz zeigte, dass nicht umgesetztes  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch die Gelfiltration über eine G-50-Säule und die SDS-PAGE-Gelelektrophorese komplett entfernt wird und keine falsch positiven Er-

gebnisse liefert.

Das Autoradiogramm zeigt nur die Phosphorylierung der Chimäre an, es liefert keine Hinweise über die Vollständigkeit, die Anzahl oder die Positionen der Phosphorylierung im Enzym.

Die Auswirkungen der Phosphorylierung auf die CyaB1 oder die CyaB1 katalytische Domäne wurden bisher nicht untersucht. Die Sequenzanalyse der CyaB1 ergab zwei mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A im C-Terminus nach der katalytischen Domäne.

Um eine quantitative Phosphorylierung vorzutäuschen, bzw. um eine Phosphorylierung an S102 auszuschließen, wurden die Mutanten PDE5 S102D-CyaB1 AC und PDE5-S102A-CyaB1 AC kloniert und biochemisch untersucht.

#### 4.3.2.2 PDE5 S102D-CyaB1 AC

PDE5 S102D-CyaB1 AC wurde kloniert (3.14.3.10) und bei 16°C 7 h exprimiert. Induziert wurde mit 75  $\mu\text{M}$  IPTG, da sich das Konstrukt im Expressionsvektor pET16b mit MCSpQE30 befand. Das lösliche Protein lies sich in der üblichen Ausbeute mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA reinigen. Der anschließende AC-Test des unphosphorylierten S102D-Konstruktes ergab einen zur PDE5 GAF-CyaB1 AC signifikant erniedrigten  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $1,9 \pm 0,33 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ,  $p=0,012$ ), der Aktivierbarkeitsfaktor durch cGMP lag bei  $7,2 \pm 0,36$  ( $n=15$ ) (Abb. 4.34).

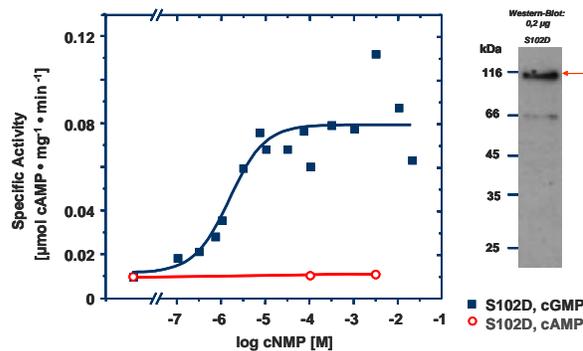


Abb. 4.34: PDE5 S102D-CyaB1 AC: Aktivierbarkeit mit cGMP und cAMP.

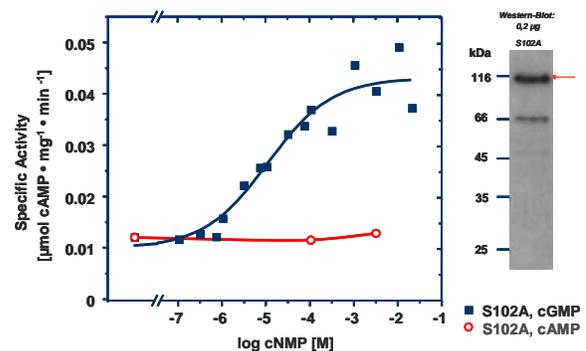


Abb. 4.35: PDE5 S102A-CyaB1 AC: Aktivierbarkeit mit cGMP und cAMP.

Die spezifische Aktivität war mit 10 bis 200  $\text{nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  geringer als bei PDE5 GAF-CyaB1 AC. Im Westernblot (Abb. 4.34) wurden neben der gewünschten Bande bei 113 kDa ein C-terminales Abbruchprodukt bei ca. 66 kDa erhalten, das aber keine Aktivität haben dürfte, denn die katalytische Domäne fehlt hier.

Der Austausch von Serin 102 zum Aspartat täuscht durch seine negative Carboxylgruppe eine Phosphorylierung im Enzym vor und sollte sich damit verhalten wie an Position S102 vollständig phosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC. Der kleinere  $\text{EC}_{50}$ -Wert für S102D zeigt, dass eine Phosphorylierung der PDE5-GAF-Domänen ei-

ne erhöhte Affinität dieser zu cGMP bewirkt, was auch für das PDE5 Holoenzym bestätigt ist [33].

#### 4.3.2.3 PDE5 S102A-CyaB1 AC

Die Klonierung, Reinigung und Expression von PDE5 S102A-CyaB1 AC erfolgte analog zu PDE5 S102D-CyaB1 AC (4.3.2.2).

Der Austausch von Serin 102 zum Alanin erzeugt eine nicht uphosphorylierbare Position 102. Damit sind mögliche Effekte der Phosphorylierung auf den CyaB1-Teil der Chimäre untersuchbar.

Zunächst wurde PDE5 S102A-CyaB1 AC auf Aktivierbarkeit durch cGMP und cAMP hin untersucht. Der  $EC_{50}$ -Wert für cGMP lag bei  $8,0 \pm 1,5 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) (Abb. 4.35), der Aktivierbarkeitsfaktor betrug  $5,1 \pm 0,36$  ( $n=6$ ) und war damit signifikant niedriger ( $p \leq 0,001$ ) als der von PDE5 GAF-CyaB1 AC.

Die spezifische Aktivität von PDE5 S102A-CyaB1 AC lag trotz vergleichbarer Reinheit auf dem SDS-Gel mit 10 bis  $80 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  deutlich unter der von S102D. Vor allem die Lagerbarkeit zeigte deutliche Unterschiede. PDE5 S102A-CyaB1 AC zeigte schon nach wenigen Tagen Lagerung einen deutlichen Rückgang der Aktivierbarkeit, bei S102D war dieser Effekt stärker als bei PDE5 GAF-CyaB1 AC, aber weniger ausgeprägt als bei S102A. Einen Vergleich von S102D mit S102A zeigt Abb. 4.36.

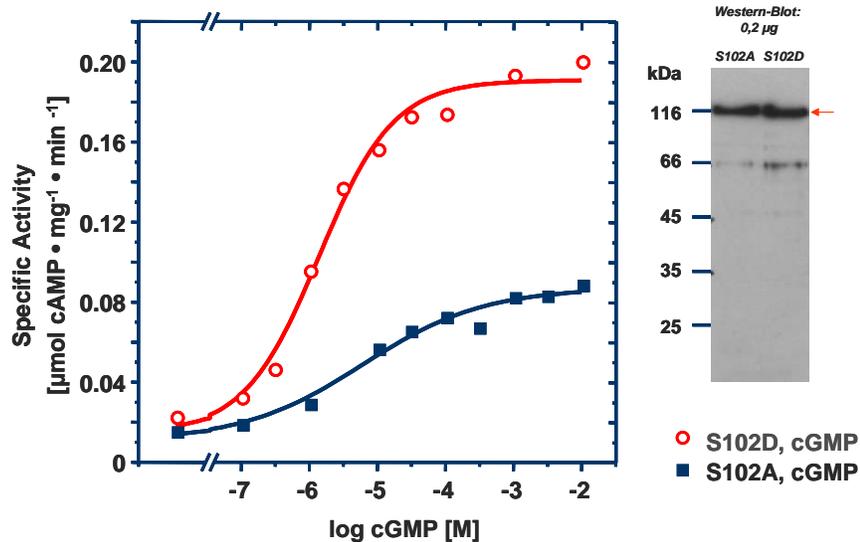


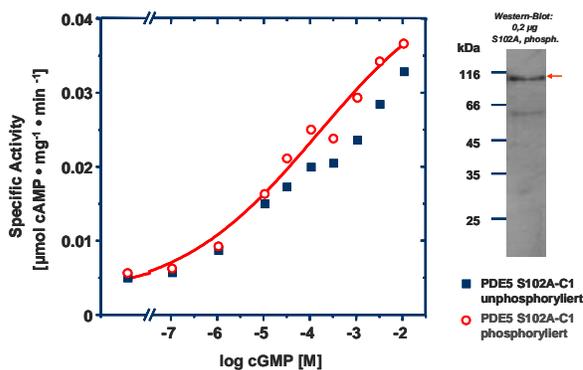
Abb. 4.36: PDE5 S102A und S102D-CyaB1 AC: Aktivierbarkeit mit cGMP.

Der Austausch S102 gegen Alanin vermindert die Stabilität und Aktivierbarkeit durch cGMP, obwohl S102 im N-Terminus vor den eigentlichen GAF-Domänen liegt.

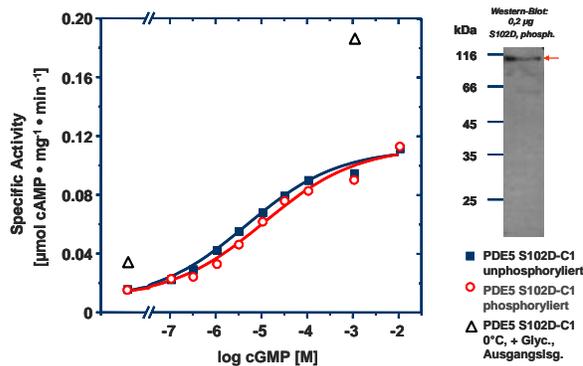
#### 4.3.2.4 Phosphorylierung von PDE5 S102A und S102D-CyaB1 AC

Nachdem in PDE5 S102A und S102D-CyaB1 AC keine Phosphorylierung an Position 102 möglich ist, sollte durch Phosphorylierung dieser Konstrukte untersucht werden, ob eine solche in der katalytischen Domäne erfolgt und wenn ja, welche Auswirkungen sie auf die AC-Aktivität hat.

Es wurde mit PKA phosphoryliert und getestet (Abb. 4.37 und Abb. 4.38).



**Abb. 4.37:** PDE5 S102A-CyaB1 AC, phosphoryliert und unphosphoryliert (2 h, 30°C): Aktivierbarkeit mit cGMP [für S102A, unphosphoryliert konnte keine sigmoidale Kurve extrapoliert werden].



**Abb. 4.38:** PDE5 S102D-CyaB1 AC, phosphoryliert und unphosphoryliert (2 h, 30°C): Aktivierbarkeit mit cGMP.

Für ein Autoradiogramm wurden radioaktiv phosphoryliertes S102D und S102A und unphosphorylierte Proteine aufgetragen. Auch nach 4 Wochen wurde keinerlei Signal detektiert. Dies läßt den Rückschluß zu, dass der CyaB1-Teil unter den verwendeten Phosphorylierungsbedingungen nicht phosphoryliert wird. Im Westernblot sind die phosphorylierten Proteine mit Histag-Antikörpern detektierbar (Abb. 4.37 und 4.38).

PDE5 S102A-CyaB1 AC (Abb. 4.37) war bei 30°C über 2 h teilweise instabil. Die spezifische Aktivität sank um 50–70%. Der Aktivierbarkeitsfaktor betrug nur noch  $4,0 \pm 1,2$  ( $n=3$ ), die scheinbare  $EC_{50}$  stieg aufgrund nicht mehr erreichter Sättigung der cGMP-Aktivierbarkeitskurve auf  $114 \pm 29,4 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ). Der Zusatz von BSA stabilisierte das Enzym nicht.

PKA stabilisierte S102A entweder direkt (im Vergleich zur unphosphorylierten Lösung), oder eine Phosphorylierung im aus der CyaB1 stammenden Teil des Enzyms bewirkte eine Stabilisierung. Der Aktivierbarkeitsfaktor sank hier nicht wie in der Kontrolle. Er betrug  $5,6 \pm 1,2$  ( $n=3$ ), der  $EC_{50}$ -Wert lag bei  $66,9 \pm 41,1 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ; Abb. 4.37).

Bei PDE5 S102D-CyaB1 AC (Abb. 4.38) sank die spezifische Aktivität nach 2 h bei 30°C im Vergleich zu auf Eis gelagertem Enzym um 50%. Hier wurden für das phosphorylierte und unphosphorylierte Konstrukt gleiche Kurvenverläufe erhalten (Abb. 4.38). Der Unterschied war an keinem Punkt signifikant ( $p \geq 0,4$ ). Durch die Sättigung

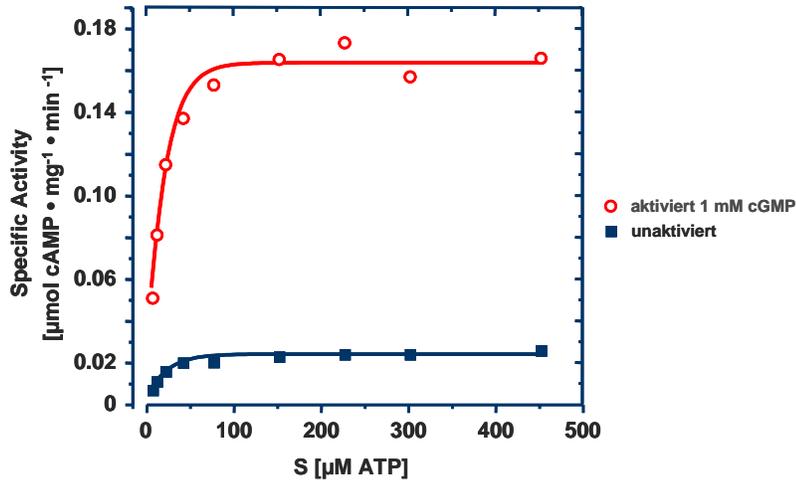


Abb. 4.39: Michaelis-Menten-Substratkinetik von *PDE5 S102D-CyaB1 AC*,  $\pm$  1 mM cGMP.

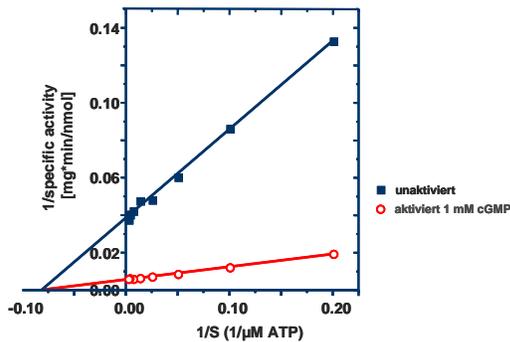


Abb. 4.40: Lineweaver-Burk zur Bestimmung von  $K_M$ , *PDE5 S102D-CyaB1 AC*,  $\pm$  1 mM cGMP, Datenpunkte aus Abb. 4.39.

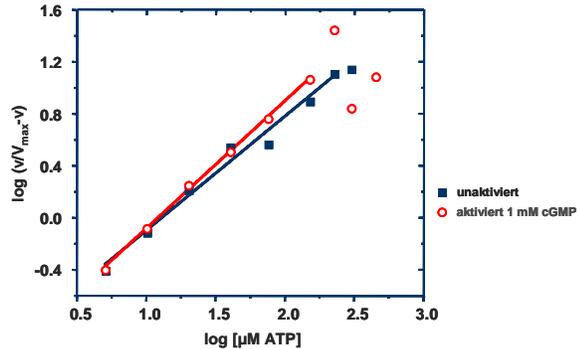


Abb. 4.41: Hill-Plot, *PDE5 S102D-CyaB1 AC*,  $\pm$  1 mM cGMP.

der cGMP-Aktivierung konnten genauere  $EC_{50}$ -Werte ( $2,9 \pm 1,8 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ) für das unphosphorylierte und  $7,2 \pm 4,2 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ) für das phosphorylierte Konstrukt) erhalten werden. Der Unterschied war nicht signifikant ( $p=0,48$ ). Die Aktivierbarkeitsfaktoren betragen entsprechend  $7,5 \pm 0,6$  ( $n=2$ ) und  $8,2 \pm 1,0$  ( $n=2$ ).

Für S102D konnte hier kein Unterschied zwischen Phosphorylierung und Nicht-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Bei S102A läßt die scheinbar größere Stabilität bei Zusatz von PKA keine Aussage zu. Eine Phosphorylierung im CyaB1-Teil findet nicht statt.

#### 4.3.2.5 Kinetische Messungen mit PDE5 S102D-CyaB1 AC

Um einen Einfluß der Mutation S102D auf die kinetischen Eigenschaften auszuschließen, wurden die  $K_M$ -Werte  $\pm 1$  mM cGMP aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm erhalten (Abb. 4.40).  $K_M$  betrug in beiden Fällen  $12 \mu\text{M}$  und war damit so groß wie bei PDE5 GAF-CyaB1 AC (4.3.1.4).  $V_{max}$  lag für das unaktivierte Konstrukt bei  $26 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ , für das aktivierte bei  $179 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ . Die Hill-Koeffizienten betrugen  $0,98$  ( $+ 1$  mM cGMP) bzw.  $0,88$  (unaktiviert). Damit veränderten sich die kinetischen Eigenschaften der katalytischen Domäne durch S102D nicht und die unter Standardtestbedingungen (10 min, 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $75 \mu\text{M}$  ATP, pH 7.5 Tris/HCl) erhaltenen Ergebnisse sind vergleichbar.

#### 4.3.2.6 Einfluß der Phosphorylierung auf $k_{on}$ und $k_{off}$ bei PDE5 GAF-CyaB1 AC

In [37] und [38] wurde die zelluläre Funktion einer Phosphorylierung des PDE5 Holoenzym an S102 untersucht. Es wurde festgestellt, dass eine Phosphorylierung zu einem länger anhaltenden Anstieg der PDE-Aktivität führt. Scheinbar erhöht die Phosphorylierung die Affinität der GAF-Domänen zu cGMP, oder sie verhindert das schnelle Abdiffundieren gebundenen cGMPs von den GAF-Domänen, so dass noch bei sehr geringen cGMP-Konzentrationen in der Lösung eine hohe PDE-Aktivität erhalten bleibt. Ob diese länger anhaltende Stimulation nach Phosphorylierung auch in PDE5 GAF-CyaB1 AC zellfrei reproduzierbar ist, wurde im Folgenden überprüft.

Es wurden wie für das unphosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC Enzym die  $k_{on}$  und  $k_{off}$ -Werte bestimmt. Sie zeigen die Geschwindigkeit der Aktivierung bzw. der Deaktivierung und sind damit ein Maß für die Affinität der GAF-Domänen in phosphorylierter PDE5 GAF-CyaB1 AC zu cGMP.

Die Versuchsdurchführung war wie unter 4.3.1.5 beschrieben (Ergebnisse in Abb. 4.42, 4.43, 4.44 und 4.45). Durch die Phosphorylierung wurde PDE5 GAF-CyaB1 AC verdünnt. Im AC-Test mußten deshalb für die gleiche Proteinmenge größere Volumina der mit  $100 \mu\text{M}$  cGMP aktivierten Konstrukte eingesetzt werden, d.h. es konnte nicht auf  $119 \text{ nM}$  cGMP verdünnt werden wie beim unphosphorylierten Enzym (4.3.1.5), sondern nur auf  $400 \text{ nM}$  cGMP. Aber auch hier ist noch ein deutlicher Unterschied der spezifischen Aktivitäten erkennbar (Abb. 4.44 und 4.45).

$K_{on}$  ist beim phosphorylierten und unphosphorylierten Konstrukt sehr klein, der Kurvenverlauf entspricht jeweils der parallel bestimmten Zeitabhängigkeit. Die  $k_{off}$ -Bestimmung zeigt schon 5 min nach Verdünnung die gleiche spezifische Aktivität, die durch direkten Zusatz von  $400 \text{ nM}$  cGMP erhalten wird.

Der einzige Unterschied, der zwischen dem phosphorylierten und 2 h bei  $30^\circ\text{C}$  gelagerten Protein gefunden wurde, war, dass im phosphorylierten Fall die durch Zusatz von  $400 \text{ nM}$  cGMP erreichbare Aktivität über der Aktivität des unphosphorylierten Proteins bei Stimulation mit  $400 \text{ nM}$  cGMP lag. Dies deckt sich mit den unter 4.3.2.1 erhaltenen Ergebnissen, dass die Phosphorylierung eine leicht erhöhte Affinität der GAF-Domänen zu cGMP (vor allem in geringen Konzentrationen) und damit eine

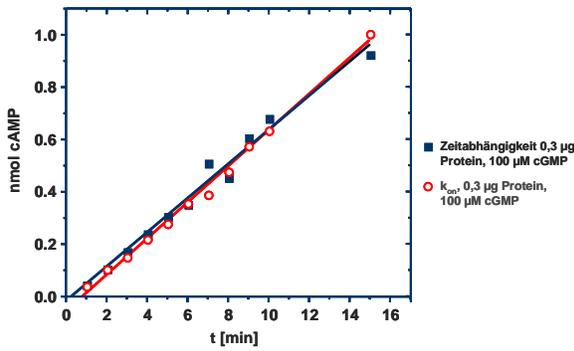


Abb. 4.42: phosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC (2 h, 30°C): Zeitabhängigkeit und  $k_{on}$ , aktiviert mit 100  $\mu\text{M}$  cGMP, 30 s bei 37°C vorgewärmt.

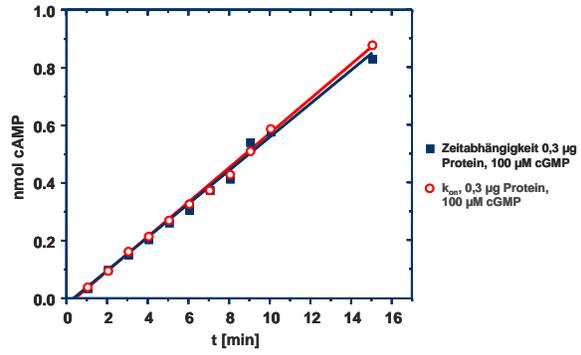


Abb. 4.43: unphosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC (2 h, 30°C): Zeitabhängigkeit und  $k_{on}$ , aktiviert mit 100  $\mu\text{M}$  cGMP, 30 s bei 37°C vorgewärmt.

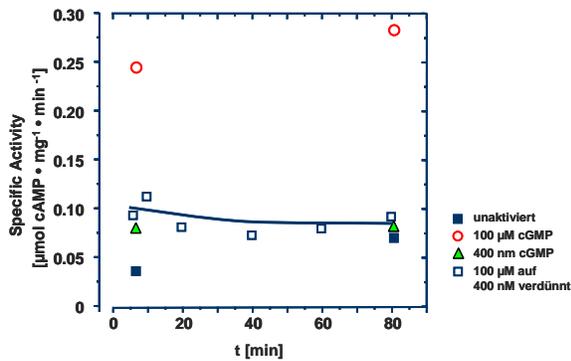


Abb. 4.44: phosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC (2 h, 30°C): Abdissoziation von cGMP:  $k_{off}$ , aktiviert mit 100  $\mu\text{M}$  cGMP, verdünnt auf 400 nM cGMP.

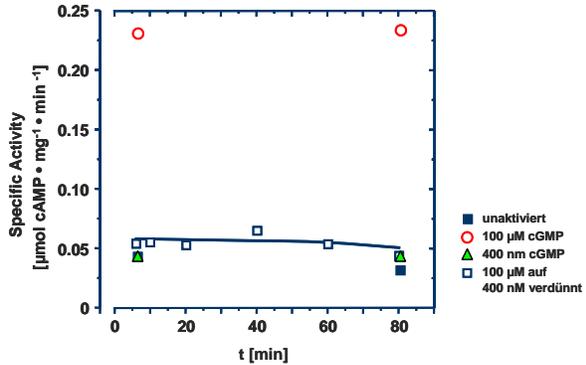


Abb. 4.45: unphosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC (2 h, 30°C): Abdissoziation von cGMP:  $k_{off}$ , aktiviert mit 100  $\mu\text{M}$  cGMP, verdünnt auf 400 nM cGMP.

stärkere Stimulation bei niedrigeren cGMP-Spiegeln zur Folge hat.

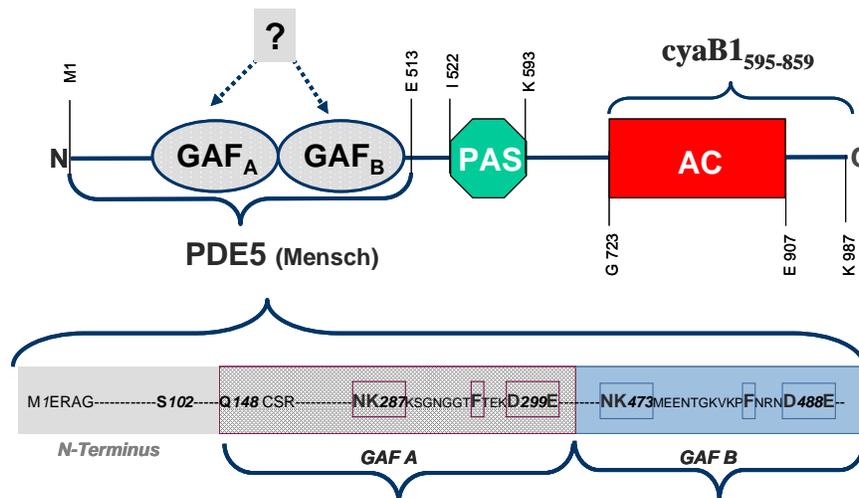
Somit bewirkte die Phosphorylierung des PDE5 GAF-CyaB1 AC-Konstruktes kein Fortbestehen einer hohen Aktivität nach Verdünnen und damit auch kein verlangsamtes Abdiffundieren von cGMP aus der Bindungstasche. Die für das PDE5 Holoenzym gefundenen Ergebnisse in vivo [37,38] und in vitro [35] sind damit nicht auf die Chimäre aus PDE5-GAF-Domänen und CyaB1 katalytische Domäne übertragbar.

### 4.3.3 Rolle des NKFDE-Motivs in den PDE5-GAF-Domänen

Die PDE5-GAF-Domänen besitzen sowohl in GAF A als auch in GAF B das für cNMP-bindende Phosphodiesterasen typische NKFDE-Motiv (Alignment 4.17).

Die bisherigen Untersuchungen zur Rolle des NKFDE-Motivs lieferten unterschiedliche Ergebnisse über die Funktion der GAF-Domänen in PDE5.

In [27] wird bei der Mutation D289A (Rinder-PDE5, entspricht D299 in hPDE5) eine um mehr als 10-fach erniedrigte Affinität zu cGMP nachgewiesen, während die Mutation D478A in GAF B eine erhöhte Affinität zu cGMP bewirkte. Die für beide Mutanten bestimmten  $k_{off}$ -Werte ließen den Schluß zu, dass es sich bei GAF A um eine Bindungsstelle mit hoher Affinität und langsamer Dissoziation und bei GAF B um eine Bindungsstelle mit geringer Affinität und schneller Dissoziation handelt (s.a. [40]). Dabei wurde allerdings nicht der Einfluß der Nucleotidbindung auf die Aktivität der PDE untersucht. Spätere Mutationen von N, K und D zu A [30] im NKFDE-Motiv der GAF A der Rinder-PDE5 zeigten eine deutlich verringerte cGMP-Bindung. Allerdings wurde bei diesen Mutanten kein Unterschied der cGMP-Hydrolyse festgestellt.



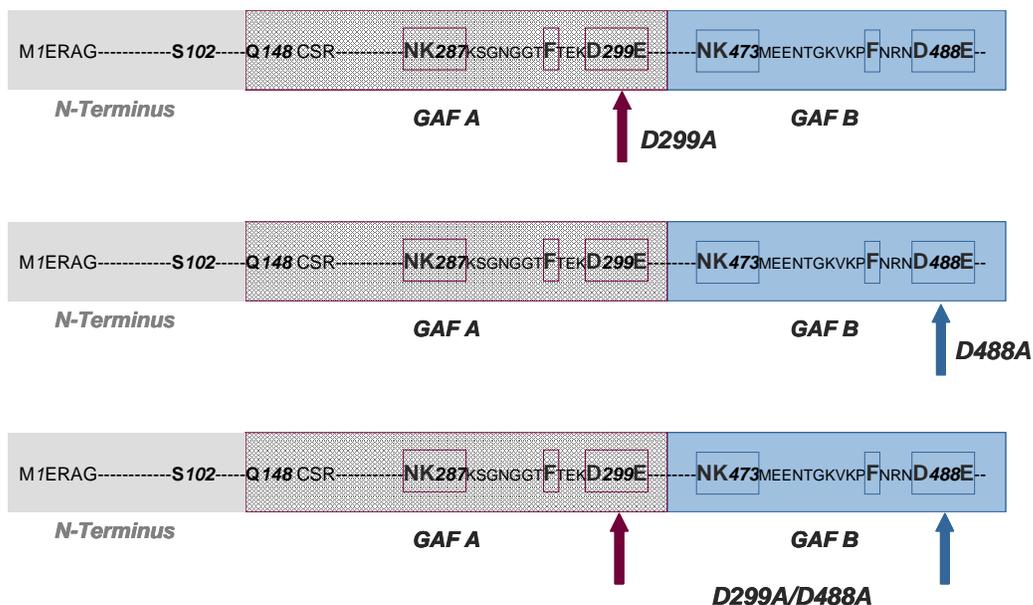
Jüngere Untersuchungen weisen jedoch eine Aktivierung der PDE durch die Bindung von cGMP an die GAF-Domänen nach [24, 34, 108]. Die Blockade der GAF A mit einem spezifischen Antikörper verhinderte neben der Bindung von cGMP auch die Aktivierung der PDE5 [24]. Dies identifizierte die GAF A in PDE5 als Bindungsstelle für cGMP und als den für die allosterische Aktivierung verantwortlichen Bereich. Es konnte kein Rückschluß auf die für die cGMP-Bindung verantwortlichen AS gezogen werden.

Vergleiche mit der gelösten PDE2A-GAF-Struktur [1], ermöglichten die Identifizierung von F205 [31] als essentielle Aminosäure für die cGMP-Bindung an PDE5 GAF A. Auch wurde keine Bindung von cGMP an GAF B gemessen. Eine weitere Untersuchung [34] bescheinigt der GAF B-Domäne nicht nur keine Bindung von cGMP sondern, sogar eine hemmende Wirkung auf die Bindung von cGMP an GAF A.

Ich untersuchte hier die Auswirkung der K/A- und D/A-Mutationen in beiden NKFDE-Motiven der PDE5 GAF-CyaB1 AC.

#### 4.3.3.1 D299A und/oder D488A in PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die drei Konstrukte PDE5 D299A-CyaB1 AC, PDE5 D488A-CyaB1 AC und die Doppelmutante PDE5 D299A/D488A-CyaB1 AC wurden wie unter 3.14.3.4, 3.14.3.2 und 3.14.3.3 beschrieben, kloniert.



Die Proteine waren unter Standardbedingungen exprimier- und reinigbar. Im Western-Blot zeigten sich bei je  $0,2\mu\text{g}$  aufgetragenem Gesamtprotein wenige C-terminale Abbruchprodukte, d.h. die katalytische Domäne ist wahrscheinlich verkürzt und nicht mehr funktionsfähig, da der antigene RGS-His<sub>6</sub>-tag N-terminal plaziert ist (Abb. 4.46, 4.47 und 4.48).

Keine der Mutanten war durch cAMP stimulierbar, jedoch waren trotz Mutation von Asp zu Ala alle durch cGMP stimulierbar, auch wenn die EC<sub>50</sub>-Werte, vor allem bei D299A, größer waren (Abb. 4.46, 4.47 und 4.48). Eine Übersicht über die EC<sub>50</sub>-Werte und Aktivierbarkeitsfaktoren gibt Tabelle 4.2.

Am meisten wirkte sich die Mutation D299A aus. Der EC<sub>50</sub>-Wert war ca.  $10\times$  höher als im Ausgangskonstrukt. Dies entspricht dem in [27] gefundenen Wert, außerdem war der Aktivierbarkeitsfaktor halbiert. Die Mutation von D488 in GAF B schien, isoliert betrachtet, keinen Einfluß auf die Aktivierung durch cGMP zu haben. Vergleicht man jedoch die Doppelmutante D299A/D488A mit D299A, bewirkt D488A eine Erhöhung der Affinität im Vergleich zur D299A-Mutation. Dies könnte auf den in [34] beschriebenen Hemmeffekt der GAF B auf eine cGMP-Bindung an GAF A zurückzuführen sein. Eine vollständige Blockade der cGMP-Bindung an PDE5 D299A/D488A-CyaB1 AC,

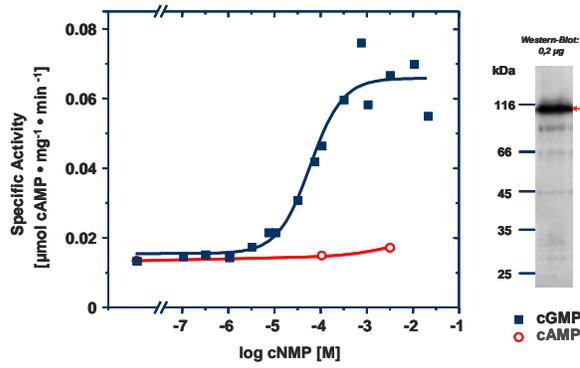


Abb. 4.46: Aktivierbarkeit von PDE5 D299A-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP.

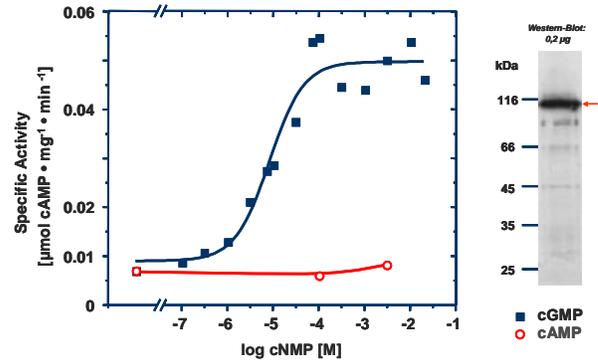


Abb. 4.47: Aktivierbarkeit von PDE5 D488A-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP.

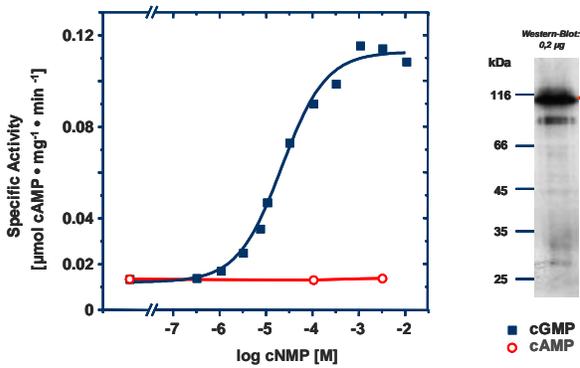


Abb. 4.48: Aktivierbarkeit von PDE5 D299A/D488A-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP.

wie sie für diese Mutationen im PDE5 Holoenzym beschrieben ist [28], wurde nicht gefunden.

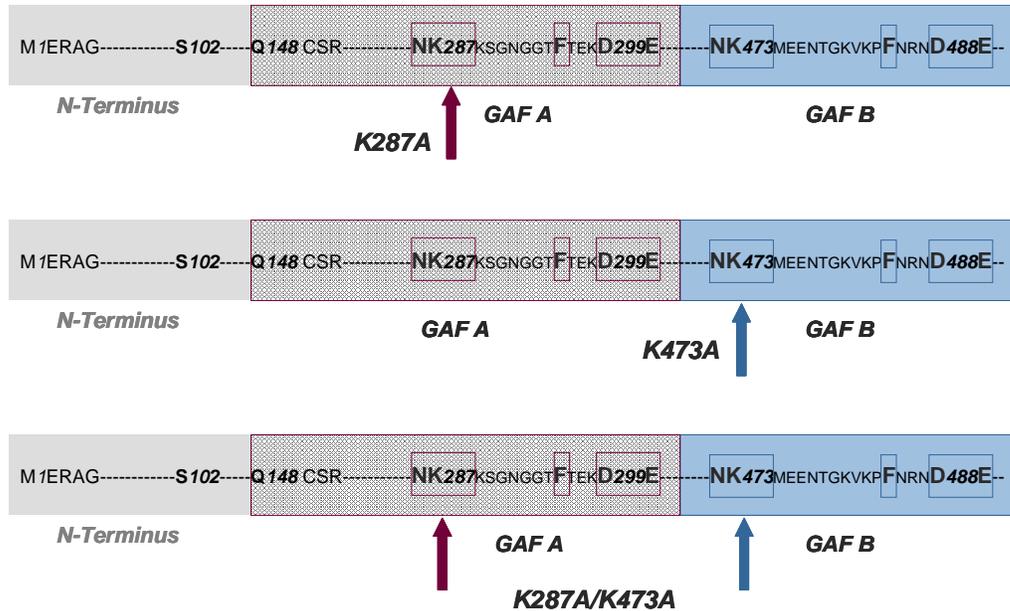
Die D/A-Mutation bewirkte damit weder in GAF A noch in GAF B noch in Kombination ein Abschalten der Aktivierung durch cGMP.

Konstrukt	EC <sub>50</sub> cGMP [ $\mu$ M]	Aktivierbarkeitsfaktor cGMP [ $\times$ ]
PDE5 D299A-CyaB1 AC	103,1 $\pm$ 29,8 (n=3)	5,5 $\pm$ 0,5 (n=4)
PDE5 D488A-CyaB1 AC	18,2 $\pm$ 8,5 (n=3)	11,2 $\pm$ 1,7 (n=4)
PDE5 D299A/D488A-CyaB1 AC	36,5 $\pm$ 7,8 (n=5)	10,7 $\pm$ 0,9 (n=7)

Tab. 4.2: EC<sub>50</sub>-Werte für cGMP und die Aktivierbarkeitsfaktoren in den Konstrukten PDE5 D299A-CyaB1 AC, PDE5 D488A-CyaB1 AC und PDE5 D299A/D488A-CyaB1 AC.

## 4.3.3.2 K287A und/oder K473A in PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die Konstrukte PDE5 K287A-CyaB1 AC, PDE5 K473A-CyaB1 AC und die Doppelmutante PDE5 K287A/K473A-CyaB1 AC wurden wie unter 3.14.3.6, 3.14.3.5 und 3.14.3.7 beschrieben, kloniert.



Die Konstrukte waren unter Standardbedingungen exprimier- und reinigbar. Im Western-Blot zeigten sich bei je  $0,2\mu\text{g}$  aufgetragendem Gesamtprotein wenig Abbruchprodukte. Die spezifischen Aktivitäten waren ähnlich, nur die K473A-Mutante zeigte eine 3 bis 4-fach höhere Maximalaktivität und lag damit fast im Bereich wie PDE5 GAF-CyaB1 AC. Es wurde auf Stimulierbarkeit durch cGMP und cAMP geprüft (Abb. 4.49, 4.50 und 4.51).

Keine der Mutanten war durch cAMP stimulierbar und alle waren trotz der K/A-Mutationen durch cGMP stimulierbar. Die Auswirkungen auf die  $EC_{50}$ -Werte waren deutlicher als bei den D/A-Mutanten (Tab. 4.3).

Konstrukt	$EC_{50}$ cGMP [ $\mu\text{M}$ ]	Aktivierbarkeitsfaktor cGMP [ $\times$ ]
PDE5 K287A-CyaB1 AC	$235,6 \pm 78,6$ (n=5)	$7,4 \pm 1,0$ (n=5)
PDE5 K473A-CyaB1 AC	$4,0 \pm 1,7$ (n=3)	$28,9 \pm 1,5$ (n=3)
PDE5 K287A/K473A-CyaB1 AC	$135,0 \pm 20,8$ (n=3)	$13,8 \pm 2,7$ (n=3)

**Tab. 4.3:**  $EC_{50}$ -Werte für cGMP und die Aktivierbarkeitsfaktoren in den Konstrukten PDE5 K287A-CyaB1 AC, PDE5 K473A-CyaB1 AC und PDE5 K287A/K473A-CyaB1 AC.

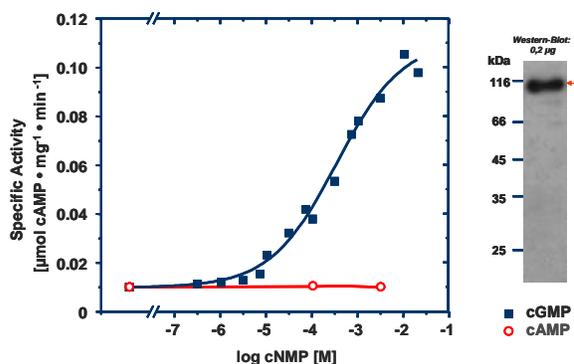


Abb. 4.49: Aktivierbarkeit von PDE5 K287A-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP.

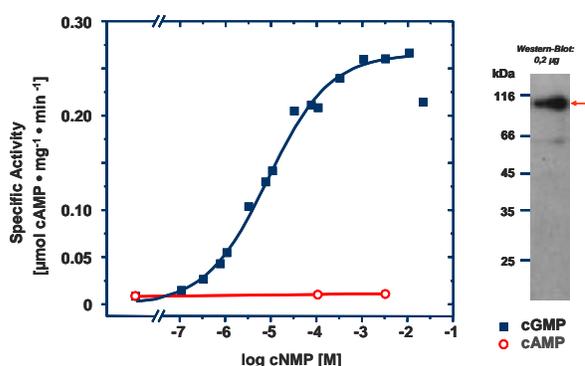


Abb. 4.50: Aktivierbarkeit von PDE5 K473A-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP.

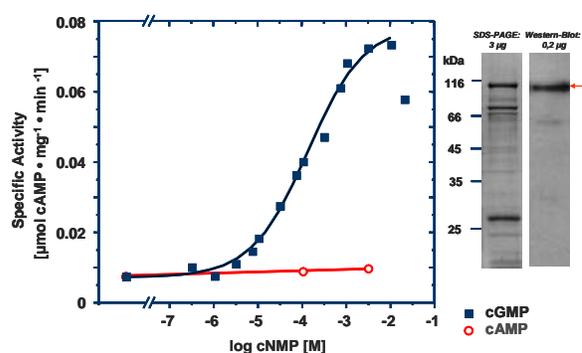


Abb. 4.51: Aktivierbarkeit von PDE5 K287A/K473A-CyaB1 AC durch cAMP und cGMP.

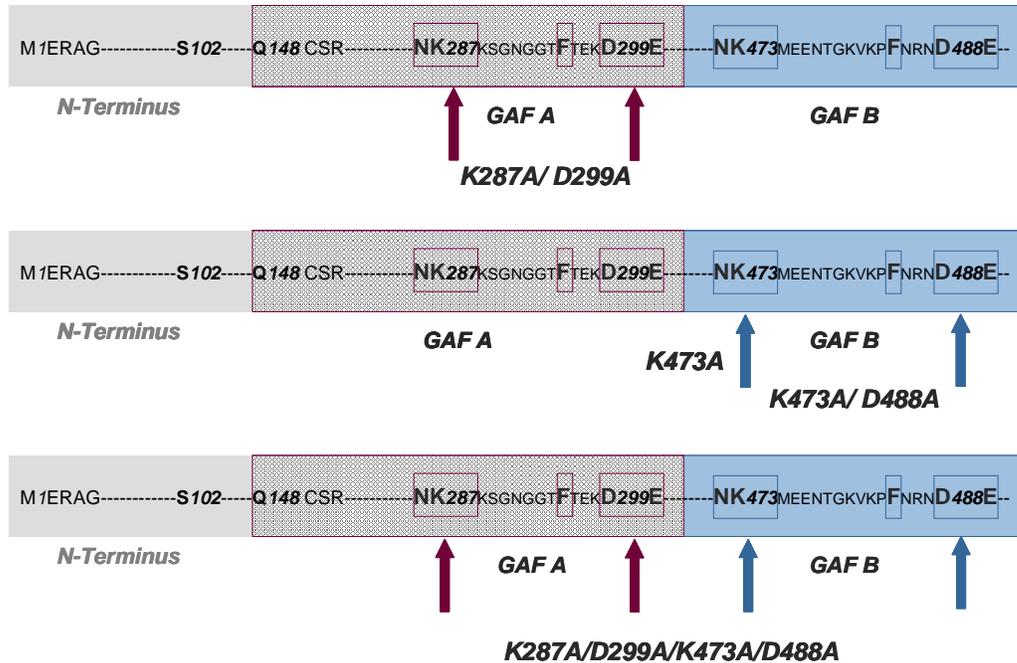
Der Einfluß der Mutation K287A auf die cGMP-Bindung war stärker als der von D299A. Der  $EC_{50}$ -Wert für K287A lag mit  $236 \mu\text{M}$  fast 25-fach über dem von PDE5 GAF-CyaB1 AC. Die Mutation K287A schien damit die Bindung von cGMP an GAF A stärker zu blockieren als D299A. K473A in GAF B führte sogar zu einer Erniedrigung der  $EC_{50}$  im Vergleich zu PDE5 GAF-CyaB1 AC. Das Überraschendste an dieser Mutante war allerdings neben der hohen Maximalaktivität, der mit 29-fach sehr hohe Aktivierbarkeitsfaktor. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die GAF B-Domäne einen hemmenden Effekt auf die cGMP-Bindung an GAF A hat. K287A/K473A bildet funktionell eine Zwischenstufe zwischen den Einzelmutationen wie auch D299A/D488A (4.3.3.1).

Auch durch die K/A-Mutationen konnte kein vollständiges Abschalten der Aktivierung durch cGMP erreicht werden, der gefundene Effekt ist aber deutlicher als für die D/A-Mutationen (4.3.3.1).

#### 4.3.3.3 K287A/D299A und/oder K473A/D488A in PDE5 GAF-CyaB1 AC

Schließlich wurden jeweils Lysin und Aspartat in GAF A, GAF B oder in beiden zu Alanin mutiert. Damit sollte die mögliche Salzbrücke, wie sie für die CyaB2-GAF-

Domänen nachgewiesen wurde [105,107], ausgeschaltet werden. Die Konstrukte PDE5 K287A/D299A-CyaB1 AC, PDE5 K473A/D488A-CyaB1 AC und die Vierfachmutante PDE5 K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC wurden wie unter 3.14.3.11, 3.14.3.12 und 3.14.3.13 beschrieben, kloniert.



Expressiert und gereinigt wurde nach Standardprotokoll. Im Western-Blot zeigten sich bei je 70 ng Protein die für PDE5 GAF-CyaB1 AC-Konstrukte quantitativ geringen, typischen Abbruchbanden (Abb. 4.52, 4.53 und 4.54 im Vergleich zu Abb. 4.46, 4.47 und 4.48). Die spezifischen Aktivitäten lagen mit Werten zwischen 80 und 130  $\text{nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  im Bereich voriger Mutanten (mit Ausnahme von K473A (Abb. 4.50)). Es wurde auf Stimulierbarkeit durch cGMP (und cAMP) geprüft (Abb. 4.52, 4.53 und 4.54).

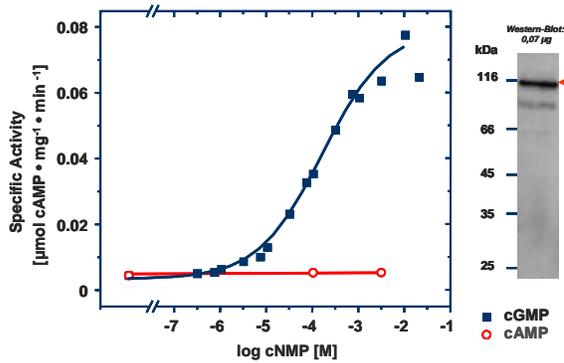
Keine der Mutanten war durch cAMP stimulierbar. Erneut waren alle K/A-D/A-Mutanten durch cGMP stimulierbar. Eine Übersicht über die  $\text{EC}_{50}$ -Werte und Aktivierbarkeitsfaktoren gibt Tabelle 4.4.

Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für K287A/D299A lag 13-fach über dem von PDE5 GAF-CyaB1 AC. Warum eine Mutation beider AS eine stärkere Bindung von cGMP als in K287A hervorruft, bleibt unklar, möglicherweise wird die Bindungstasche in diesem Fall weniger gestört. Die Mutation von K473A und D488A in GAF B lieferte das nach Untersuchung der K473A und D488A-Einzelmutanten erwartete Ergebnis. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert lag im gleichen Bereich wie bei PDE5 GAF-CyaB1 AC, aber durch die weitere Zerstörung des NKFD-E-Motivs scheint der hemmende Effekt der GAF B auf die GAF A weiter reduziert zu werden. Der hohe Aktivierbarkeitsfaktor von 42,2 scheint dies zu bestätigen. K287A/D299A/K473A/D488A bildet funktionell wie auch D299A/D488A und

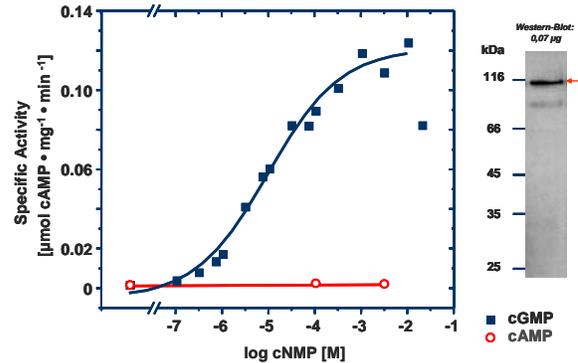
K287A/K473A (4.3.3.1 und 4.3.3.2) eine Zwischenstufe zwischen den Einzelmutatio-  
nen.

Konstrukt	EC <sub>50</sub> cGMP [ $\mu$ M]	Aktivierbarkeitsfaktor cGMP [ $\times$ ]
PDE5 K287A/D299A- CyaB1 AC	127,2 $\pm$ 40,2 (n=2)	15,2 $\pm$ 1,6 (n=2)
PDE5 K473A/D488A- CyaB1 AC	7,1 $\pm$ 2,9 (n=2)	42,2 $\pm$ 23,4 (n=2)
PDE5 K287A/D299A/ K473A/D488A-CyaB1 AC	96,2 $\pm$ 31,3 (n=3)	16,5 $\pm$ 0,9 (n=12)

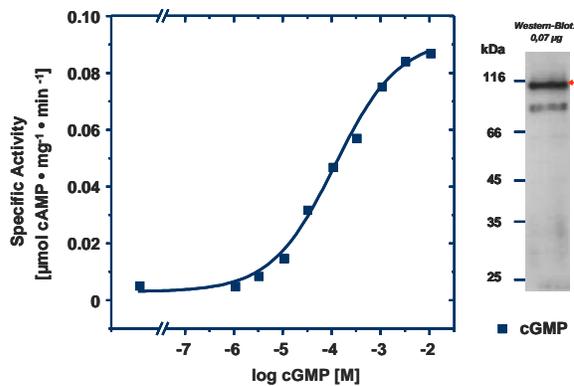
**Tab. 4.4:** EC<sub>50</sub>-Werte für cGMP und die Aktivierbarkeitsfaktoren in den Konstruk-  
ten PDE5 K287A/D299A-CyaB1 AC, PDE5 K473A/D488A-CyaB1 AC und PDE5  
K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC.



**Abb. 4.52:** Aktivierbarkeit von PDE5  
K287A/D299A-CyaB1 AC durch cAMP  
und cGMP.



**Abb. 4.53:** Aktivierbarkeit von PDE5  
K473A/D488A-CyaB1 AC durch cAMP  
und cGMP.



**Abb. 4.54:** Aktivierbarkeit von PDE5  
K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC  
durch cGMP.

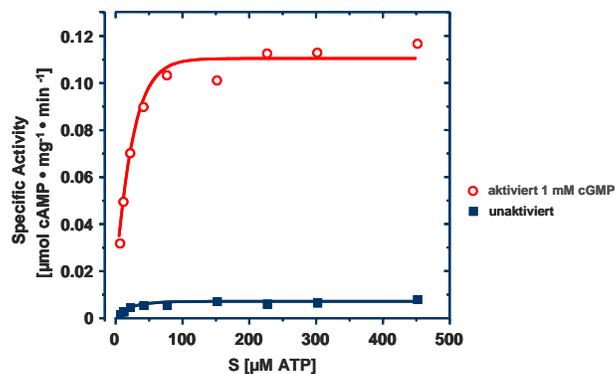
Warum der Aktivierbarkeitsfaktor hier nicht höher als auf 16,5-fach ansteigt, bleibt ungeklärt. Eine Steigerung des Aktivierbarkeitsfaktors durch die Hemmung von GAF B scheint damit nur bei intakter GAF A zu funktionieren oder stärker ausgeprägt zu sein. Wenn GAF A auch mutiert ist, bleiben die Aktivierbarkeitsfaktoren unverändert.

Auch durch die doppelte Mutation von Lys und Asp zu Ala konnte kein Abschalten der Aktivierung durch cGMP erreicht werden, demnach sind diese Aminosäuren weder in GAF A noch in GAF B essentiell für die Bindung von cGMP. Für die Aktivierung der katalytischen AC-Aktivität scheint GAF A die größere Rolle zu spielen und die Mutationen von D299 und K287 zum Alanin bewirken eine verminderte Affinität der GAF A zu cGMP.

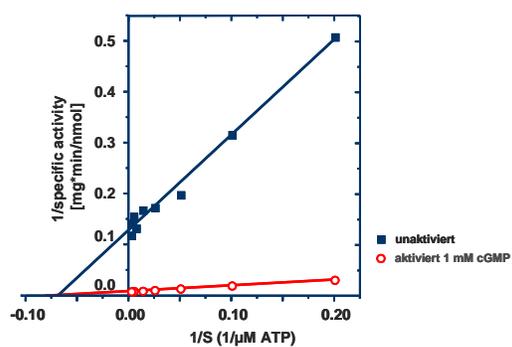
#### 4.3.3.4 Kinetische Messungen von PDE5 K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC

Um Auswirkungen der vier Mutationen in den PDE5-GAF-Domänen auf die enzymatischen Eigenschaften auszuschließen, wurde die Substratkinetik für ATP  $\pm$  1 mM cGMP bestimmt. Die  $K_M$ -Werte wurden aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm erhalten (Abb. 4.56). Sie betragen für das aktivierte Konstrukt 13,4  $\mu$ M und für das unaktivierte 14,6  $\mu$ M und entsprachen damit den für PDE5 GAF-CyaB1 AC und PDE5 S102D-CyaB1 AC gefundenen Werten (vgl. 4.3.1.4 und 4.3.2.5). Ein direkter Vergleich der cGMP-Aktivierungskurven bei 75  $\mu$ M ATP ist somit möglich.

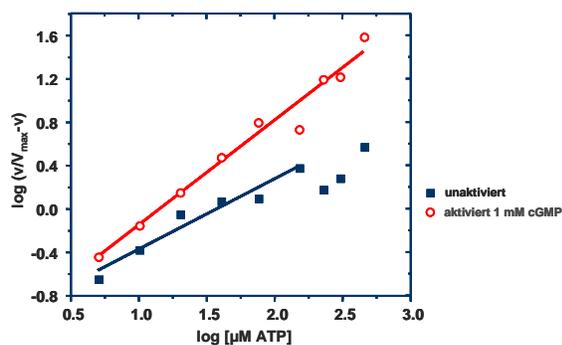
$V_{max}$  lag für das unaktivierte Konstrukt bei 8 nmol $\cdot$ (mg $\cdot$ min) $^{-1}$ , für das aktivierte bei 118 nmol $\cdot$ (mg $\cdot$ min) $^{-1}$ . Die aus dem Hill-Plot ermittelten Hill-Koeffizienten lagen bei 0,97 (aktiviert) bzw. 0,65 (unaktiviert). Damit liegt wie bei CyaB1 und PDE5 GAF-CyaB1 AC keine Kooperativität vor.



**Abb. 4.55:** Michaelis-Menten-Substratkinetik von *PDE5* *K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC*,  $\pm$  1 mM cGMP (Testbedingungen: 10 min, 10 mM  $Mg^{2+}$ , 37°C, 5 bis 450  $\mu$ M ATP, pH 7.5 Tris/HCl).



**Abb. 4.56:** Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung von  $K_M$ , *PDE5* *K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC*,  $\pm$  1 mM cGMP, Daten aus Abb. 4.55.



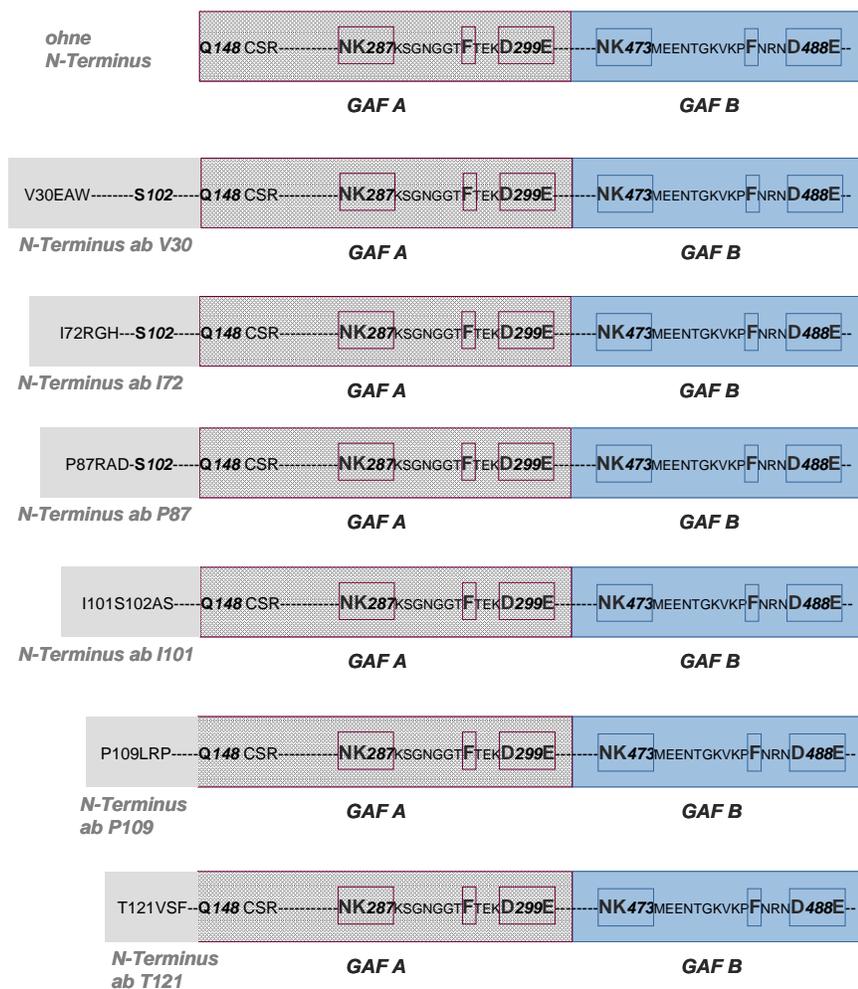
**Abb. 4.57:** Hill-Plot, *PDE5* *K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC*,  $\pm$  1 mM cGMP.

#### 4.3.4 Einfluß des N-Terminus der PDE5 auf die Aktivierung der PDE5 GAF-CyaB1 AC durch cGMP

Durch M. Groß-Langenhoff wurde gezeigt, dass die Länge des N-Terminus in der PDE11A4-CyaB1 AC-Chimäre entscheidend zur Aktivierung des Konstruktes durch cGMP beiträgt (persönliche Mitteilung, [22]). Nur mit einem 196 AS langen N-Terminus konnte eine Stimulation durch cGMP erzielt werden.

Dies war Anlaß, die Rolle des 147 AS langen N-Terminus in PDE5 GAF-CyaB1 AC zu untersuchen, zumal in verschiedenen Untersuchungen bei Konstrukten mit verschiedenen langen N-Termini verschiedene Bindungskonstanten für cGMP gefunden wurden (Tab. 5.1, [2, 28, 31, 34, 35, 40]), d.h. der N-Terminus hat einen Einfluß auf die cGMP-Bindung an die PDE5 GAF-Domänen.

Die folgende Abbildung zeigt alle verkürzten Konstrukte, die kloniert und exprimiert wurden.



#### 4.3.4.1 PDE5 GAF-CyaB1 AC ohne N-Terminus [=PDE5 Q148-CyaB1 AC]

Als erstes wurde dieses Konstrukt wie unter 3.14.3.9 beschrieben, kloniert, bei 16°C für 7 h exprimiert und unter Standardbedingungen gereinigt. Auf dem SDS-Gel war neben den üblichen *E.coli*-Verunreinigungen eine dicke Bande in Sollhöhe (97 kDa) vorhanden (nicht gezeigt). Auch der Überstand nach Bindung des Proteins ans Ni<sup>2+</sup>-Harz zeigte eine deutliche Bande auf der Höhe von PDE5 Q148-CyaB1 AC. Damit scheint das Konstrukt ohne den PDE5-N-Terminus gut löslich exprimierbar zu sein, aber schlechter an Ni<sup>2+</sup>-NTA zu binden als PDE5 GAF-CyaB1 AC.

Im Western-Blot mußten 0,5 µg Gesamtprotein/Spur aufgetragen werden, um ein deutliches Signal zu erhalten. Dies mag an einer Einfaltung des Histags liegen, der damit sowohl bei der Bindung an Ni<sup>2+</sup>-NTA, als auch bei der Erkennung durch den primären RGS-H<sub>4</sub>-Antikörper (3.3.3) schlecht zugänglich war. Das Protein wurde auf Aktivierbarkeit mit cGMP (und cAMP) getestet (Abb. 4.58).

PDE5 Q148-CyaB1 AC zeigte im Vergleich mit PDE5 GAF-CyaB1 AC ein deutlich verändertes Verhalten, die Basalaktivität war 11× so hoch, der EC<sub>50</sub>-Wert für cGMP lag (soweit bestimmbar) bei  $0,2 \pm 0,07 \mu\text{M}$  (n=6), die Aktivierbarkeit war aufgrund der hohen Basalaktivität nur noch 1,6-fach  $\pm 0,05$  (n=30). cAMP hatte keinen stimulierenden Effekt (nicht gezeigt).  $V_{max}$  lag mit einem Wert von mehr als  $0,5 \mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  über der von PDE5 GAF-CyaB1 AC. Um auszuschließen, dass dieses veränderte Verhalten von einer Strukturänderung in der CyaB1 katalytischen Domäne herrührt, wurde die ATP-Substratkinetik wie unter 4.3.1.4 für PDE5 GAF-CyaB1 AC bestimmt. Die erhaltenen Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burk- und Hill-Kurven  $\pm 1 \text{ mM cGMP}$  zeigen Abb. 4.59, 4.60 und 4.61.

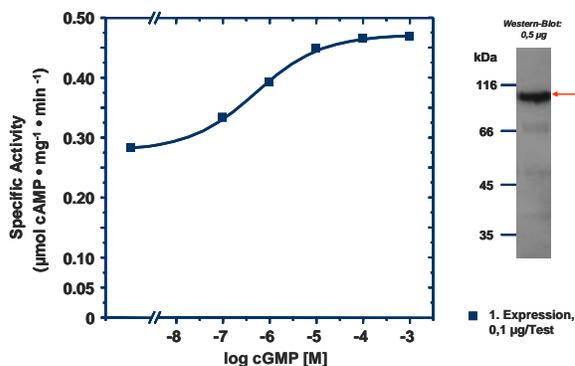


Abb. 4.58: Aktivierbarkeit von PDE5 Q148-CyaB1 AC durch cGMP.

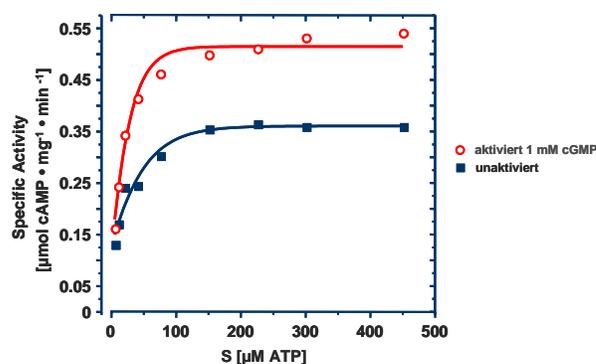


Abb. 4.59: Michaelis-Menten-Substratkinetik von *PDE5 Q148-CyaB1 AC*,  $\pm 1 \text{ mM cGMP}$  (Testbedingungen: 10 min, 10 mM Mg<sup>2+</sup>, 37°C, 5 bis 450 µM ATP, pH 7.5 Tris/HCl).

Die  $K_M$ -Werte betragen für das aktivierte  $14,3 \mu\text{M}$  und  $11,4 \mu\text{M}$  für das unaktivierte Konstrukt und entsprachen damit den für PDE5 GAF-CyaB1 AC, PDE5 S102D-CyaB1 AC und PDE5 K287A/D299A/K473A/D488A-CyaB1 AC gefundenen

Werten (vgl. 4.3.1.4, 4.3.2.5 und 4.3.3.4).  $V_{max}$  lag für das unaktivierte Konstrukt bei  $358 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ , für das aktivierte bei  $572 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ . Die aus dem Hill-Plot ermittelten Hill-Koeffizienten betragen 0,92 (aktiviert) bzw. 0,76 (unaktiviert).

Ein Vergleich der Aktivierung durch cGMP bei einer ATP-Konzentration von  $75 \mu\text{M}$  ist damit möglich, das Abschneiden des N-Terminus beeinflusste die kinetischen Eigenschaften der katalytischen Domäne der CyaB1 nicht.

Die Veränderungen im Aktivierbarkeitsprofil müssen demnach auf eine veränderte cGMP-Bindung an die GAFs oder auf eine Konformationsänderung zwischen GAF und CyaB1 katalytischer Domäne zurückzuführen sein.

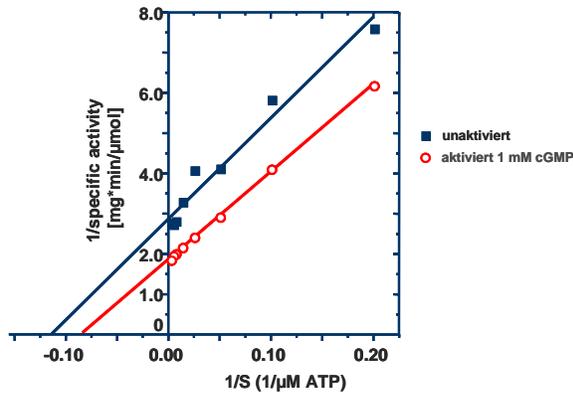


Abb. 4.60: Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung von  $K_M$ , *PDE5 Q148-CyaB1 AC*,  $\pm 1 \text{ mM cGMP}$ , Daten aus Abb. 4.59.

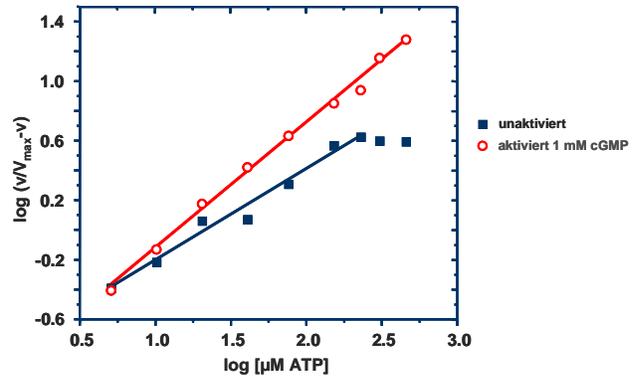


Abb. 4.61: Hill-Plot, *PDE5 Q148-CyaB1 AC*,  $\pm 1 \text{ mM cGMP}$ .

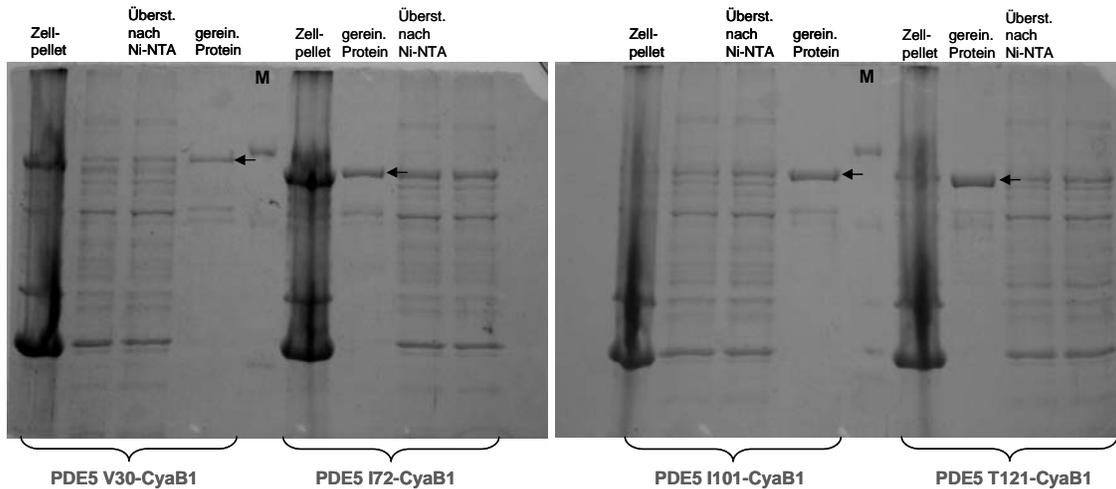
#### 4.3.4.2 Weitere PDE5 GAF-CyaB1 ACn mit verschieden langen N-Termini

Nachdem das Abschneiden des kompletten N-Terminus der PDE5 (147 AS) im PDE5 GAF-CyaB1 AC-Konstrukt eine Enthemmung der AC-Aktivität und eine fast vollständige Blockade der Aktivierung durch cGMP zur Folge hatte, wurde im Folgenden versucht, durch teilweise Verkürzungen des N-Terminus (Übersicht in 4.3.4) herauszufinden, welche Bereiche oder Aminosäuren für die Hemmung im Ausgangskonstrukt verantwortlich sind.

Hierzu wurden Vorhersagen für die Struktur des 147 AS langen N-Terminus (erhalten aus Analysen des Programms *Protean*, DNA-Star-Paket und <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>) genutzt. Es wurden viele flexible Regionen vorhergesagt (zwischen AS 1 und 30, 70 und 100, 135 und 147), in den Bereichen dazwischen sollen sich kurze  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter abwechseln.

Die stückweise Verkürzung des N-Terminus wurde so geplant, dass der Schnitt in ungeordneten Bereichen kurz vor oder nach den projektierten geordneten Abschnitten lag. Zunächst wurden die Konstrukte PDE5 V30, I72, I101 und T121-CyaB1 AC kloniert (beschrieben in 3.14.3.9) und für 10 h bei  $16^\circ\text{C}$  exprimiert. Die Reinigung erfolgte

unter Standardbedingungen, das SDS-Gel zeigte für alle Konstrukte Proteinbanden in der berechneten Höhe (V30: 110,2 kDa, I72: 105,1 kDa, I101: 102,0 kDa und T121: 99,8 kDa; Abb. 4.62).



**Abb. 4.62:** SDS-Gel der Konstrukte PDE5 V30-CyaB1 AC, PDE5 I72-CyaB1 AC, PDE5 I101-CyaB1 AC und PDE5 T121-CyaB1 AC, die jeweiligen Proteine sind durch einen Pfeil gekennzeichnet, M ist die Spur mit aufgetragenem Marker (schlecht sichtbar). Die nicht benannte Spur enthält jeweils ein Aliquot der lysierten Zellen vor  $\text{Ni}^{2+}$ -Bindung, die anderen Spuren sind beschriftet.

Hierbei stieg die reinigbare Proteinmenge mit zunehmender N-terminaler Verkürzung an. Bei V30 wurde mit 4  $\mu\text{g}$  nur eine relativ dünne Bande auf dem SDS-Gel erhalten, wohingegen T121 eine sehr dicke Bande lieferte. Je mehr gewünschtes Protein ans  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA gebunden hatte, desto weniger *E. coli*-Verunreinigungen waren in der Proteinlösung enthalten. Dies mag zum einen auf eine bessere Bindung der kürzeren Konstrukte zurückzuführen sein. Zum anderen war in den aufs SDS-Gel aufgetragenen Zellpellet-Aliquots, die unlösliche Proteine enthalten, bei den längeren Konstrukten V30 und I72 eine dickere Bande in Höhe des Zielproteins erkennbar als bei I101 und T121 (vgl. Abb. 4.62). Damit gelangten die längeren Konstrukte vermehrt in *inclusion bodies*, während die kürzeren besser löslich blieben.

Aktivierbarkeitsfaktor, maximale Aktivität und  $\text{EC}_{50}$ -Wert der einzelnen Verkürzungen sind in Tab. 4.5 gezeigt.

Die erhaltenen Kurven mit den jeweiligen Western-Blots zeigen die Abb. 4.63 bis 4.66. Im Western-Blot sind vor allem bei den beiden längeren Konstrukten einige Abbruchbanden zu sehen. Bei I72, I101 und T121 mußte für ein deutliches Signal nur 0,05  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aufgetragen werden, wohingegen bei V30 0,8  $\mu\text{g}$  nötig waren (gleiche Antikörperlösungen). Dies ist neben dem höheren Reinigungsgrad der kürzeren Konstrukte (Abb. 4.62) vielleicht auf eine Einfaltung des Histags bei V30 zurück-

Konstrukt	EC <sub>50</sub> cGMP [ $\mu$ M]	Aktivierbarkeitsfaktor cGMP [ $\times$ ]	maximale spezifische Aktivität [nmol·(mg·min) <sup>-1</sup> ] mit 1 mM cGMP
PDE5 V30-CyaB1 AC	5,4 $\pm$ 0,9 (n=3)	9,4 $\pm$ 1,6 (n=3)	147
PDE5 I72-CyaB1 AC	14,7 $\pm$ 2,1 (n=3)	17,7 $\pm$ 1,0 (n=3)	297
PDE5 I101-CyaB1 AC	0,9 $\pm$ 0,1 (n=3)	6,3 $\pm$ 0,8 (n=3)	1320
PDE5 T121-CyaB1 AC	0,3 $\pm$ 0,2 (n=2) schlecht bestimmbar!	1,9 $\pm$ 0,1 (n=3)	970

**Tab. 4.5:** EC<sub>50</sub>-Werte für cGMP, die Aktivierbarkeitsfaktoren und die maximalen, durch Stimulation mit cGMP erreichbaren, spezifischen Aktivitäten in den Konstrukten PDE5 V30-CyaB1 AC, PDE5 I72-CyaB1 AC, PDE5 I101-CyaB1 AC und PDE5 T121-CyaB1 AC.

zuführen, was neben einer schlechteren Bindung an Ni<sup>2+</sup>-NTA auch zu einer schlechteren Wechselwirkung mit dem primären RGS-H<sub>4</sub>-Antikörper führte. Dies führte zu einem Anstieg der Nachweisgrenze.

Die Ergebnisse zeigen mit abnehmender Länge des N-Terminus eine ansteigende Basalaktivität, kleiner werdende EC<sub>50</sub>-Werte und nach I72 einen sinkenden Aktivierbarkeitsfaktor. Die Maximalaktivitäten sind aufgrund der unterschiedlichen Reinheitsgrade der Proteinlösungen schlecht vergleichbar, ein Anstieg bis I101 ist erkennbar.

Durch die Versuche konnte keine einzelne „cut-off“-AS für die Enthemmung identifiziert werden, vielmehr scheint der gesamte N-Terminus mit den GAF-Domänen zu wechselwirken und je kürzer er ist, desto stärker ist die Enthemmung der Aktivität der katalytischen Domäne.

Der größte Schritt in Bezug auf die EC<sub>50</sub>-Werte lag zwischen I72 und I101, der größte Sprung zur Verringerung des Aktivierbarkeitsfaktors zwischen I101 und T121. Um diese Bereiche noch genauer untersuchen zu können, wurden zwei weitere Verkürzungen, nämlich PDE5 P87-CyaB1 AC und PDE5-P109-CyaB1 AC angefertigt. Die erhaltene Proteinlösung für das P109-Konstrukt entsprach von Menge und Sauberkeit in etwa den Konstrukten I101 bzw. T121 (Abb. 4.62). Bei P87 war die Ausbeute bei gleichem Reinigungsgrad sogar um 1/3 höher. Im Western-Blot zeigten sich bei diesen beiden Konstrukten keine Abbruchprodukte bei einer aufgetragenen Menge von 0,05  $\mu$ g Protein (Abb. 4.67 und 4.68).

Im AC-Test wurden die in Abb. 4.67 und 4.68 gezeigten Kurven erhalten, die Ergebnisse sind in Tab. 4.6 zusammen mit den Werten der anderen Verkürzungen zusammengefaßt. Die Hill-Koeffizienten einer Aktivierung durch cGMP waren bei allen in dieser Arbeit untersuchten PDE5 GAF-CyaB1 AC-Konstrukten  $\leq 1$ . Mit zunehmender Verkürzung des N-Terminus wurde ein Anstieg der Hill-Koeffizienten von 0,63 (V30) auf 1,05 (I101) beobachtet. Bei noch kürzeren Konstrukten war der Wert graphisch nicht mehr bestimmbar.

Nun zeigte sich ein etwas differenzierteres Bild. Bis zu P87 war ein starker Anstieg des Aktivierbarkeitsfaktors erkennbar, was mit einem starken Anstieg der maximalen

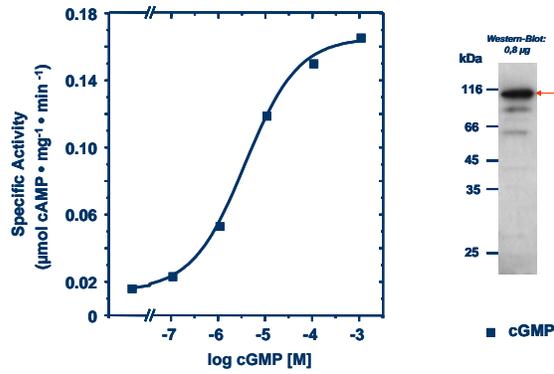


Abb. 4.63: Aktivierbarkeit von PDE5 V30-CyaB1 AC durch cGMP.

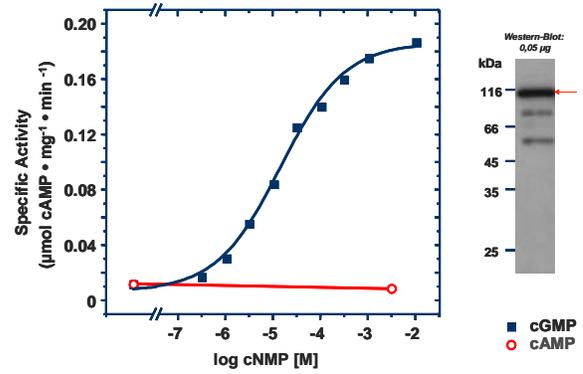


Abb. 4.64: Aktivierbarkeit von PDE5 I72-CyaB1 AC durch cGMP und cAMP.

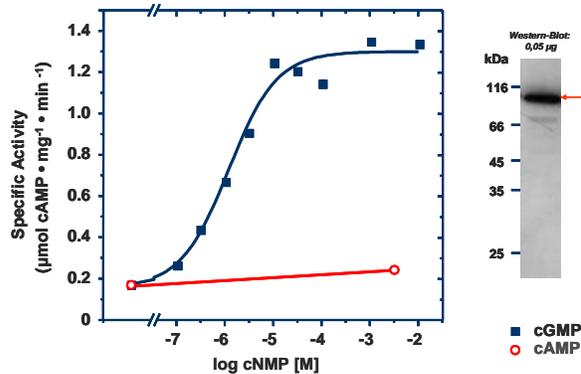


Abb. 4.65: Aktivierbarkeit von PDE5 I101-CyaB1 AC durch cGMP und cAMP.

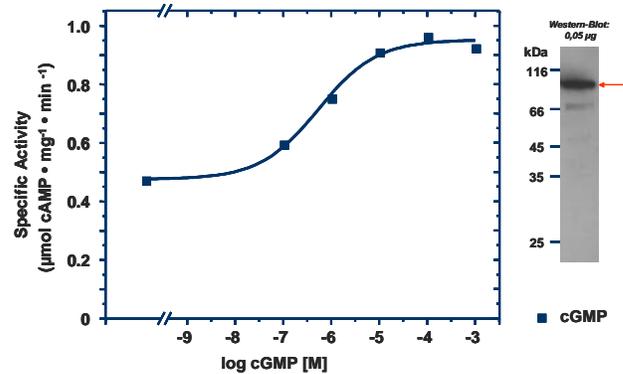


Abb. 4.66: Aktivierbarkeit von PDE5 T121-CyaB1 AC durch cGMP.

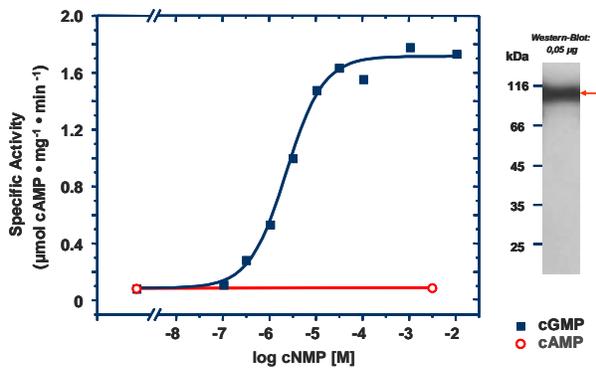
spezifischen Aktivität korrelierte. Die Basalaktivität stieg in diesem Bereich kaum, auch die  $EC_{50}$ -Werte blieben (leicht sinkend) auf ähnlichem Niveau. Vor allem im Bereich zwischen I101 und P109 stieg die Basalaktivität an. Das bedeutete, die AC wurde auch ohne stimulatorisches cGMP aktiver, außerdem stieg die Bindungsaffinität für cGMP. In dem Maße in dem die Basalaktivität anstieg, sank der Aktivierbarkeitsfaktor.

Durch diesen Bereich scheint im Ausgangskonstrukt entweder die Bindung von cGMP an die GAF-Domänen behindert zu werden, oder es ist der Bereich, der GAF und katalytische Domäne in einer unaktivierten Form hält, bzw. beides in einem. Wird er entfernt, geht die katalytische Domäne in die aktivere Form über (auch ohne cGMP) und die Bindungstasche für cGMP wird höher affin. Bei P109 scheint die Bindungstasche die optimale Anordnung und Zugänglichkeit erreicht zu haben, weitere Verkürzungen erbringen keine Erniedrigung der  $EC_{50}$  und des Aktivierbarkeitsfaktors.

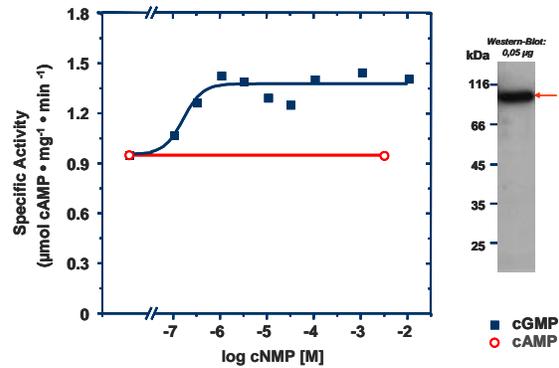
Konstrukt	EC <sub>50</sub> cGMP [ $\mu$ M]	Aktivierbarkeitsfaktor cGMP [ $\times$ ]	maximale spezifische Aktivität [ $\text{nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ ] mit 1 mM cGMP
PDE5 V30-CyaB1 AC	$5,4 \pm 0,9$ (n=3)	$9,4 \pm 1,6$ (n=3)	147
PDE5 I72-CyaB1 AC	$14,7 \pm 2,1$ (n=3)	$17,7 \pm 1,0$ (n=3)	297
<b>PDE5 P87-CyaB1 AC</b>	<b><math>3,0 \pm 0,7</math> (n=2)</b>	<b><math>27,4 \pm 6,8</math> (n=2)</b>	<b>1760</b>
PDE5 I101-CyaB1 AC	$0,9 \pm 0,1$ (n=3)	$6,3 \pm 0,8$ (n=3)	1320
<b>PDE5 P109-CyaB1 AC</b>	<b><math>0,2 \pm 0,04</math> (n=2)</b>	<b><math>1,7 \pm 0,2</math> (n=2)</b>	<b>1365</b>
PDE5 T121-CyaB1 AC	$0,3 \pm 0,2$ (n=2) schlecht bestimmbar!	$1,9 \pm 0,1$ (n=3)	970
PDE5 Q148-CyaB1 AC	$0,2 \pm 0,07$ (n=6)	$1,6 \pm 0,04$ (n=30)	500

**Tab. 4.6:** EC<sub>50</sub>-Werte für cGMP, die Aktivierbarkeitsfaktoren und die maximalen, durch Stimulation mit cGMP erreichbaren, spezifischen Aktivitäten in den Konstrukten PDE5 V30-CyaB1 AC, PDE5 I72-CyaB1 AC, PDE5 P87-CyaB1 AC, PDE5 I101-CyaB1 AC, PDE5 P109-CyaB1 AC und PDE5 T121-CyaB1 AC.

Im Gegenteil, sie scheinen einen negativen Einfluß auf die erreichbare Maximalaktivität zu haben, denn diese sinkt bei T121 und PDE5 Q148-CyaB1 AC ab. Dies mag zum Teil auf die verschiedenen sauberen Proteine zurückzuführen sein, da aber alle Konstrukte unter den gleichen Bedingungen exprimiert und gereinigt wurden, sollte ein Vergleich möglich sein. Vielleicht bewirkt eine zu starke Verkürzung wieder eine weniger optimale Interaktion zwischen aktivierender GAF-Domäne und katalytischem Zentrum.



**Abb. 4.67:** Aktivierbarkeit von PDE5 P87-CyaB1 AC durch cGMP und cAMP.



**Abb. 4.68:** Aktivierbarkeit von PDE5 P109-CyaB1 AC durch cGMP und cAMP.

## 4.4 Untersuchungen zur Nucleotidspezifität in den GAF-Domänen von CyaB1 und rPDE2a

In der *CyaB1* wird die katalytische Domäne durch cAMP via GAF B stimuliert. Das andere cyclische Purinnucleotid, cGMP, ist 300-fach weniger potent.

Die Struktur der PDE2A-GAF-Domänen der Maus ergab, dass dort folgende AS an der Bindung des cGMP beteiligt sind [1]: S424, F438, D439, I458, A459, Y481, V484, D485, T488, T492 und E512 (Abb. 4.69).

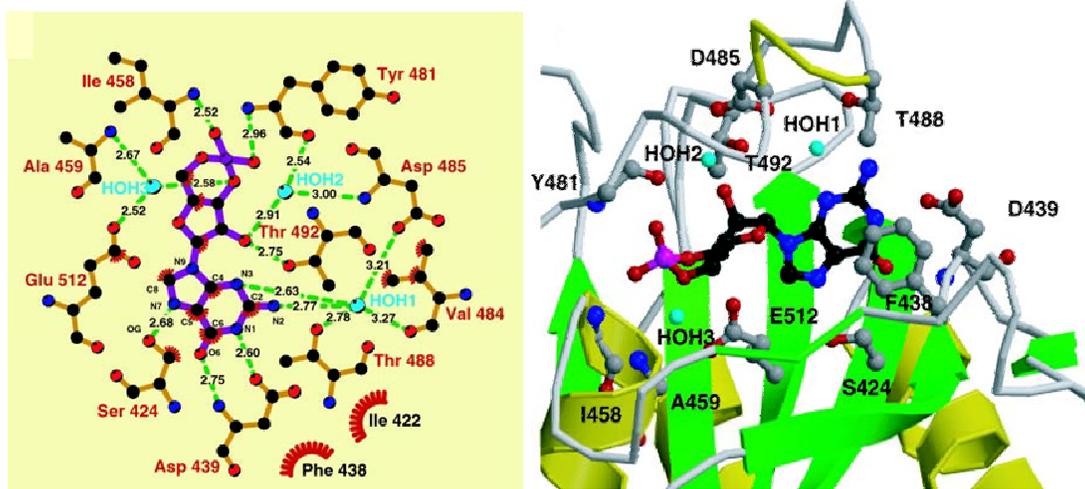


Abb. 4.69: Interaktionen der Bindetasche von PDE2A GAF B mit cGMP, [aus 1].

In weiteren Experimenten wurden die o. a. Aminosäuren [25] bzw. ihre Entsprechungen in PDE5 [31], PDE6 [23] und der cAMP-bindenden Trypanosomen-PDE2B [32] mutiert und die Auswirkungen auf die cNMP-Bindung untersucht. In PDE2A wurden vor allem die mit dem Pyrimidin-Ring interagierenden AS F438, D439 und T488 als spezifizierend für cGMP identifiziert. Die Mutationen der AS, die mit der Phosphat-Ribose oder dem Imidazol-Ring interagieren, verhinderte die cGMP-Bindung [25]. In PDE 5 blockierte die Mutation des zu F438 in PDE2A analogen F205 die Bindung von cGMP völlig [31]. In PDE6 war jede der analogen AS zu F438, D439, T488 und T492 essentiell für die cGMP-Bindung und bei der TbPDE2B bewirkte die Mutation von T317 zu A (entsprechend T492 in PDE2A) einen Affinitätsverlust der cAMP-Bindung.

Im Folgenden wird untersucht, welche Aminosäuren im Falle der CyaB1-GAF-B-Domäne für die cAMP-Spezifität entscheidend sind und ob durch gezielte Mutation einzelner oder mehrerer Aminosäuren die Spezifität zugunsten von cGMP umgekehrt werden konnte. Diese Experimente wurden ausgeführt noch bevor die Tandem GAF-Domäne von CyaB2 kristallisiert worden war, anderenfalls wäre es sinnvoller gewesen mit dieser zu arbeiten. Als Ausgangspunkt diente die  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleife der PDE2A im

Vergleich mit CyaB1. Noch von T. Kanacher wurde CyaB1 W270 zu Ala, Phe und Tyr mutiert, ohne dass sich die Spezifität für cAMP oder cGMP geändert hätte (*unpublished*). Auch ein Austausch von W270 gegen Val und A274 gegen Phe (entsprechend D439 in PDE2A) hatte keinen Effekt. Erst der Austausch ganzer Sequenzbereiche aus CyaB1 GAF B gegen die entsprechenden Regionen aus rPDE2a GAF B führte zu eindeutigen Veränderungen (Abb. 4.70).

In den schematischen Darstellungen der Konstrukte stammen dunkelgrau unterlegte Sequenzbereiche mit weißer Schrift aus rPDE2a, schwarze Schrift auf hellem Hintergrund zeigt AS aus CyaB1 an. Alle Meßwerte (z.B. Aktivierbarkeitsfaktoren oder EC<sub>50</sub>-Werte) stellen den Mittelwert aus mindestens 4 Einzelwerten dar. Die Standardabweichung wurde als SEM angegeben <sup>2</sup>. Die angegebenen n-Werte geben die Anzahl der AC-Tests an und sind damit halb so groß wie die Anzahl der Einzelwerte. Kurven zeigen i. d. R. das Ergebnis eines AC-Testes (Mittelwert von zwei Bestimmungen).

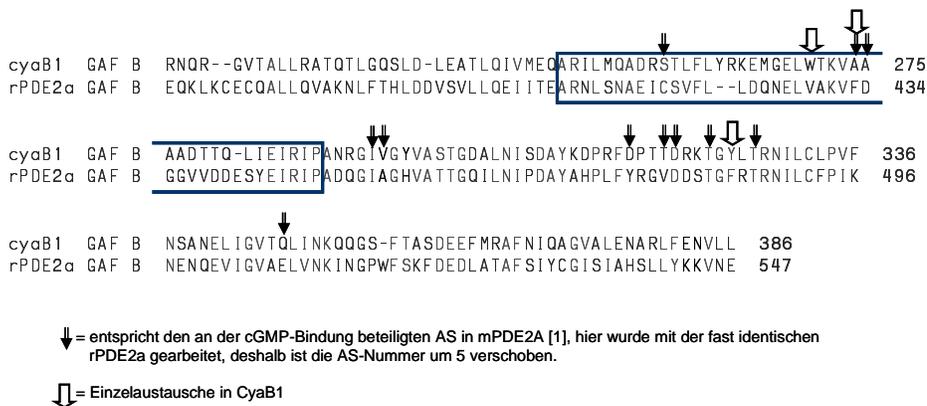


Abb. 4.70: Alignment der aus der PDE2A GAF Kristallstruktur abgeleiteten Nucleotidspezifisierenden Aminosäuren und Regionen in rPDE2a und CyaB1.

#### 4.4.1 Blockaustausch AR-EL

[Austausch der AS I250 bis G267 aus CyaB1 gegen N411 bis N426 aus rPDE2a]



Das Protein (Vektor *pQE30* in *Bl21(DE3)[pRep4]*-Zellen) war unter Standardbedingungen nach Frenchpress-Aufschluss reinigbar. Das Protein war wenig aktiv, so dass

<sup>2</sup>wenn keine SEM angegeben ist, sind nur zwei Einzelwerte vorhanden, bzw. es werden Daten von T.Kanacher aufgeführt.

2  $\mu\text{g}$  Protein im Test eingesetzt wurden.

Ein Western-Blot mit RGS-H<sub>4</sub>-Antikörpern zeigte bei 0,2  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Spur ein dickes Signal ohne Abbruchprodukte (Abb.4.71). Es zeigte sich ein völliger Verlust der cNMP-Aktivierung (Abb. 4.71). Es kann daher im Bereich zwischen AR und EL auf eine wesentliche Beteiligung bei der cAMP-Bindung geschlossen werden. Aufgrund der geringen Basal-AC-Aktivität von 4–5  $\text{nmol}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$  kann eine völlige Fehlfaltung des Proteins ausgeschlossen werden, weshalb der Verlust der cAMP-Stimulierbarkeit auf ein Nicht-Binden des cAMPs an die GAF-Domäne zurückzuführen sein sollte.

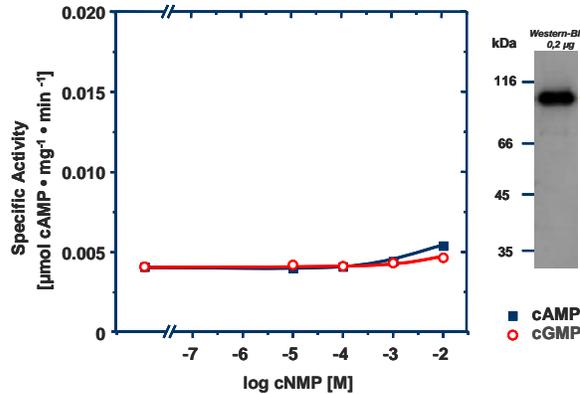


Abb. 4.71: Aktivierbarkeit von CyaB1-[AR-EL-rPDE2a]-CyaB1 AC (I) durch cAMP und cGMP.

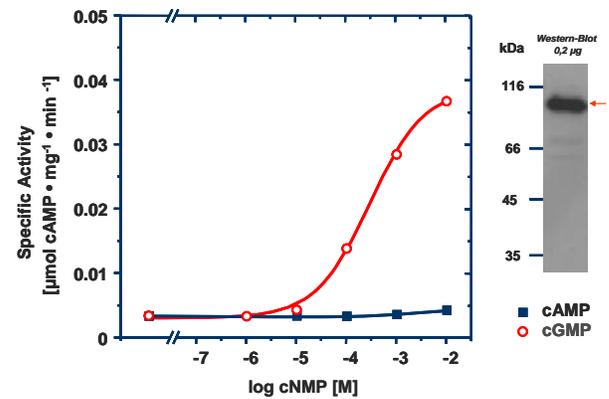


Abb. 4.72: Aktivierbarkeit von CyaB1-[AR-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (II) durch cAMP und cGMP.

#### 4.4.2 Blockaustausch AR-EIRIP

[Austausch der AS I250 bis I283 aus CyaB1 gegen N411 bis Y443 aus rPDE2a]



Dieses Konstrukt zeigte ebenfalls eine geringe Basalaktivität ( $3,5 \text{ nmol}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$ ). Hier wurde mit cGMP eine Stimulation um den Faktor 10,5 erreicht (Abb. 4.72). cAMP ergab keine Stimulation. Die  $EC_{50,cGMP}$  war mit  $300 \mu\text{M}$  jedoch sehr hoch.

Durch den Austausch dieses Bereiches wird offensichtlich die Spezifität von cAMP auf cGMP umgeschaltet, wobei die Faltung des Proteins die Aktivität der CyaB1 katalytischen Domäne jedoch zu stören scheint. Dies wird durch die niedrige spezifische Aktivität des unstimulierten Proteins offensichtlich. Die CyaB1 üblicherweise eine Basalaktivität von  $30 \text{ nmol}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$  [14].

### 4.4.3 Blockaustausch EL-EIRIP

[Austausch der AS W270 bis I283 aus CyaB1 gegen V429 bis Y443 aus rPDE2a]



Die Expression dieses Konstruktes war vergleichbar mit den AR-EL und AR-EIRIP-Proteinen. Jedoch betrug schon die Basalaktivität ca.  $350 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ . Diese wurde durch cAMP  $11,3 \pm 0,23$  (n=5) und durch cGMP  $12,7 \pm 0,49$  (n=5)-fach erhöht (Abb. 4.73). Die  $EC_{50}$ -Werte waren mit  $3,3 \mu\text{M}$  (n=5, cAMP) und  $3,5 \mu\text{M}$  (n=5, cGMP) fast identisch und entsprachen der  $EC_{50, \text{cAMP}}$  von CyaB1 ( $1\text{--}2,6 \mu\text{M}$ ). Die höchste Aktivität lag mit  $3,8 \mu\text{mol cAMP} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  sogar noch etwas über der von CyaB1 ( $2,2 \mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ ) [14, 15]. Die Purinspezifität war hier verloren gegangen. Zwischen EL und EIRIP scheinen bei PDE2 Aminosäuren zu liegen, die eine Bindung von cNMPs ermöglichen. Umgekehrt lassen sie in CyaB1 in diesem Bereich die cGMP-Bindung nicht zu, d.h. hier könnte zumindest ein Teil des Spezifitätsfilters lokalisiert sein.

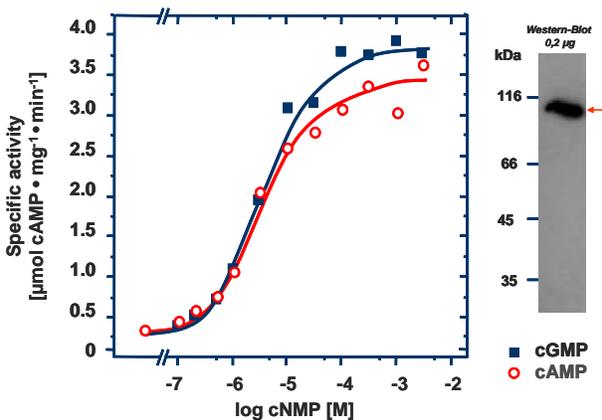


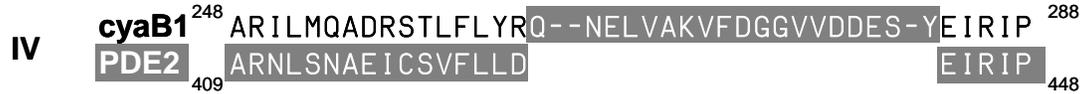
Abb. 4.73: Aktivierbarkeit von CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (III) durch cAMP und cGMP.

### 4.4.4 Austausch QNEL-/QEMNEL-/LD- und SVFL-EIRIP

Die Stimulierbarkeit des EL-EIRIP-Konstruktes mit cAMP und cGMP und des AR-EIRIP-Konstruktes nur mit cGMP ließen vermuten, dass die cAMP-spezifisierenden Aminosäuren im Bereich zwischen AR und EL liegen. Um dies zu überprüfen, wurden fortlaufend jeweils die beiden nächsten unterschiedlichen ASn zwischen CyaB1 und rPDE2a ausgetauscht (vom EL-EIRIP-Konstrukt ausgehend Richtung AR).



[Ausgangskonstrukt EL-EIRIP (4.4.3)]



[Austausch der AS K264 und G267 bis I283 aus CyaB1 gegen Q425 und N226 bis Y443 aus rPDE2a]



[Austausch der AS K264 bis I283 aus CyaB1 gegen Q425 bis Y443 aus rPDE2a]



[Austausch der AS Y262 bis I283 aus CyaB1 gegen L423 bis Y443 aus rPDE2a]



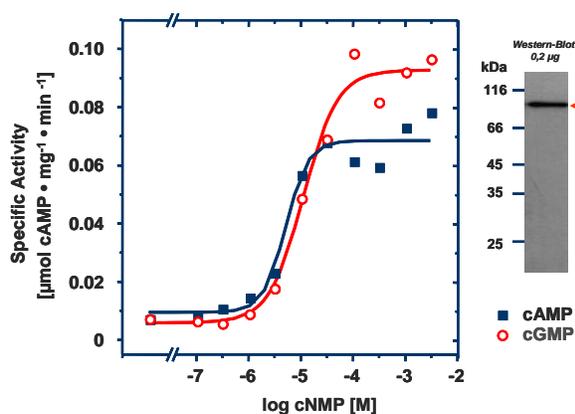
[Austausch der AS T258 bis I283 aus CyaB1 gegen S419 bis Y443 aus rPDE2a]

Alle Proteine waren bei 16°C über Nacht exprimierbar und mit Ni<sup>2+</sup>-NTA reinigbar, die Ausbeuten waren sehr unterschiedlich, QEMNEL (V) und LD (VI) ergaben nach der ersten Bindung an Ni<sup>2+</sup>-NTA mittlere Mengen an gereinigtem Protein, während im QNEL-Protein (IV) viele *E. coli*-Proteine waren. Dafür ließ sich SVFL (VII) mit wenig Verunreinigung in hoher Ausbeute reinigen. Die Western-Blots (Abb. 4.74, 4.75, 4.76, 4.77) ergaben bei 0,2 µg Gesamtprotein/Spur für QEMNEL (V), LD (VI) und SVFL (VII) Signale ohne Abbruchprodukte, lediglich für das weniger gereinigte QNEL (IV) wurde ein dünneres Signal erhalten. Die unterschiedlichen Ausbeuten spiegelten sich auch in den AC-Aktivitäten wieder (Abb. 4.74, 4.75, 4.76, 4.77).

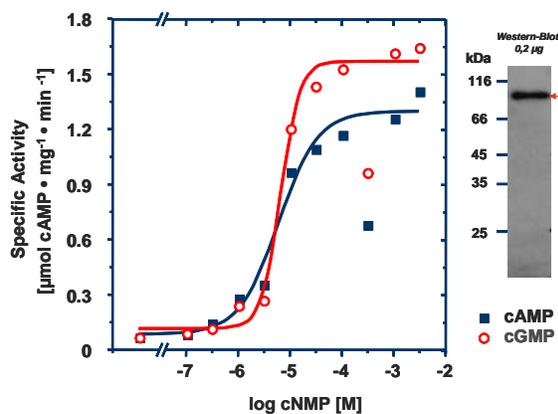
QNEL (IV), QEMNEL (V) und LD (VI) wiesen gleiche Spezifität für cAMP und cGMP auf, nur SVFL (VII) zeigte eine 8-fach höhere Spezifität für cGMP (Tab. 4.7) und eine mehr als 10× höhere Aktivierung durch cGMP. Die höheren Aktivierbarkeitsfaktoren (bei LD (VI)) waren wahrscheinlich auf die geringere Basalaktivität (ca. 25 nmol·(mg·min)<sup>-1</sup> bei LD im Vergleich zu QEMNEL mit 56,5 51 nmol·(mg·min)<sup>-1</sup>) zurückzuführen. Diese Unterschiede können teilweise durch eine Autoaktivierung durch im Test gebildetes cAMP erklärt werden. Dies kann bei SVFL (VII) durch die cGMP-Selektivität und den hohen EC<sub>50</sub>-Wert für cAMP ausgeschlossen werden. Die Hill-Koeffizienten der Konstrukte lagen für cAMP knapp unter 1, für cGMP zwischen 0,9 und 1,2.

Konstrukt	EC <sub>50</sub> cAMP [μM]	EC <sub>50</sub> cGMP [μM]	Aktivierbarkeitsfaktor		EC <sub>50</sub> cAMP EC <sub>50</sub> cGMP
			cAMP [×]	cGMP [×]	
QNEL (IV)	5,2	11,3	10,9	13,7	0,46
QEMNEL (V)	5,5 ± 0,5 (n=2)	6,8 ± 0,2 (n=2)	15,4 ± 5,4 (n=2)	18,1 ± 6,3 (n=2)	0,81
LD (VI)	7,3 ± 2,4 (n=2)	19,9 ± 0,8 (n=2)	46,1 ± 7,2 (n=2)	54,2 ± 6,6 (n=2)	0,37
SVFL (VII)	78,9 ± 30,9 (n=2)	9,9 ± 0,3 (n=2)	35,6 ± 2,3 (n=2)	394 ± 29,8 (n=21)	7,97

**Tab. 4.7:** Übersicht über die zwei-AS-Austausche zwischen AR und EL in CyaB1 GAF B [bei QNEL wurde nur ein aussagekräftiger AC-Test durchgeführt].



**Abb. 4.74:** Aktivierbarkeit von CyaB1-[QNEL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (IV) durch cAMP und cGMP.



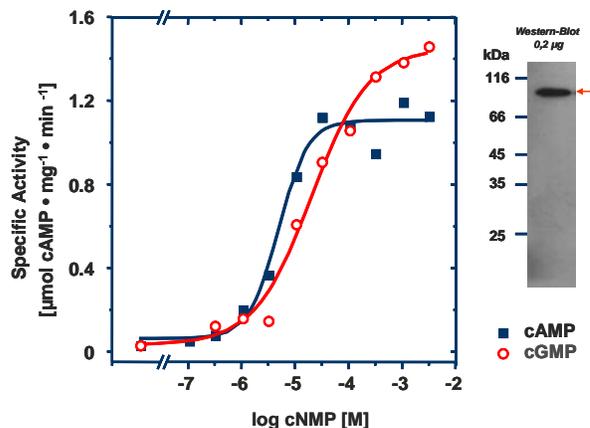
**Abb. 4.75:** Aktivierbarkeit von CyaB1-[QEMNEL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (V) durch cAMP und cGMP.

#### 4.4.5 SVFL-EIRIP: Versuche zur Kristallisation

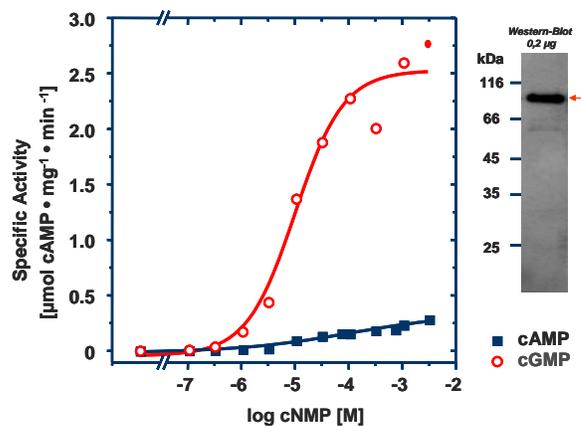
Aufgrund der guten Proteinausbeute und dem Reinheitsgrad des SVFL-Konstruktes (VII) optimierte Ursula Kurz Expression und Reinigung und setzte Kristallisationsversuche mit cGMP an.

Das Protein besteht inklusive Histag aus 870 AS, MW 97,9 kDa, pI = 5,36. Die höchste katalytische Aktivität ( $3$  bis  $5 \mu\text{mol cAMP} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$ ) liegt zwischen pH 7,5 und 8,5 vor. Bei pH 7 oder 10 wurde noch die Hälfte der Aktivität gemessen. Mit 10% Glycerin war das Enzym bei Lagerung bei  $-20$ ,  $-80$  bzw.  $\text{N}_2$ -Schock und anschließend  $-80^\circ\text{C}$  stabil. Auch vier Wochen bei  $4^\circ\text{C}$  mit 20% Glycerin führte nur zu einem Verlust von 20%, nach 2 Monaten mit 10% Glycerin bei  $4^\circ\text{C}$  verblieb eine Restaktivität von 25-35%. Diese Stabilität von SVFL (VII) ist eine gute Voraussetzung für Kristallisationsversuche.

Die Expression erfolgte bei  $18^\circ\text{C}$  über Nacht mit  $15 \mu\text{M}$  IPTG und  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$



**Abb. 4.76:** Aktivierbarkeit von CyaB1-[LD-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (VI) durch cAMP und cGMP.



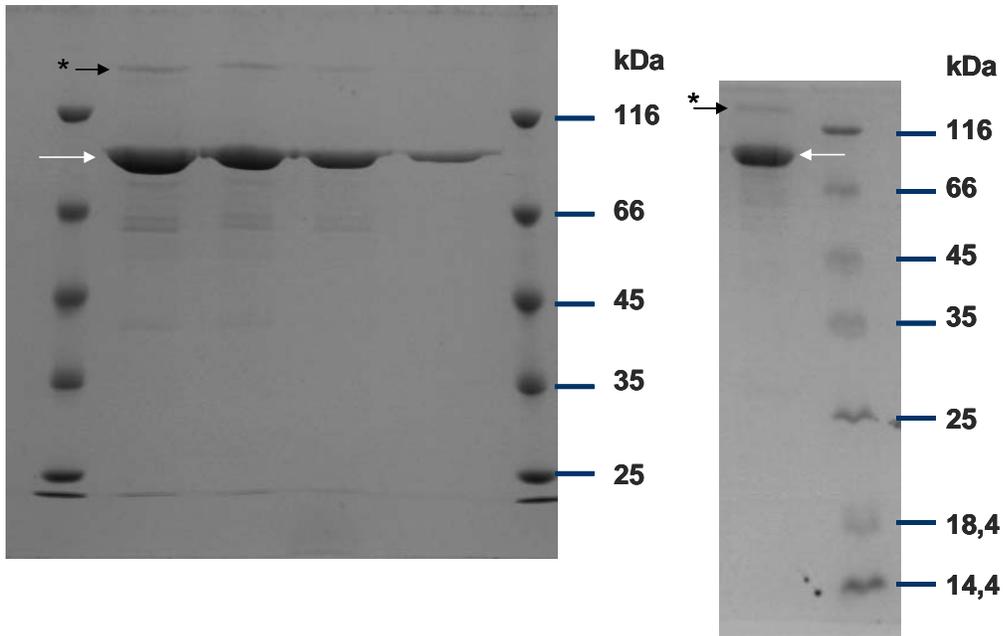
**Abb. 4.77:** Aktivierbarkeit von CyaB1-[SVFL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (VII) durch cAMP und cGMP.

(wurde schon nach 6 h bei einer  $OD_{600}$  von 2,5 geerntet, konnte kein Protein gereinigt werden). Nach Waschen der Zellen (3.5) und Resuspension in Lysepuffer ohne Proteaseinhibitoren (2.5.2.3), wurde 2-3 $\times$  mit *Frenchpress* bei 1000 psi aufgeschlossen (3.6) und zwischen 1,5 und 20 h an  $Ni^{2+}$ -NTA gebunden. Pro 200 ml Kultur wurden 50  $\mu$ l  $Ni^{2+}$ -NTA zugesetzt. Die Bindungszeit an  $Ni^{2+}$ -NTA hatte kaum Auswirkungen auf Ausbeute und Reinheitsgrad. Als Affinitätsmaterial wurde zum einen  $Ni^{2+}$ -NTA der Firma *Qiagen* und zum anderen *Ni-IDA* Affinitätsmaterial der Firma *BioRad* eingesetzt. Die Reinigungserfolge waren vergleichbar, jedoch wurde zum Binden beim *Qiagen*-Material 55 mM Imidazol und 250 mM NaCl und beim *BioRad*-Material nur 10 mM Imidazol und 250 mM NaCl (= Bindepuffer) zugesetzt.

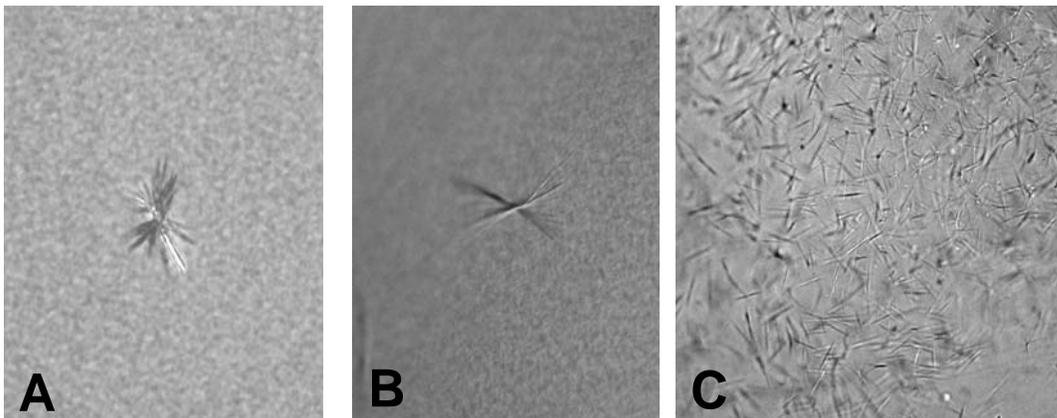
Beim anschließenden Waschvorgang wurden je 100  $\mu$ l abzentrifugiertes Affinitätsmaterial mit 3 ml Washpuffer 1 (entspricht dem Bindepuffer für das jeweilige Material) und mit 3 ml Washpuffer 2 (wie Bindepuffer, + 10 mM NaCl und 60 mM Imidazol (bei *Qiagen*-Material) bzw. + 15 mM Imidazol (bei *BioRad*-Material) gewaschen. Je 100  $\mu$ l  $Ni^{2+}$ -NTA wurden mit 300  $\mu$ l Elutionspuffer (2.5.2.3) eluiert (Abb. 4.78).

Zur Entfernung von Imidazol und Glycerin wurde gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 4°C, 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM NaCl und 10% Glycerin dialysiert und durch Zentrifugation mit Größenausschluß-Filtern aufkonzentriert. Dabei fiel immer viel Protein aus.

Kristallisationsversuche wurden bei 4,5 bis 9  $\mu$ g/ $\mu$ l Protein, 10% Glycerin und 2 mM cGMP mit dem *Wizard I*-Kit, deCODE genetics, Emerald Biostructures Products, angesetzt. Die in Abb. 4.79 gezeigten Kristalle wurden bei 12°C erhalten, Versuche mit verschiedenen Salzen zeigten keinen Erfolg, der hohe pH von 11 schien für die Kristallisation wichtig zu sein.



**Abb. 4.78:** SDS-PAGE-Gele von SVFL (VII) nach Reinigung. Im linken Gel wurden 4, 3, 2 und 1  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein aufgeladen, im rechten Gel wurden 3  $\mu\text{g}$  aufgetragen. Weiße Pfeile markieren das Zielprotein bei 97,9 kDa, schwarze Pfeile mit Sternchen markieren gebildetes Dimer.



**Abb. 4.79:** A: mit 0,1 M CAPS pH 11, 3,2 M Hexandiol und 0,2 M LiCl, Länge ca. 30  $\mu\text{m}$ ,  
 B: mit 0,1 M CAPS pH 11, 30% PEG 200 und 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Länge ca. 50  $\mu\text{m}$ ,  
 C: mit 0,1 M CAPS pH 11, 30% PEG 400, Länge ca. 30  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.6 Austausch TV-/SL-/SV-CyaB1-EL-EIRIP

Der Austausch TL aus CyaB1 gegen SV aus rPDE2a bewirkte eine Spezifitätsumkehr, anstelle von cAMP stimulierte cGMP die CyaB1 (4.4.4, Abb. 4.77). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der Austausch von T oder L für diese Umkehr ausreichend ist. Folgende Konstrukte wurden kloniert (Vorgehen Seite 75) und bei 16°C über Nacht exprimiert:



[Austausch L259V in EL-EIRIP (III)]



[Austausch von T258S in EL-EIRIP (III)]



[Austausch von T258S/L259V in EL-EIRIP (III)]

Bei der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung wurden die Konstrukte erhalten, wenn auch mit tyrischen *E. coli*-Verunreinigungen im SDS-Gel (nicht gezeigt). [TV-CyaB1-EL-EIRIP-rPDE2a] (VIII) war etwas geringer gereinigt (SDS-Gel nicht gezeigt). Im Test ergaben sich verschiedene cyclische Nucleotid-Spezifitäten (Tab. 4.8; Abb. 4.80, 4.82 und 4.81). Die Hill-Koeffizienten für TV-CyaB1-EL-EIRIP (VIII) und SL-CyaB1-EL-EIRIP (IX) lagen für cAMP und cGMP um 1. SV-CyaB1-EL-EIRIP (X) hatte für cAMP einen Hill-Koeffizienten von 0,8 und für cGMP von 1,2. Die Mutation von T258S/L259V in EL-EIRIP (III) bewirkt neben der Spezifitätserhöhung für cGMP auch einen leichten Anstieg des Hill-Koeffizienten.

Bei TV-CyaB1-EL-EIRIP konnten die EC<sub>50</sub>-Werte für cGMP nur näherungsweise bestimmt werden, da keine Sättigung erreicht wurde. Es zeigte eine 11× höhere Selektivität für cAMP und verhielt sich damit mehr wie CyaB1 GAF B (Abb.4.80). Dies überraschte, da EL-EIRIP gleichermaßen durch cAMP und cGMP stimuliert wurde. Der Austausch von CyaB1 Leu gegen rPDE2a Val bewirkte einen Anstieg der Selektivität für cAMP. Nachdem der EC<sub>50</sub>-Wert für cAMP mit 72,8 μM sehr groß war, könnten diese Veränderungen auch Ursache einer Strukturänderung in der Bindungstasche sein.

Der Austausch CyaB1 Thr gegen rPDE2a Ser in SL-CyaB1-EL-EIRIP bewirkte eine 33-fach höhere Affinität zu cGMP (Abb.4.82). Bei diesem Konstrukt sank die EC<sub>50</sub> für cAMP von 3,3 μM bei EL-EIRIP auf 1,3 μM, gegenüber cGMP entwickelte sich eine hohe Empfindlichkeit (EC<sub>50</sub> = 0,04 μM). S419 aus rPDE2a schien damit an

Konstrukt	EC <sub>50</sub> cAMP [μM]	EC <sub>50</sub> cGMP [μM]	Aktivierbarkeitsfaktor		$\frac{EC_{50} \text{ cAMP}}{EC_{50} \text{ cGMP}}$
			cAMP [×]	cGMP [×]	
TV-CyaB1-EL-EIRIP (VIII)	72,8 ± 21,8 (n=3)	ca. 814 ± 121,6 (n=3)	34,3 ± 6,7 (n=3)	38,5 ± 7,6 (n=3)	0,09
SL-CyaB1-EL-EIRIP (IX)	1,3	0,04 ± 8,5·10 <sup>-3</sup> (n=2)	6,1	7,1 ± 0,4 (n=2)	32,5
SV-CyaB1-EL-EIRIP (X)	56,9 ± 32,6 (n=3)	4,6 ± 0,6 (n=3)	27,1 ± 4,8 (n=3)	96,4 ± 5,3 (n=3)	12,4

Tab. 4.8: Ergebnisse des Austausches TV-/SL-/SV-CyaB1 in EL-EIRIP-rPDE2a-CyaB1 AC.

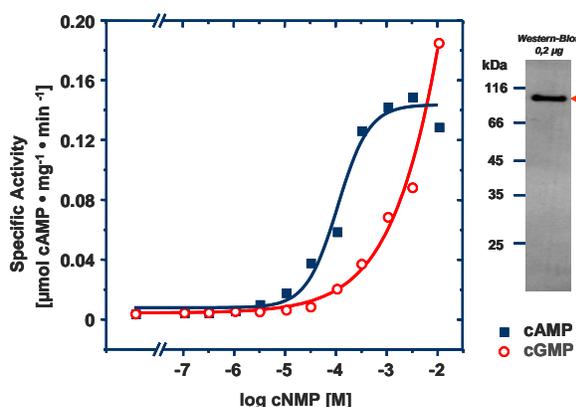


Abb. 4.80: Aktivierbarkeit von CyaB1-[TV-CyaB1-EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (VIII) durch cAMP und cGMP.

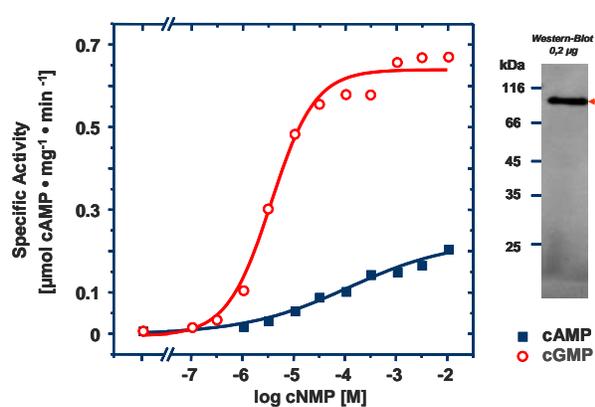


Abb. 4.81: Aktivierbarkeit von CyaB1-[SV-CyaB1-EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (X) durch cAMP und cGMP.

der Bindung des cGMPs in der Bindetasche beteiligt entscheidend mitzuwirken. Das Ergebnis deckte sich mit den durch die Aufklärung der Kristallstruktur der PDE2A-GAF-Domänen [1] erhaltenen Erkenntnissen, dort war das entsprechende S424 an der Bindung des cGMPs beteiligt.

Das Konstrukt SV-CyaB1-EL-EIRIP (X) verhielt sich weitgehend wie SVFL-EIRIP (VII) (vgl. Abb. 4.77 und Abb. 4.81), die Diskriminierung von cGMP gegenüber cAMP war 12-fach. Die mit cGMP erreichbare maximale spezifische Aktivität des Konstruktes lag allerdings nur um den Faktor 3,6 darüber, während bei SVFL-EIRIP (VII) eine 10-fach höhere spezifische Aktivität für cGMP gefunden wurde. Dabei verlief die cAMP-Aktivierungskurve in beiden Fällen gleichartig. Mit SVFL-EIRIP (VII) wurde nur mit cGMP eine 3-4× höhere spezifische Aktivität erreicht. Dies könnte mit einer besseren Faltung (ev. durch den Austausch eines größeren zusammenhängenden Bereichs) und einer verbesserten Signalweitergabe an die katalytische Domäne zusammenhängen.

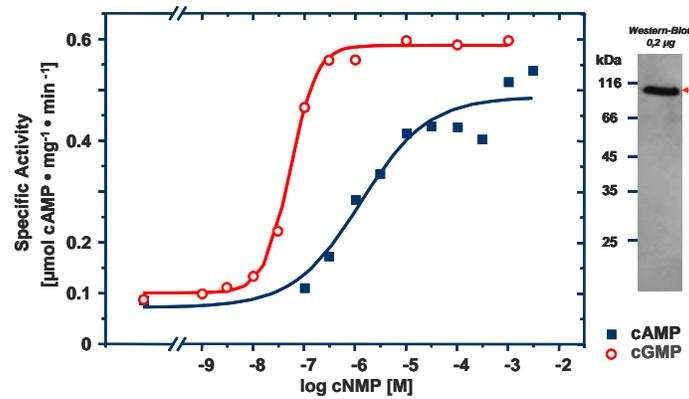


Abb. 4.82: Aktivierbarkeit von CyaB1-[SL-CyaB1-EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (IX) durch cAMP und cGMP.

Die Aminosäuren S419 und V420 bewirkten somit in EL-EIRIP-rPDE2a-CyaB1 AC gemeinsam ein Abschalten der cAMP-Aktivierbarkeit. Es scheint, als wären in CyaB1 GAF B T258 und in geringerem Ausmaß L259 an der Spezifizierung für cAMP beteiligt.

#### 4.4.7 Austausch von TL in CyaB1 GAF B gegen SV aus rPDE2a [AS T258 und L259 aus CyaB1 gegen S419 und V420 aus rPDE2a]

Nach den vorigen Ergebnissen mußte natürlich im Gegenzug der Effekt der SV-Mutation im CyaB1 Holoenzym (ohne EL-EIRIP aus rPDE2a) überprüft werden.



Das gewünschte Konstrukt (SV-CyaB1-Holo) wurde wie üblich exprimiert und gereinigt (3.14.4.5). Die Reinigung des Proteins war mit vorhergehenden Konstrukten vergleichbar. Im Western-Blot zeigte sich bei 0,2  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein/Spur eine einzelne Bande in der erwarteten Höhe (98 kDa). Die  $\text{EC}_{50}$ -Werte lagen für cAMP bei 16,5  $\mu\text{M}$  und für cGMP bei  $\geq 1$  mM. Der Aktivierbarkeitsfaktor für cAMP betrug 43 (Abb. 4.83).

Leider entsprach die Kurve weitgehend dem CyaB1-Holoenzym, cAMP aktiviert immer noch selektiv. Lediglich die  $\text{EC}_{50}$  für die cAMP-Aktivierung verschob sich im Vergleich zum CyaB1-Holoenzym um den Faktor 6-16 nach rechts. ES wurde allerdings nur eine sehr geringe spezifische Aktivität ( $1,38 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  (basal), bzw.  $67,51 \text{ nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  (aktiviert mit 1 mM cAMP)) gemessen. Dies kann ein Indiz für eine mögliche Fehlfaltung und damit nicht optimale Aktivierbarkeit sein.

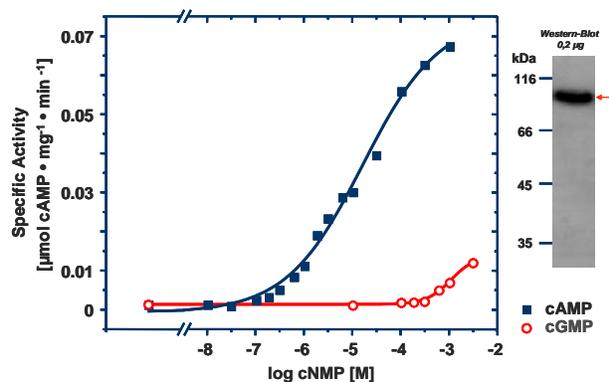


Abb. 4.83: Aktivierbarkeit von SV-CyaB1-Holo (XI) durch cAMP und cGMP.

#### 4.4.8 Austausch AAA in CyaB1 gegen FDG (rPDE2a)

[AS A274 bis A276 aus CyaB1 gegen F433 bis G435 aus rPDE2a]

Nachdem oben ein „Abschalter“ für die cAMP-Bindung in EL-EIRIP-rPDE2a-CyaB1 AC gefunden worden war, wurde versucht, durch gezielte Mutationen im Bereich zwischen EL und EIRIP den „Anschalter“ für cGMP zu finden. Nachdem in PDE2A [25] vor allem F438 und D439 als entscheidend für die cGMP-Spezifität identifiziert worden waren, wurden im Konstrukt CyaB1-FDG-Holo die drei Alanine 274 bis 276 aus CyaB1 GAF B gegen FDG (AS 433 bis 435) ausgetauscht (s. Sequenz XII). Dies geschah in der Absicht, die Bindung von cGMP an die CyaB1 GAF-Domänen zu erhöhen. Das Glycin wurde wegen der besseren Flexibilität mit ausgetauscht, denn das große aromatische Phenylalanin und das saure Aspartat prägen die Struktur wesentlich.



Nach Klonierung (3.14.4.3) wurde das Protein unter Standardbedingungen exprimiert und gereinigt (Westernblot in Abb. 4.84). Im Test zeigte sich keine Veränderung der Nucleotidspezifität, die  $EC_{50}$  für cAMP war jedoch stark nach rechts verschoben ( $56,4 \mu\text{M} \pm 15,5$  ( $n=4$ )) im Vergleich zu 1 bis  $2,6 \mu\text{M}$  bei CyaB1). Die  $EC_{50}$  für cGMP lag bei  $1,1 \text{ mM} \pm 0,27$  ( $n=3$ ) und damit um den Faktor 3-4 höher als bei CyaB1. Die Aktivierbarkeitsfaktoren waren mit  $169,3 \pm 11,2$  ( $n=3$ ) für cAMP und  $84,7 \pm 3,6$  ( $n=3$ ) für cGMP groß. Für ein „Anschalten“ der Stimulierbarkeit der CyaB1 GAF B durch niedrige cGMP-Konzentrationen reicht demnach der Ersatz der drei Alanine durch FDG nicht aus.

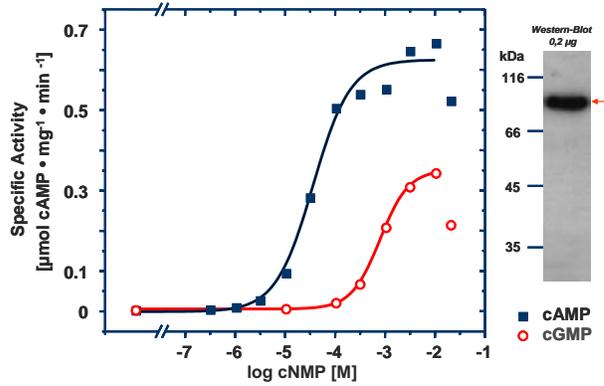


Abb. 4.84: Aktivierbarkeit von CyaB1-FDG-Holo (XII) durch cAMP und cGMP.

#### 4.4.9 Rückmutation von FDG im CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC-Konstrukt zu AAA

[AS W270 bis V273 und A277 bis I283 aus CyaB1 gegen V429 bis V432 und G436 bis Y443 aus rPDE2a]

Nun wurde im umgekehrten Fall versucht, durch Rückmutation von FDG nach AAA die  $EC_{50}$  für cGMP zu erhöhen.

**XIII** **cyaB1**<sup>248</sup> ARILMQADRSTLFLYRKEMGELVAKVAAA GVVDDES-YEIRIP<sup>288</sup>

Das Konstrukt EL-AAA-EIRIP wurde kloniert (3.14.4.2), bei 16°C über Nacht exprimiert und gereinigt. Die Ausbeuten an Protein waren gering. Die  $EC_{50}$  für cAMP war  $0,8 \mu\text{M} \pm 0,4$  ( $n=2$ ) und für cGMP  $14,9 \mu\text{M} \pm 8,7$  ( $n=2$ ). Die Aktivierbarkeitsfaktoren betragen  $8,8 \pm 1,1$  ( $n=4$ ) für cAMP und  $10,5 \pm 1,1$  ( $n=4$ ) für cGMP.

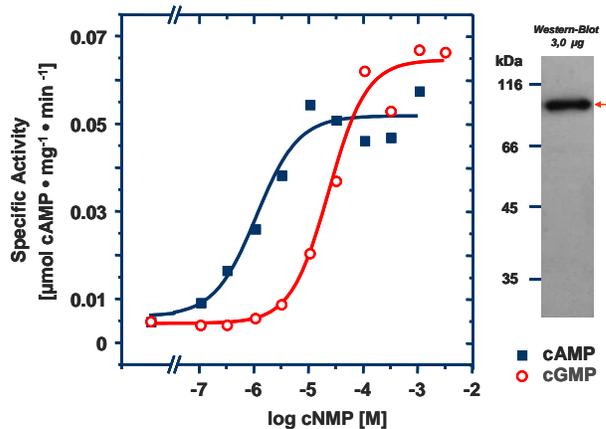


Abb. 4.85: Aktivierbarkeit von CyaB1-[EL-AAA-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (XIII) durch cAMP und cGMP.

Tatsächlich verursachte die Mutation von FDG zu AAA eine gewisse Umkehr der cNMP-Spezifität (Abb. 4.85). Die  $EC_{50}$  für cAMP ist 18,5-fach niedriger als für cGMP. Damit ist zwar nicht die eindeutige Diskriminierung des CyaB1-Holoenzym erreicht, aber im EL-EIRIP-Konstrukt stellen FDG sicherlich ein Spezifitätsmerkmal für die Bindung von cGMP dar.

#### 4.4.10 Austausch weiterer AS zwischen EL und EIRIP im CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC-Konstrukt

Nachdem mit EL-AAA-EIRIP (4.4.9) die Bedeutung von FDG für die cGMP-Bindung in CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC gezeigt wurde, wurden nun weitere AS aus der rPDE2a im Hinblick auf die cGMP-Affinität im EL-EIRIP-Konstrukt untersucht.

- CyaB1-[EL-TQL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC



Bei diesem Konstrukt wurde DDES aus rPDE2a im EL-EIRIP-Konstrukt nach TQL (so in CyaB1 GAF B) mutiert [Austausch der AS W270 bis T279 und I283 aus CyaB1 gegen V429 bis V438 und Y443 aus rPDE2a].

- CyaB1-[EL-VAFD→WTAA-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC



Im EL-EIRIP-Konstrukt erfolgte eine Mutation von VAKVFD aus rPDE2a zu WTKVAA aus CyaB1 GAF B [Austausch der AS A276 bis I283 aus CyaB1 gegen G435 bis Y443 aus rPDE2a].

- CyaB1-[EL-VA→WT-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC



Im EL-EIRIP-Konstrukt wurde VA aus rPDE2a zu WT aus CyaB1 GAF B mutiert [Austausch der AS A274 bis I283 aus CyaB1 gegen F433 bis Y443 aus rPDE2a].

Die Konstrukte wurden kloniert (3.14.4.4, 3.14.4.7), exprimiert und gereinigt auf Aktivierbarkeit durch cNMPs getestet (Abb. 4.86, 4.87 und 4.88).

Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt Tabelle 4.9. Die Hill-Koeffizienten der Konstrukte lagen für beide Nucleotide zwischen 0,84 und 1,42.

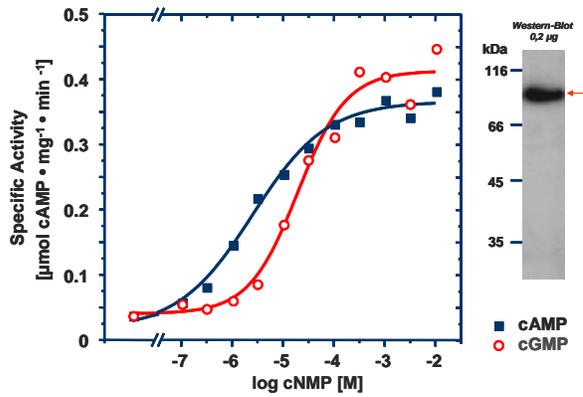


Abb. 4.86: Aktivierbarkeit von CyaB1-[EL-TQL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (XIV) durch cAMP und cGMP.

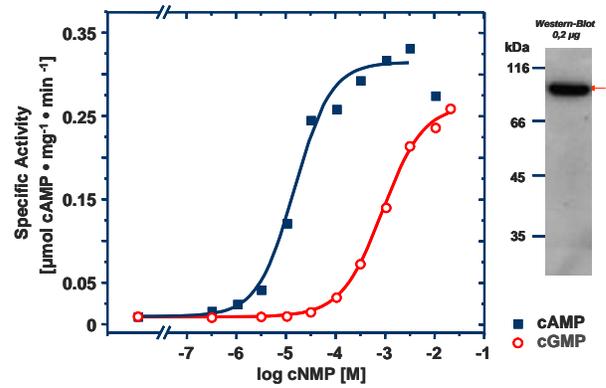


Abb. 4.87: Aktivierbarkeit von CyaB1-[EL-VAFD→WTAA-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (XV) durch cAMP und cGMP.

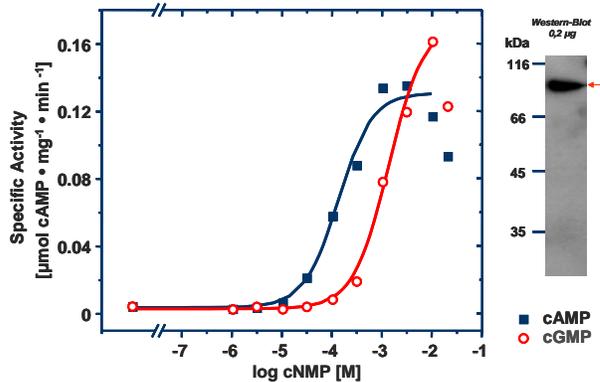


Abb. 4.88: Aktivierbarkeit von CyaB1-[EL-VA→WT-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC (XVI) durch cAMP und cGMP.

Die Mutation von DDES zu TQL (XIV) verursachte eine um den Faktor 5,7 geringere  $EC_{50}$  für cAMP als für cGMP (Tab. 4.9, Abb. 4.86), die Affinität der Bindung von cAMP war mit der von CyaB1 vergleichbar. Der niedrige  $EC_{50}$ -Wert für cGMP wies darauf hin, dass cGMP sehr gut in die cNMP-Bindetasche paßte und DDES aus rPDE2a damit nur eine geringe Bedeutung für die Bindung des cGMPs besitzt.

Die Mutation des Bereiches VAKVFD zu WTKVAA aus CyaB1 GAF B (XV) resultierte in einer 36-fachen Bevorzugung von cAMP gegenüber cGMP. Hier bestätigte sich wiederum die Bedeutung der Aminosäuren Phe und Asp für die Bindung von cGMP im EL-EIRIP-Konstrukt (vgl. 4.4.9). Außerdem zeigte sich, dass nicht einzelne Aminosäuren für die Bindung verantwortlich sind, sondern größere Bereiche, die hydrophobe oder hydrophile Taschen zur Bindung bilden können. Die Bevorzugung von cAMP gegenüber cGMP war hier mit 36-fach schon doppelt so hoch wie im EL-AAA-EIRIP-Konstrukt (XIII) (4.4.9).

Die Verantwortlichkeit ganzer Bereiche für die spezifische Bindung von cAMP oder cGMP zeigt sich auch im EL-VA→WT-EIRIP-Konstrukt (XVI). Hier wurde nur ei-

Konstrukt	EC <sub>50</sub> cAMP [μM]	EC <sub>50</sub> cGMP [μM]	Aktivierbarkeitsfaktor		$\frac{EC_{50} \text{ cAMP}}{EC_{50} \text{ cGMP}}$
			cAMP [×]	cGMP [×]	
CyaB1-[EL-TQL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC	3,2 ± 1,4 (n=3)	18,2 ± 0,8 (n=3)	14,5 ± 3,0 (n=5)	17,1 ± 3,9 (n=5)	0,18
CyaB1-[EL-VAFD→WTAA-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC	23,6 ± 8,9 (n=2)	858 ± 31 (n=2)	38,0 ± 5,1 (n=2)	29,6 ± 3,9 (n=2)	0,03
CyaB1-[EL-VA→WT-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC	295,1 ± 160 (n=2)	1154 ± 226 (n=2)	33,7 ± 4,9 (n=2)	35,1 ± 0,7 (n=2)	0,26

**Tab. 4.9:** Übersicht der Ergebnisse der Konstrukte CyaB1-[EL-TQL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC, CyaB1-[EL-VAFP→WTAA-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC und CyaB1-[EL-VA→WT-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC.

ne 3,9× kleinere EC<sub>50</sub> für cAMP im Vergleich zu cGMP gefunden. Die Mutation von VA zu WT schien allerdings die Nucleotidbindung im EL-EIRIP-Konstrukt als Ganzes zu behindern, der EC<sub>50</sub>-Wert für cAMP lag mehr als 10-fach über dem des EL-VAFD→WTAA-EIRIP-Konstrukts (XV) (Tab. 4.9), was in einer geringeren Diskriminierung zwischen cAMP und cGMP resultierte.

#### 4.4.11 Mutation von Y325 zu Alanin in CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC

[Austausch der AS W270 bis I283 aus CyaB1 gegen V429 bis Y443 aus rPDE2a und Y325A]



Im CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC + Y325A-Konstrukt (XVII) wurde versucht, durch die Mutation Y325A zu Alanin ein *stacking* des aromatischen Ringes mit Adenin bzw. Guanin zu verhindern.

In PDE2A entspricht F490 dem Y325 (s. S. 141) und liegt nahe zum Guanin-Ring. Es ist aber wahrscheinlich mit einem Abstand von ca. 5Å für eine π – π Interaktion zu weit entfernt [1]. Auf der anderen Seite des Guaninrings steht F438 (PDE2A) für ein *Stacking* zur Verfügung [1].

Durch Mutagenese in PDE2A wurde die Bedeutung von F438 für die cGMP-Bindung in PDE2A nachgewiesen [25]. Nachdem im EL-EIRIP-Konstrukt (III) eine Beteiligung von F433 (rPDE2a, entspricht F438 in PDE2A) an der cGMP-Bindung nachgewiesen worden war (4.4.8 und 4.4.9), aber durch die bisherigen Mutationen die cGMP (und cAMP)-Bindung nicht vollständig unterbunden werden konnte, wurde vermutet, dass in der CyaB1 GAF B-Bindungstasche Y325 näher am Purin-Ring liegt und mit ihm wechselwirken könnte. Eine Übersicht über die Lage von Y325 gibt das Alignment 4.70 auf Seite 141.

Die Klonierung (3.14.4.6), erste Expression (16°C, 10 h) mit 25  $\mu\text{M}$  IPTG, Ernte bei  $\text{OD}_{600}$  von 2,41 und Reinigung ergab nur eine minimale Menge des Proteins. Die spezifische Aktivität betrug 31  $\text{nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$  mit 3 mM cGMP. Da auch im Zellpellet keine deutliche Bande des Y325A-Konstruktes (XVII) sichtbar war, wurde nächstens mit 50  $\mu\text{M}$  IPTG induziert (16°C, über Nacht). Am nächsten Morgen betrug die  $\text{OD}_{600}$  4,5. Die Reinigung nach Standardprotokoll (3.7) lieferte größere Mengen an besser gereinigtem Protein, dies zeigte sich auch an den 10-fach höheren spezifischen Aktivitäten. Es schien, als sei eine längere Expressionszeit für die Produktion von CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC + Y325A (XVII) essentiell.

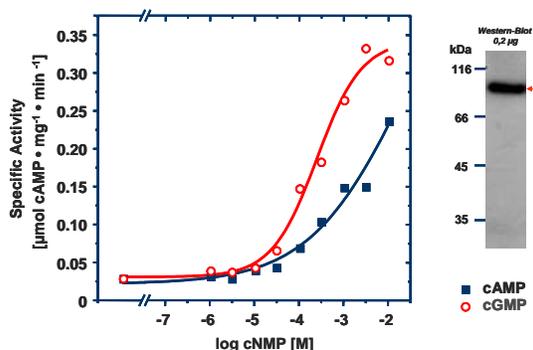


Abb. 4.89: Aktivierbarkeit von CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC + Y325A (XVII) durch cAMP und cGMP.

Die Aktivierungskurven für cAMP und cGMP waren bei CyaB1-[EL-EIRIP-rPDE2a]-CyaB1 AC + Y325A weit nach rechts verschoben (Abb. 4.89), die  $\text{EC}_{50}$ -Werte waren wegen der nicht erreichten Sättigung nicht genau bestimmbar. Es wurden folgende Werte bestimmt:  $\text{EC}_{50}$  für cAMP ca. 7,0 mM  $\pm$  6,6 (n=3), für cGMP 302  $\mu\text{M}$   $\pm$  27,8 (n=3), die Aktivierbarkeitsfaktoren lagen für cAMP bei 6,4  $\pm$  0,9 (n=4) und für cGMP bei 8,5  $\pm$  1,3 (n=4). Somit zeigte dieses Konstrukt eine bevorzugte Bindung von cGMP. cGMP aktivierte allerdings nicht besser als in CyaB1 und sogar 86 $\times$  schlechter als im EL-EIRIP-Konstrukt (III). Die cAMP-Aktivierung ist noch um den Faktor 23 schlechter als die von cGMP.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint Y325 an der Bindung oder Orientierung der Purinringe in der Bindungstasche beteiligt zu sein, vor allem auf die Bindung des Adenins hat Y325A Einfluß.

## 4.5 Einbau von AR-EIRIP, EL-EIRIP und AR-EL aus CyaB1 in GAF B von rPDE2a GAF-CyaB1 AC

Nachdem der Einbau von EL-EIRIP aus rPDE2a GAF B in CyaB1 GAF B ein „Anschalten“ der Aktivierbarkeit durch cGMP (4.4.3) ermöglichte, der Austausch AR-EIRIP aus CyaB1 GAF B gegen den Bereich aus rPDE2a GAF B eine alleinige Stimulation durch cGMP zur Folge hatte (4.4.2) und im Konstrukt CyaB1-[AR-EL-rPDE2a]-CyaB1 AC keine Stimulation durch cAMP und cGMP mehr möglich war (4.4.1), wurde versucht, diese Ergebnisse in der rPDE2a GAF B umzukehren.

T. Kanacher hatte eine funktionstüchtige Chimäre aus CyaB1-N-Terminus (bis F48), rPDE2a-GAF-Domänen (E207-N546) und der CyaB1-PAS und katalytischen Domäne untersucht [14,15]. Diese wurde durch cGMP um den Faktor 10 aktiviert ([15], Seite 111). I.Mansi (persönl. Mitteilung) untersuchte das analoge Konstrukt ohne N-Terminus. Dies war besser exprimier- und reinigbar und zeigte eine höhere spezifische Basalaktivität. Auch die Aktivierbarkeit durch cGMP war mit etwas höher.

Eine Übersicht über die beiden rPDE2a-GAF-CyaB1 AC-Chimären gibt Abb. 4.90.

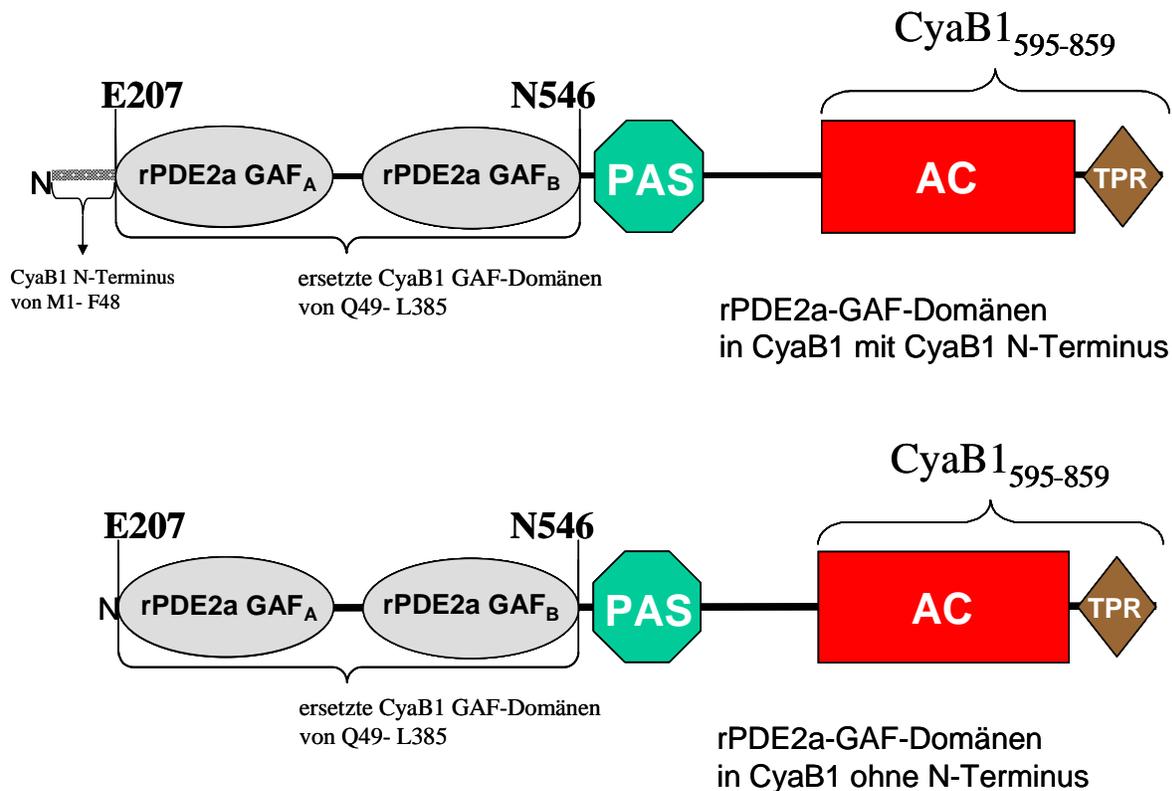
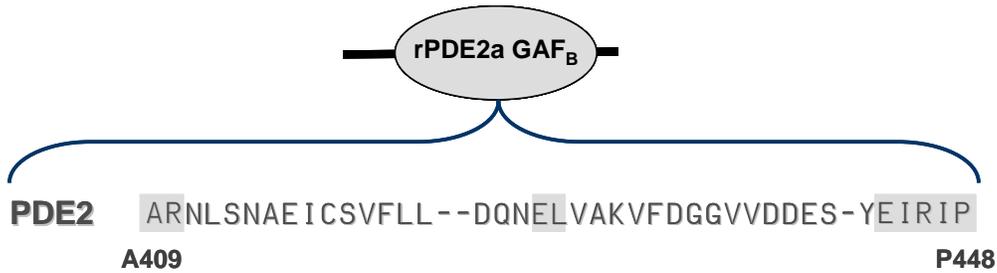


Abb. 4.90: Aufbau der rPDE2a GAF-CyaB1 AC-Chimäre  $\pm$  CyaB1-N-Terminus.

Diese beiden Konstrukte dienen als Ausgangsbasis für die Einführung von AR-EL,

AR-EIRIP und EL-EIRIP aus CyaB1 in die GAF B-Domäne der rPDE2a. Der Bereich AR-EIRIP in rPDE2a GAF B ist hier dargestellt:



Folgende Konstrukte  $\pm$  CyaB1-N-Terminus wurden von Anita Schultz (wie unter 3.14.5 beschrieben) kloniert und exprimiert.

- rPDE2a-GAFs[AR-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC  $\pm$  CyaB1-N-Terminus (XIX, XVIII)

[Austausch der AS N411 bis Y443 aus rPDE2a gegen I250 bis I283 aus CyaB1]



- rPDE2a-GAFs[AR-EL-CyaB1]-CyaB1 AC  $\pm$  CyaB1-N-Terminus (XXI, XX)

[Austausch der AS N411 bis N426 aus rPDE2a gegen I250 bis G267 aus CyaB1]



- rPDE2a-GAFs[EL-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC  $\pm$  CyaB1-N-Terminus (XXIII, XXII)

[Austausch der AS V429 bis Y443 aus rPDE2a gegen W270 bis I283 aus CyaB1]



Die bessere Expression und Reinigbarkeit der Konstrukte ohne CyaB1 N-Terminus zeigte sich auch hier, bei ihnen waren im SDS-Gel eindeutig die den Zielproteinen entsprechenden Banden (Größe 93,4 kDa) erkennbar, auch wenn der Reinigungsgrad

gering war. Im Western-Blot wurde mit *RGS-H<sub>4</sub>*-Antikörper bei 0,2 bis 1 $\mu$ g Protein eine Bande der richtigen Größe detektiert, bei den Verunreinigungen schien es sich demnach nicht um C-terminale Abbruchprodukte zu handeln (Abb. 4.91, 4.92 und 4.93).

Bei den Konstrukten mit CyaB1-N-Terminus hatte es nach der Auswertung des erhaltenen SDS-Gels den Anschein, als ob kein Protein exprimiert worden wäre. Erst der Western-Blot mit 8 bis 10 $\mu$ g Protein zeigte ein Signal der erwarteten Größe (Abb. 4.94, 4.95 und 4.96).

Der AC-Test ergab für die Konstrukte ohne N-Terminus eine basale spezifische Aktivität zwischen 2 und 10  $\text{nmol}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$ . Durch Zusatz von 10 mM cAMP oder cGMP wurde gleichermaßen ein Anstieg der Aktivität bei allen Konstrukten um den Faktor 1,2 bis 1,4 erreicht (Abb. 4.91 für rPDE2a-[AR-EIRIP-CyaB1] (XVIII), Abb. 4.92 für rPDE2a-[AR-EL-CyaB1] (XX) und Abb. 4.93 für rPDE2a-[EL-EIRIP-CyaB1] (XXII)). Bei den Konstrukten mit CyaB1-N-Terminus lag die Basalaktivität nur bei ca. 0,5  $\text{nmol}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$  (was vor allem am schlechten Reinigungsgrad und der hohen Menge an Fremdproteinen in der Lösung lag), allerdings war hier bei allen drei Konstrukten keine Stimulation durch cAMP oder cGMP meßbar. Die spezifischen Aktivitäten stiegen maximal um den Faktor 1,5 (Abb. 4.94 für rPDE2a-[AR-EIRIP-CyaB1] mit CyaB1-N-Terminus (XIX), Abb. 4.95 für rPDE2a-[AR-EL-CyaB1] mit CyaB1-N-Terminus (XXI) und Abb. 4.96 für rPDE2a-[EL-EIRIP-CyaB1] mit CyaB1-N-Terminus (XXIII)).

Der Austausch der Bereiche AR-EIRIP, AR-EL und EL-EIRIP in rPDE2a GAF B durch CyaB1 GAF B verhinderte eine Stimulation der AC. Dies mag zum einen an einer völligen Fehlfaltung der GAF-Domänen durch den Austausch liegen, zum anderen wurde im [rPDE2a-GAF-CyaB1 AC]-Ausgangskonstrukt nur von einer ca. 10-fachen Aktivierung durch cGMP ausgegangen, so dass weitere Veränderungen, die unter anderem mit einem allmählichen Funktionsverlust einhergehen, schnell zu einer nicht mehr detektierbaren Aktivierbarkeitsveränderung führen.

Es zeigte sich, dass untersuchte Spezifizierungsmechanismen einer einzelnen GAF-Domäne nicht unbedingt auf andere GAF-Domänen übertragbar sind und verschiedene GAF-Domänen individuelle Bindungsmechanismen besitzen.

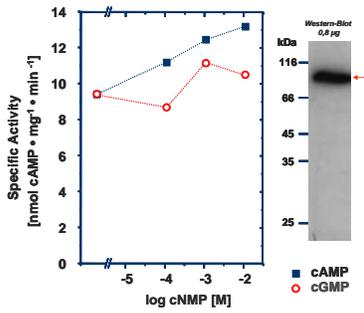


Abb. 4.91: Aktivierbarkeit von rPDE2a GAFs-[AR-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC<sub>ohne N-Term.</sub> (XVIII).

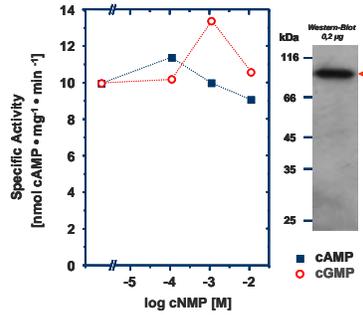


Abb. 4.92: Aktivierbarkeit von rPDE2a GAFs-[AR-EL-CyaB1]-CyaB1 AC<sub>ohne N-Term.</sub> (XX).

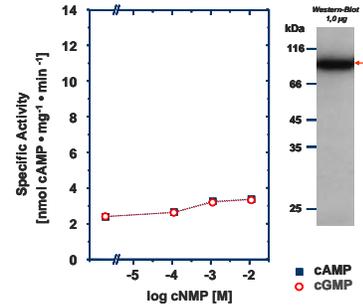


Abb. 4.93: Aktivierbarkeit von rPDE2a GAFs-[EL-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC<sub>ohne N-Term.</sub> (XXII).

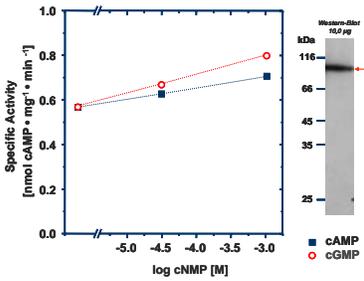


Abb. 4.94: Aktivierbarkeit von rPDE2a GAFs-[AR-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC<sub>mit N-Term.</sub> (XIX).

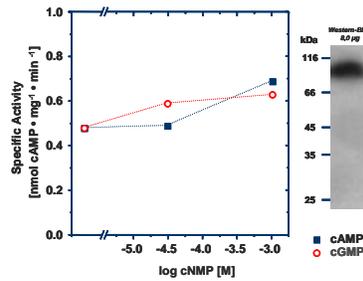


Abb. 4.95: Aktivierbarkeit von rPDE2a GAFs-[AR-EL-CyaB1]-CyaB1 AC<sub>mit N-Term.</sub> (XXI).

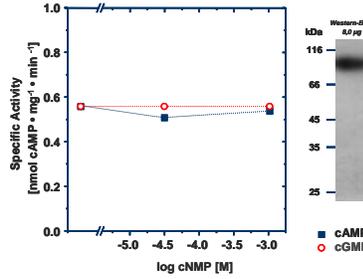


Abb. 4.96: Aktivierbarkeit von rPDE2a GAFs-[EL-EIRIP-CyaB1]-CyaB1 AC<sub>mit N-Term.</sub> (XXIII).

# 5 Diskussion

## 5.1 Die GAF-Domänen der CyaB2 kristallisieren als antiparalleles Dimer

Die antiparallele Dimerisierung der GAF A und GAF B-Domäne der CyaB2 steht in völligem Gegensatz zur Kristallstruktur der PDE2A, in der GAF A und B als paralleles Dimer vorliegen (Abb. 4.1, Seite 90). Bei PDE2A stellt die GAF A-Domäne die Dimerisierungsuntereinheit dar, während die GAF B-Domänen keinen Kontakt miteinander haben. Nur GAF B bindet cGMP [1]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen bei PDE6- und möglicherweise auch PDE5 ebenfalls parallele GAF-Dimere vermuten, allerdings beträgt die Auflösung nur 28 Å [105, 112, 113]. Vielleicht gibt es mehr als eine Art der Dimerisierung für GAF-Domänen.

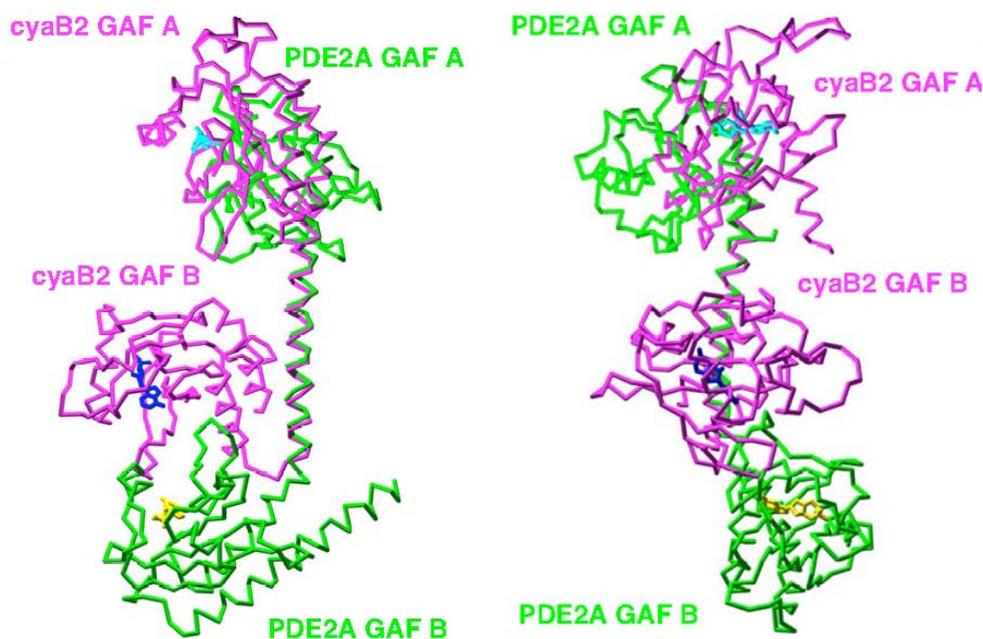
Legt man die GAF A und B verbindenden Helices aus CyaB2 (AS 231-263) und PDE2A (AS 367-398) übereinander, ähneln sich zwar die Helices, die GAF-Domänen haben jedoch eine andere räumliche Ausrichtung (Abb. 5.1). Die GAF B-Domäne der CyaB2 liegt viel näher an der Verbindungshelix als dies in PDE2A der Fall ist. Die Ursache dafür sind die Linker-Reste 399-402 in PDE2A, diese zeigen eine andere Anordnung als die entsprechenden AS 268 bis 271 in CyaB2.

Nachdem von T. Kanacher nachgewiesen wurde, dass die katalytische Domäne der CyaB1 nur als Dimer aktiv ist [14, 15], ergibt eine antiparallele Anordnung der GAF-Domänen in CyaB2 (und CyaB1) Sinn. Bei dieser Anordnung wäre eine Dimerisierung des sich nach GAF B und PAS-Domäne anschließenden katalytischen Zentrums unterhalb des GAF-Dimers vermutlich leichter möglich als in PDE2A.

In PDE2A (und anderen PDEn) folgt der GAF B-Domäne nach einem kurzen Linker direkt das katalytische Zentrum [3, 43]. Da die GAF B-Domänen in PDE2A einen Abstand von ca. 65 Å [1, 105] aufweisen, könnte ein Zusammenfinden der katalytischen Domänen der PDE2A erschwert sein. Nachdem die katalytischen Domänen der PDEn jedoch auch als Monomere aktiv sind, muss dies bei der Hydrolyse von cNMP zu NMP keine nachteiligen Effekte besitzen.

Da der Austausch der CyaB1 GAF-Domänen durch die GAF-Domänen der rPDE2a (und die der PDE5 [4.3.1.2]) zu einer funktionsfähigen, cGMP aktivierbaren Chimäre führte [14, 15], bei der aufgrund der AC-Aktivität eine Dimerisierung des katalytischen Zentrums erfolgreich abgelaufen sein mußte, stellt sich die Frage, wie das bei den gefundenen Strukturunterschieden der GAF-Domänen möglich ist. Es sind mehrere Lösungsansätze denkbar.

Zum einen kann es sich bei einer oder beiden Kristallstrukturen um ein Kristalli-



**Abb. 5.1:** Vergleich der verschiedenen Anordnungen der GAF B-Domäne in CyaB2 und PDE2A, [aus Zusatzinformation zu 105].

sationsartefakt handeln. In diesem Falle würde in Lösung eine andere Anordnung der GAF Domänen zum katalytischem Zentrum vorliegen, was das Funktionieren der rPDE2a GAF-CyaB1 AC-Chimäre erklären würde. Desweiteren wäre eine größere Flexibilität einzelner Bereiche (vor allem am Ende der GAF B-Domäne) in Lösung denkbar, was die Dimerisierung der katalytischen Bereiche ermöglicht. Wenn durch Bindung der cyclischen Nucleotide sowohl bei der parallelen als auch bei der antiparallelen Anordnung eine gleichartige Bewegung der C-Termini erfolgt, würde es für die Aktivierung der katalytischen Domäne keine Rolle spielen, welche Orientierung das GAF-Dimer besitzt [105]. Sowohl bei einer parallelen als auch bei einer antiparallelen Anordnung der GAF-Domänen kann ein direkter, wenn auch unterschiedlicher Kontakt zwischen der katalytischen und den GAF-Domänen bestehen.

Da sich im rPDE2a-CyaB1 AC-Konstrukt noch ein ca. 180 ASn langer und vermutlich flexibler Bereich zwischen den GAF-Domänen und dem katalytischen Zentrum befindet, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass diese Domäne den Abstand der PDE2 GAF-B-Domänen ausgleicht und die katalytischen Bereiche zusammenführt. Ein solches Konstrukt dürfte demnach mit einem PDE-Linker statt der PAS-Domäne und dem CyaB1-Linker nicht mehr funktionsfähig sein.

I.Mansi zeigte, dass im CyaB1 Holoenzym eine Stimulation durch cAMP ohne PAS-Domäne und stattdessen mit verschieden langen Linkern der PDE5 nicht mehr möglich

ist (persönliche Mitteilung). Damit kann davon ausgegangen werden, dass die PAS-Domäne bei der Aktivierung durch cAMP im CyaB1 Holoenzym bzw. auch bei der Aktivierung durch cGMP in Chimären eine wichtige Rolle spielt und über sie möglicherweise eine parallele oder antiparallele Anordnung der GAF-Domänen ausgeglichen wird.

Eine weitere Überlegung betrifft den Einfluß des N-Terminus auf die Struktur bzw. Funktion der GAF-Domänen. Beim CyaB2-Kristallisationskonstrukt wurden N-terminal 57 AS abgeschnitten. Der im Kristall sichtbare verbleibende N-terminale Rest vor GAF A bildet eine  $\alpha$ -Helix. Diese kreuzt die Verbindungshelix zwischen GAF A und GAF B und zeigt auf die GAF A'-Domäne des anderen Monomers (vgl. Abb. 4.1, Seite 90). Ob die fehlenden 57 AS im Holoenzym eine Wechselwirkung eingehen, bleibt ungeklärt. Im Kristall der PDE2A GAF-Domänen fehlen 206 N-terminale AS [1]. Die Funktion dieses N-Terminus ist, wie auch sein Einfluß auf die Anordnung von GAF-Domänen und katalytischem Zentrum, unbekannt. Nachdem Untersuchungen mit dem N-Terminus der PDE5 einen hemmenden Effekt auf die Aktivierung durch cGMP gezeigt haben, scheint eine Wechselwirkung zwischen N-Terminus und GAF-Domänen auch für PDE2 wahrscheinlich. Unveröffentlichte Untersuchungen von I. Mansi mit rPDE2a-GAF-CyaB1 AC unterstützen diese Annahme.

Zur Klärung dieser Fragen sind Kristallstrukturen mit kompletten N-Termini bzw. optimalerweise sogar mit der katalytischen Domäne erforderlich.

## 5.2 In CyaB2 erfolgt die cAMP-Bindung und Aktivierung der AC über beide GAF-Domänen

### 5.2.1 cAMP-Bindung an die CyaB2 GAF-Domänen

In der Kristallstruktur der CyaB2-GAF-Domänen [105] war cAMP sowohl in GAF A als auch GAF B gebunden (vgl. Abb. 4.1, Seite 90 und Abb. 4.2, Seite 91). Dies steht im Gegensatz zur PDE2A, bei der eine Bindung von cGMP nur in GAF B gefunden wurde. Der Aufbau der cNMP-Bindungstaschen in CyaB2 GAF A und B und PDE2A GAF B ist ähnlich. Bei genauerer Betrachtung fallen drei Unterschiede auf.

Erstens wurde bei PDE2A der Phosphodiesterriß in der Boot-Konformation dargestellt. Bei einer Auflösung von 2,9 Å konnte die richtige Konformation eigentlich nicht erkannt werden, aufgrund einer möglichen negativen Abstoßung durch E512 in der Sesselkonformation wurde der Boot-Konformation der Vorzug gegeben [1, 105]. In CyaB2 GAF A und B ist E512 durch Q196 bzw. Q383 ersetzt, was eine negative Abstoßung an dieser Stelle unmöglich macht. Die Phosphodiesterriße in GAF A und B der CyaB2 liegen deshalb in der stabileren Sesselkonformation vor (dies war bei der Auflösung von 1,9 Å sichtbar).

Den zweiten Unterschied zwischen den Bindungstaschen von PDE2A und CyaB2 GAF stellt die  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleife dar. Dieser Bereich könnte für die Ligandenbindung und möglicherweise für die Selektivität für cAMP/cGMP wichtig sein (vgl. Abb. 4.4, Seite 93).

In PDE2A GAF B enthält diese Schleife die AS F438 und D439, die ein  $\pi$ - $\pi$ -„Stacking“ mit dem Guaninring eingehen bzw. H-Brücken zum N1-Atom ausbilden [1, 105]. Die Beteiligung dieser AS am Spezifitätsfilter wurde durch Bindungsstudien von Wu et al. [25] bzw. innerhalb dieser Arbeit durch Aktivierung von CyaB1 mit eingesetzten Bereichen der rPDE2a (4.4, v.a. 4.4.9, Seite 152) bestätigt.

Legt man die  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleifen aus PDE2A und CyaB2 übereinander (Abb. 4.4, Seite 93), zeigt sich hier eine große Flexibilität. Auch ein Sequenzvergleich verschiedener cAMP bzw. cGMP-bindender GAF-Domänen (alignment 4.6, Seite 95) bestätigt, dass dieser Bereich innerhalb der GAF-Domänen die größte Längen- und Sequenzvariabilität zeigt. Damit könnte er eine Rolle für die Ligandenspezifität besitzen. Dagegen spricht allerdings, dass er auch unter cGMP-bindenden oder unter cAMP-bindenden GAF-Domänen sehr verschieden ist.

Der dritte Unterschied zwischen den Bindungsstellen in PDE2A und CyaB2 liegt in R291 in GAF B bzw. R103 in GAF A begründet. Diese beiden AS gehen in CyaB2 in einem Abstand von 3,2 bis 3,3 Å eine Wechselwirkung mit dem N1 des cAMPs ein. Von den sieben bis acht Wechselwirkungen zwischen AS-Seitenketten und cAMP in den Bindungstaschen von CyaB2 sind nur vier polar (in der GAF B sind dies R291, T293, T363 und Q383 (Abb. 4.6)). Die drei letztgenannten bilden Wasserstoffbrücken aus, die sowohl mit cAMP als auch mit cGMP möglich sind. Damit wird die Bedeutung von R291 und dessen Wasserstoffbrücke zum N1 des cAMPs klar [105]. Nachdem dieses Arginin gemäß seiner Lage in der Bindungstasche keine H-Brücke zum protonierten N1 des cGMPs ausbilden würde, könnte es ein Selektivitätsmerkmal für cAMP darstellen.

Es scheint allerdings kein universelles Merkmal für eine cAMP-Bindung zu sein, denn an den entsprechenden Stellen der PDE5 und PDE6C GAF A befindet sich ebenfalls ein Arginin, obwohl diese GAF-Domänen hochspezifisch cGMP binden [23, 31]. Die Mutation des entsprechenden R174 zum Methionin in der Rinder-PDE5 GAF A reduzierte sogar die Bindung von cGMP drastisch. R174K verringerte die Affinität kaum, so dass bei PDE5 eine positive Ladung an dieser Stelle für die Bindung des cGMPs wichtig scheint [2]. Dass T293 in CyaB2 GAF B sowohl für cAMP und cGMP spezifiziert, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durch Mutagenesestudien bestätigt. Gerade der Austausch des in CyaB1 und CyaB2 GAF B konservierten TL (in CyaB2 GAF B Position 293 und 294, Alignment 4.6) gegen das in PDE2 GAF B vorkommende SV (der Serinrest ist auch in PDE 5A und 6C konserviert) reduzierte die Aktivierung durch cAMP in der EL-EIRIP-rPDE2a-CyaB1 AC-Chimäre dramatisch (4.4.6, Seite 148 und 5.4). Damit wäre eine Spezifizierung für cAMP durch T293 denkbar. Nachdem aber ein Konstrukt des CyaB1 Holoenzym mit nur SV (AS 419/420) aus rPDE2a eine unveränderte Bevorzugung von cAMP zeigte (Abb. 4.83, Seite 151) und auch bei der cAMP spezifischen Trypanosomen-PDE2B ein Serinrest an der Position von T293 sitzt [32], kann diese Aminosäure ebenfalls nicht das alleinige Spezifitätsmerkmal für eine selektive Bindung von cAMP oder cGMP darstellen.

Die Ergebnisse zeigen damit, dass nicht einzelne Aminosäuren die Spezifität für ein Nucleotid festlegen, sondern dass mehrere Aminosäuren oder sogar ganze Bereiche beteiligt sind.

Die Kristallstruktur der *CyaB2* GAF-Domänen zeigt, dass cAMP in der gebundenen Form fast vollständig von der Bindungstasche eingeschlossen ist. Um eine Bindung zu ermöglichen ist jedoch eine Öffnung der Tasche nötig. Der Selektivitätsfilter für cAMP oder cGMP könnte demnach in der „offenen“ ligandenfreien Form des GAF-Tandems wirken und für uns nicht erkennbar sein.

## 5.2.2 Strukturelle Bedeutung des konservierten NKFDE-Motivs in den *CyaB2* GAF-Domänen

Sowohl in cAMP- bzw. cGMP-bindenden GAF-Domänen von PDEn als auch in cAMP-bindenden GAF-Domänen von ACn findet sich ein konserviertes *NKFDE*-Motiv. Deshalb wurde lange eine Beteiligung an der cNMP-Bindung vermutet. Verschiedene Mutationen dieses Motivs (vor allem Asp zu Ala) zeigten eine Erhöhung der  $EC_{50}$ -Werte für die cNMP-Bindung (so gezeigt für PDE5 [2, 27, 28, 30, 31]) oder verhinderten die Bindung des cyclischen Nucleotids völlig (so in einer PDE6-GAF-PDE5-Chimäre [26], in PDE2A [25] und in *CyaB1* [14, 15]). Betrachtet man die Kristallstrukturen von PDE2A GAF B [1] und beider *CyaB2* GAF-Domänen [105], so liegt das NKFDE-Motiv in allen drei Fällen außerhalb der Bindungstasche. Es ist damit weder an der Bindung noch an der Diskriminierung der cyclischen Nucleotide direkt beteiligt. Nachdem die genannten Studien aber eine Beteiligung dieses Motivs bei der cNMP-Bindung bestätigen, muß es einen indirekten Einfluß auf die Bindung besitzen.

Vergleicht man die Kristallstrukturen von *CyaB2* GAF A und B und PDE2A GAF B [1, 105], so zeigt sich, dass die Salzbrücke zwischen konserviertem Lys und Asp, die Abstände der NKFDE-Motiv-Aminosäuren und einige Wasserstoffbrücken in allen drei Strukturen konserviert sind (Abb. 4.5, Seite 94 und 4.8, Seite 98). Aus diesen Strukturähnlichkeiten läßt sich eine generelle Aufgabe des NKFDE-Motivs ableiten. Seine Funktion besteht darin, die  $\alpha$ 4-Helix und den  $\alpha$ 4- $\beta$ 5-Linker, die beide über dem gebundenen cAMP zusammenklappen, in der richtigen Orientierung zu einer Einheit aus  $\beta$ -Faltblatt,  $\alpha$ 2- und  $\alpha$ 5-Helix zu halten. Diese Wechselwirkungen sind vermutlich für die richtige Orientierung der  $\alpha$ 4-Helix über gebundenem cNMP essentiell. Damit würde das NKFDE-Motiv über H-Brücken die Bindungstasche in der Konformation mit gebundenem cNMP stabilisieren.

Die *CyaB2* GAF-Domänen enthalten zwischen konserviertem K und F im NKFDE-Motiv einen 14 (GAF A) bzw. 19 AS (GAF B) langen Einschub, der in der PDE2A nicht vorkommt (vgl. Abb. 4.7, Seite 97). Sie bilden zusätzliche Schleifen aus, die jedoch nicht die Lage der NKFDE-Aminosäuren beeinflussen (Abb. 4.8, Seite 98). Allein aus der Kristallstruktur der *CyaB2* GAF-Domänen läßt sich die Funktion dieser Einschübe nicht erklären. Erst durch Mutagenesestudien konnte ihre Funktion geklärt werden (5.2.3).

### 5.2.3 Aktivierung der Adenylatcyclase durch Bindung von cAMP an beide CyaB2 GAF-Domänen

Nachdem das CyaB2 Holoenzym instabil, schlecht exprimier- und reinigbar war (Versuche von H. Rague und J. Linder), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Chimäre aus den GAF-Domänen der CyaB2 und dem katalytischen Zentrum der gut untersuchten CyaB1 [14, 15] kloniert und die Eigenschaften der GAF-Domänen untersucht. Wie erhofft, ließ sich dieses Konstrukt besser exprimieren und reinigen als das CyaB2 Holoenzym. Der Austausch der GAF-Domänen der CyaB1 gegen die der CyaB2 war möglich und lieferte eine spezifisch durch cAMP stimulierbare AC. Nachdem ein Austausch der GAF-Domänen der CyaB1 durch die evolutionär zwei Milliarden Jahre entfernten GAF-Domänen der rPDE2a und PDE5 erfolgreich war, erstaunte diese Austauschbarkeit innerhalb desselben Organismus nicht weiter. Der  $EC_{50}$ -Wert für cAMP lag mit  $1,3 \mu\text{M}$  im Bereich des CyaB1 Holoenzym [14, 15]. Der größte Unterschied zur CyaB1 war der von 0,7 (CyaB1) auf 2,2 (CyaB2 GAF-CyaB1 AC) gestiegene Hill-Koeffizient. Die dadurch angezeigte positive Kooperativität der GAF-Domänen deckt sich mit der CyaB2-Kristallstruktur, bei der cAMP an GAF A und GAF B gebunden hatte. Aufgrund dessen kam die Vermutung auf, dass beide GAF-Domänen für eine volle Aktivierung der AC nötig sein könnten.

Der Versuch durch Mutation des konservierten Aspartats zum Alanin im NKFDE-Motiv herauszufinden, welche der beiden GAF-Domänen in CyaB2 signalisiert, schlug fehl. Die Mutanten D224A, D416A und die Doppelmutante D224A/D416A wiesen gegenüber dem Ausgangskonstrukt sogar eine leicht erhöhte Affinität zu cAMP auf. Hier zeigt sich, dass die konservierten Aspartate funktionell nicht nötig sind, auch wenn sie im Kristall eine stabilisierende Salzbrücke ausbildeten [105]. Die gefundene geringfügige Verringerung der Kooperativität bestätigt weiterhin die Vermutung, dass beide GAF-Domänen erforderlich sind. Diese Ergebnisse stehen in völligem Gegensatz zu den Ergebnissen der D/A-Mutanten in PDE2A [25], PDE5 [27, 30] und CyaB1 [14, 15].

Die fehlende Salzbrücke zwischen Lys und Asp wurde im Falle der CyaB2 funktionell durch die eingeschobenen Schleifen ersetzt. Diese Ausbuchtungen liegen nahe am  $\alpha$ 4-helicalen Rand der Bindungstasche, vor allem in GAF B. Wie Abb. 4.8 (S. 98) zeigt, gibt es einige Kontakte zwischen AS des Einschubs und dem  $\alpha$ 4- $\beta$ 5-Linker, der die  $\alpha$ 4-Helix mit dem  $\beta$ -Faltblatt oder einer Einheit bestehend aus  $\beta$ -Faltblatt und den Helices  $\alpha$ 2 und  $\alpha$ 5 verbindet. Die Einschübe stabilisieren die Lage und Orientierung der  $\alpha$ 4-Helix und die wichtigen AS T176 und T363 innerhalb der cAMP-Bindungstasche in der Art, dass die ansonsten essentielle Lysin-Aspartat-Salzbrücke entbehrlich wird.

Dies zeigten die Untersuchungen mit einer auf die Länge der PDE2A verkürzten CyaB2 GAFverk.-CyaB1 AC-Chimäre. Die Affinität zu cAMP entsprach der unverkürzten Chimäre. Da die Salzbrücke zwischen Lys und Asp hier noch funktionsfähig sein sollte, war dies das erwartete Ergebnis.

Der Unterschied zum Ausgangskonstrukt lag in einer Verringerung des Aktivierbarkeitsfaktors und im Verlust der Kooperativität. Der Hill-Koeffizient betrug nur noch

0,7. Damit besaß das CyaB2 GAFverk.-CyaB1 AC-Konstrukt einen HillKoeffizienten wie CyaB1 (Hill-Koeffizient = 0,7), rPDE2a GAF-CyaB1 AC (0,9) oder PDE5 GAF-CyaB1 AC (0,75) (eigene Messungen und [107]). Damit sind die Einschübe von 14 bzw. 19 AS in den CyaB2 GAF-Domänen bei intakter Salzbrücke nicht für die Aktivierung sondern für die Vermittlung der positiven Kooperativität zwischen beiden GAF-Domänen bei cAMP-Bindung verantwortlich.

Mutationen von Asp zu Ala hatten im verkürzten CyaB2 GAF-CyaB1 AC-Konstrukt ganz andere Auswirkungen als in der unverkürzten Chimäre. In GAF A blieb eine hohe Affinität zu cAMP erhalten, allerdings sank der Aktivierbarkeitsfaktor. In GAF B war der Effekt genau umgekehrt. Damit zeigte sich für die einzelnen D/A-Mutanten in den verkürzten GAF A bzw. GAF B-Domänen ein unterschiedliches Verhalten. In beiden Mutanten blieb die Signalübertragung zwischen GAF-Domänen und katalytischer Domäne funktionell erhalten. Damit bestärkten die Ergebnisse, dass in CyaB2 beide GAF-Domänen nicht nur cAMP binden (wie in der Kristallstruktur sichtbar), sondern auch an der Aktivierung der AC beteiligt sind. Erst wenn beide Aspartate zu Alanin mutiert wurden, verlor die verkürzte Mutante ihre Aktivierbarkeit durch cAMP und der  $EC_{50}$ -Wert für cAMP stieg mehr als 400-fach an. Die verbleibende 6-fache Aktivierbarkeit zeigt, dass die Chimäre prinzipiell funktionsfähig ist. Sie kann jedoch nicht mehr vollständig durch cAMP aktiviert werden, da beide Bindungsstellen durch die eingeführten D/A-Mutationen und die Verkürzung nur noch eine minimale cAMP-Affinität aufweisen. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Untersuchungen von D/A-Mutanten im NKFDE-Motiv von PDE2A, 5, 6 und CyaB1. Es paßt vor allem zur CyaB2 Kristallstruktur, in der alle vier potentiell cAMP-bindenden Stellen mit cAMP besetzt sind, während in der PDE2A-Struktur nur zwei cGMP-Moleküle an die beiden GAF B-Domänen des Tandems gebunden haben. Die verbleibende Aktivierung der Chimäre zeigte auch in diesem Falle keine positive Kooperativität.

Nimmt man alle Daten zusammen, scheinen die Einschübe in den CyaB2 GAF-Domänen zwei Funktionen zu besitzen. Zum einen stabilisieren sie die cAMP-Bindungs-tasche und machen damit die K/D-Salzbrücke entbehrlich. Zweitens ermöglichen sie eine cAMP vermittelte positiv-kooperative Aktivierung der Adenylatcyclase. Wenn GAF A und GAF B zusammen aktiviert werden, führt dies zu sehr hohen Aktivierungsfaktoren. Möglicherweise existiert zwischen der GAF A und der GAF B-Domäne eines jeden Monomers im Kristall eine Salzbrücke (zwischen E112 und K336 [105]). Diese Salzbrücke könnte die Kooperativität ermöglichen oder verstärken. Die Entfernung der Einschübe hatte den Verlust jeglicher Kooperativität zur Folge. Dies paßt zu den in folgenden Versuchen erhaltenen Daten mit CyaB1, rPDE2a und PDE5 GAF-Domänen. In verkürzten Konstrukten sank auch der Aktivierbarkeitsfaktor auf höchstens 100-fach (vorher immer größer 400-fach). Es scheint, dass jede GAF-Domäne zu einer isolierten Aktivierung der AC fähig ist, jedoch mit unterschiedlichen Affinitäten und in unterschiedlichem Ausmaß. Erst wenn beide Aspartate zum Alanin mutiert werden, verliert die verkürzte Mutante ihre Hauptaktivierbarkeit.

Betrachtet man die Sequenzähnlichkeiten zwischen einzelnen GAF-Domänen aus Säuger-PDEn und cyanobakteriellen Adenylatcyclasen, so ist die tandemartige An-

ordnung der GAF-Domänen wahrscheinlich die Folge einer Gen-Duplikationen. Möglicherweise wurde eine einzelne, signalisierende GAF-Domäne verdoppelt, was zu einem Tandem aus zwei gleichermaßen signalisierenden GAF-Domänen führte. Dies erlaubt nun umgekehrt die Ausbildung einer positiven Kooperativität, was bei einer derartigen regulatorischen Einheit eine sehr starke Antwort schon auf kleinste Änderungen in der Ligandenkonzentration zur Folge hat.

Im Lauf der Zeit entwickelten sich diese Tandem-GAF-Domänen durch Mutationen weiter, mit dem Ergebnis, dass in manchen Fällen nur noch eine der beiden GAF-Domänen signalisiert, wie dies in den GAF-Domänen von PDE2A [1, 25] und wahrscheinlich PDE5 [24, 27] zu sein scheint.

Damit besteht die Möglichkeit, dass die zweite GAF-Domäne neue Funktionen wie z.B. die Dimerisierung oder die Bindung an andere Moleküle übernimmt. In einem solchen evolutionären Prozess sind mehrere funktionelle Zwischenprodukte zu erwarten. Bei den *CyaB2*-GAF-Domänen scheint es sich um ein derartiges evolutionäres Zwischenstadium zu handeln, in dem noch beide GAF-Domänen an der allosterischen Aktivierung durch cAMP beteiligt sind.

## 5.3 Untersuchung der PDE5 GAF-CyaB1 AC-Chimären

### 5.3.1 PDE5 GAF-CyaB1 AC wird durch cGMP aktiviert

In CyaB1 erfolgt die Aktivierung der AC durch cAMP via GAF B [14, 15]. Auch bei einer cGMP-stimulierbaren Chimäre aus rPDE2a GAF-Domänen und CyaB1 AC erfolgte die Aktivierung durch die näher am katalytischen Zentrum gelegene GAF B-Domäne. In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften einer Chimäre aus PDE5 GAF-Domänen und CyaB1 AC untersucht. Für das PDE5 Holoenzym ist eine Aktivierung durch cGMP via GAF A nachgewiesen [24]. Da die PDE5-CyaB1 AC-Chimäre voll funktionsfähig und durch cGMP stimulierbar war, zeigte sich, dass das Aktivierungssignal auch über „eine größere Distanz“ zwischen regulatorischer und katalytischer Domäne übertragen werden kann. Die Austauschbarkeit der GAF-Domänen von CyaB1, CyaB2, rPDE2a und PDE5 unter vollem Funktionserhalt zeigt, dass einzelne GAF-Domänen nicht über spezifische, von individuellen Aminosäuren abhängenden Wechselwirkungen aktivieren, sondern dass eine GAF-typische Konformationsänderung das katalytische Zentrum aktiviert. Zumindest für die bisher untersuchten GAF-Domänen aus CyaB1, CyaB2, rPDE2a und PDE5 kann ein ähnlicher oder identischer Bindemechanismus postuliert werden. Dass dieser nicht auf Konformationsänderungen eines kleinen Bereichs beruhen kann, zeigt sich in der Tatsache, dass in CyaB1 und PDE2 GAF B [1, 14, 15, 25], in PDE5 GAF A [24, 27] und in CyaB2 beide GAF-Domänen [105, 107] das jeweilige cyclische Nucleotid binden und so die AC stimulieren. Die Anlagerung des cyclischen Nucleotids an eine Bindungstasche an einer beliebigen Stelle im GAF-Tandems muß jedoch immer die gleiche Konformationsänderung zur Folge haben, ansonsten stiege nicht die Aktivität der AC. Die antiparallele Dimerisierung der CyaB2 GAF-Domänen [105] steht im Gegensatz zur parallelen Struktur in PDE2A [1]. Da CyaB2 GAF-CyaB1 AC wie auch rPDE2a GAF-CyaB1 AC durch cyclische Nucleotide stimulierbar sind, muss ein gleichartiger Aktivierungsmechanismus vorliegen. Eine solcher könnte eine Bewegung der katalytischen Domänen aufeinander zu zur Folge haben, so dass eine bessere Dimerisierung der katalytischen Zentren zu einer höheren Aktivität führt. Weitere denkbare Möglichkeiten wurden bereits unter 5.1 diskutiert.

Der Austausch der CyaB1 GAF-Domänen durch die der PDE5 veränderte Eigenschaften wie pH-Optimum, Temperaturoptimum oder Kinetik der katalytischen Domäne der CyaB1 kaum. Wurden jedoch Bindungs- bzw. Aktivierungseigenschaften der GAF-Domänen im Vergleich zum Verhalten der GAF-Domänen in isolierten GAF-Konstrukten und im PDE5 Holoenzym untersucht, ergaben sich in Bezug auf die Bindung und  $k_{on}/k_{off}$ -Werte Unterschiede.

Einen Überblick über bisher durchgeführte Untersuchungen mit PDE5 GAF-Domänen liefert Tab. 5.1.

Die in den tabellierten Untersuchungen gefundenen  $k_d$ -Werte für die cGMP-Bindung stammen aus Bindungsstudien. Nachdem cGMP sowohl Substrat im katalytischen Zentrum der PDE5 als auch allosterischer Aktivator an den GAF-Domänen ist, wird eine

Studie von	AS von bis	Affinität für cGMP im Bindungstest $K_d$ [nM]	Expressionszellen/Gewebe	$k_{off} / t_{1/2}$	phosphoryliert [+/-]
[2]	bGAF A: 147 - 321	650	<i>E. coli</i>	n.b.	-
[2]	bGAF B: 332 - 512	k.B.	<i>E. coli</i>	n.b.	-
[31]	hGAF A+B: 134 - 583	27	<i>E. coli</i>	$k_{off}^2=0,34 \text{ h}^{-1}$	-
[34]	hGAF A: 1 - 403; 1 - 321; 46 - 403	45 35 28	<i>Sf9</i>	$t_{1/2}^1=110 \text{ min}$ $t_{1/2}^2=530 \text{ min}$	-
[34]	hGAF A+B: 1 - 539; 46 - 539	120 110	<i>Sf9</i>	$t_{1/2}^1=42 \text{ min}$ $t_{1/2}^2=439 \text{ min}$	-
[34]	hHolo: 1 - 875	200	<i>Sf9</i>	$t_{1/2}^1=39 \text{ min}$ $t_{1/2}^2=465 \text{ min}$	-
[40]	hGAF A: 156 - 394	330	<i>E. coli</i>	$t_{1/2}=116 \text{ min}$	-
[40]	hGAF A+B: 36 - 529	1,9 $\mu\text{M}$	<i>E. coli</i>	$t_{1/2}=29 \text{ min}$	-
[28]	bHolo: 1 - 865	1,3 $\mu\text{M}$	<i>Sf9</i> / <i>High Five</i>	n.b.	-
[35]	hGAF A+B: 46 - 539	10	<i>E. coli</i>	$t_{1/2}^2=339 \text{ min}$	+
[35]	hGAF A+B: 46 - 539	98	<i>E. coli</i>	$t_{1/2}^1=39 \text{ min}$ $t_{1/2}^2=465 \text{ min}$	-
[35]	hHolo: 1 - 875	106	<i>E. coli</i>	n.b.	-
[33]	bHolo: 1 - 865	30	Lunge / <i>Sf9</i>	n.b.	+
[33]	bHolo: 1 - 865	130	Lunge / <i>Sf9</i>	n.b.	-
[114]	bHolo: 1 - 865	200	Rinderlunge	langsam	-
[27]	bHolo: 1 - 865	1,8 $\mu\text{M}$	<i>COS 7</i> / Rinderlunge	$k_{off}^1=1,00 \text{ h}^{-1}$ $k_{off}^2=0,26 \text{ h}^{-1}$	-
[30]	bHolo: 1 - 865	1,3 $\mu\text{M}$	<i>Sf9</i> / <i>High Five</i>	$k_{off}^2=0,10 \text{ h}^{-1}$	-
<p><math>K_d</math>-Wert für cGMP stieg auf 12-60 <math>\mu\text{M}</math> bei Mutation von N, K oder D nach A in GAF A, und schnellere Dissoziation gebundenen cGMPs.</p>					

**Tab. 5.1:** Übersicht über bisherige Untersuchungen an verschiedenen PDE5 GAF-Konstrukten [b steht für bovine, h für humane Herkunft der verwendeten DNA, n.b. für *nicht bestimmt*, + für eine Phosphorylierung an S102,  $k_{off}^1/t_{1/2}^1$  für die niedrig affine Bindungsstelle,  $k_{off}^2/t_{1/2}^2$  für die hoch affine Bindungsstelle].

Messung der  $EC_{50}$  für die Aktivierung durch cGMP fast unmöglich. Diese Untrennbarkeit der cGMP-Wirkung an katalytischer Domäne und regulatorischer GAF-Domäne führte in einigen Studien [28, 30] zur Beobachtung, dass die Bindung von cGMP an die PDE5 GAF-Domänen gar keinen stimulierenden Effekt auf die katalytische Einheit besitzt. Erst in neueren Untersuchungen wurde die Aktivierung nachgewiesen [24, 108], allerdings konnte auch hier nur ein Bereich für die aktivierenden cGMP-Konzentrationen angegeben werden (0,1 bis 1  $\mu$ M). Ein Vergleich der Bindungskonstanten bisher untersuchter Konstrukte (Tab. 5.1) und der eine Aktivierung beschreibenden  $EC_{50}$ -Werte der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PDE5 GAF-CyaB1 AC-Chimären ist damit nur begrenzt möglich.

Die  $k_{off}$ - bzw.  $t_{1/2}$ -Werte aus Tab. 5.1 zeigen, dass in Bindungsstudien immer eine langanhaltende Bindung an die GAF-Domänen gefunden wurde.

Im völligen Gegensatz dazu steht eine extrem schnelle Aktivierung und Desaktivierung in PDE5 GAF-CyaB1 AC. Die Desaktivierung muß innerhalb der ersten 5 min nach Verdünnen erfolgt sein, nach kürzeren Zeiten konnte aus technischen Gründen nicht gemessen werden. Dieser Unterschied kann durch eine andere und vielleicht viel schnellere Signalübertragung in der Chimäre mit CyaB1 erklärt werden. Konformationsänderungen in den regulatorischen GAF-Domänen durch cGMP-Bindung werden möglicherweise durch die Beteiligung der flexiblen PAS-Domäne in der Chimäre schneller auf die katalytische Domäne übertragen. Die andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass eine schnelle Desaktivierung beim Absinken des cGMP-Spiegels in der Umgebung auch möglich ist, wenn die GAF-Domänen noch cGMP gebunden haben. Dies würde bedeuten, dass nur wechselnde cGMP-Spiegel einen Einfluß auf Aktivitätsänderungen im katalytischen Zentrum besitzen.

### 5.3.2 Auswirkungen von Lys und Asp-Mutationen im konservierten NKFDE-Motiv der PDE5 GAF-Domänen

Untersuchungen des für cNMP-bindende PDEn typischen NKFDE-Motivs in PDE5 hatten gezeigt, dass die Mutationen D/A oder K/A in GAF A die Bindung von cGMP zwar verringerten, jedoch nicht verhinderten [27, 30, 31], während D/A in GAF B die Bindung von cGMP sogar erhöhte [27]. Diese Ergebnisse decken sich mit denen, die für Mutationen von K/A und/oder D/A im NKFDE-Motiv der GAF A bzw. B der PDE5 GAF-CyaB1 AC-Chimäre erhalten wurden. In der Chimäre wurde nicht die Bindung von cGMP an die GAF-Domänen gemessen sondern die Aktivierung der nachgeschalteten AC, aber die Ergebnisse aus Bindungsstudien und Aktivitätsmessung scheinen vergleichbar. So bewirkte die hier untersuchte D299A-Mutation in GAF A eine 10-fach höhere  $EC_{50}$  als im Holoenzym, dies deckt sich mit der in [27] gefundenen 10-fachen Reduktion der cGMP-Bindung bei dieser Mutante. Die Mutation K287A in GAF A hatte mit einer 23-fach höheren  $EC_{50}$  noch gravierendere Auswirkungen auf die Aktivierung. Eine cGMP-Bindung an GAF A scheint damit die Aktivierung der AC zu beeinflussen, wenn diese durch Mutationen im NKFDE-Motiv gestört wird, ist mehr

cGMP für die gleiche Stimulation nötig. Dass GAF A für die Aktivierung des PDE5 Holoenzym verantwortlich ist, zeigte auch die Verwendung eines Antikörpers gegen die GAF A-Domäne und der daraus resultierende Verlust jeglicher cGMP-Bindung und PDE-Aktivierung [24].

Auch die Beobachtung, dass eine Mutation in GAF B die Bindung von cGMP an die GAF-Domänen erhöht [27], war auf die Aktivierung der AC übertragbar. Erneut hatte die Mutation D488A weniger Einfluß als K473A. K473A hatte eine 2,4-fache Verringerung der  $EC_{50}$  zur Folge. Das Überraschendste an den Mutationen in GAF B war, dass sie einen bis zu vierfachen Anstieg der Aktivierung bewirkten. Ob GAF B cGMP bindet, darüber konnte keine Aussage gemacht werden. Ein Verlust an Aktivierung war in den untersuchten Mutationen nicht feststellbar. Einige Studien geben GAF A als alleinige aktivierende und cGMP-bindende Stelle an [2, 24, 31, 34], während in anderen zwei Bindungsstellen detektiert wurden [28, 33, 35, 40, 114]. Diese zwei postulierten Bindungsstellen beruhen vor allem auf der Beobachtung, dass die cGMP-Bindung an die GAF-Domänen bzw. die Dissoziation in einigen Untersuchungen biphasisch verläuft. Dies wurde sowohl in der isolierten GAF A als auch in Konstrukten aus GAF A und B gefunden (vgl.  $k_{off}$  in Tab. 5.1, [27, 30, 34, 40]). Im Widerspruch dazu steht, dass in anderen Untersuchungen für beide ein monophasischer Verlauf gemessen wurde [2, 31], der auf nur eine Bindungsstelle (in GAF A) hindeutet. Nachdem auch bei der alleinigen GAF A (mit N-Terminus) ein biphasischer Bindungsverlauf möglich ist [34], gibt es vielleicht doch nur eine Bindungsstelle in GAF A. Diese hätte je nach Aktivierungszustand verschiedene Konformationen und damit ein anderes Bindungsverhalten. Daraus könnten mehrphasige Dissoziationskurven bei mehreren in einer Lösung vorkommenden Zuständen resultieren.

Wenn die GAF B-Domäne selbst auch kein cGMP bindet, kann sie trotzdem im Holoenzym sowohl die Bindung von cGMP an GAF A behindern oder verlangsamen als auch die maximal erreichbare Aktivität durch sterische Wechselwirkungen entweder mit GAF A oder mit dem katalytischen Zentrum herabsetzen. Ein solches Verhalten würde auch erklären, warum die Mutanten D299A/D488A und K287A/K473A zwar im Vergleich zu PDE5 GAF-CyaB1 AC erhöhte  $EC_{50}$ -Werte aufwiesen, im Vergleich zu D229A oder K287A jedoch verringerte Werte zeigten (vgl. Tab. 4.2 und Tab. 4.3). Hier fällt der hemmende Effekt der GAF B weg und trotz D299A bzw. K287A kann cGMP besser an GAF A binden, bzw. die Signalübertragung auf das katalytische Zentrum verbessert sich.

Die in [28] gemachte Beobachtung, dass die Mutationen D289A und D478A in Rinder-PDE5 zu einem Verlust jeglicher cGMP-Bindung führen, bestätigte sich bei den untersuchten PDE5-CyaB1 AC-Chimären nicht.

Doppelmutanten von Lys und Asp zu Ala in GAF A und/oder GAF B der PDE5-CyaB1 AC-Chimäre lieferten dieselben Ergebnisse wie die bisher beschriebenen Mutanten. Auch die 4-fach-Mutante K287A/D299A/K473A/D488A war cGMP-stimulierbar, wenn auch mit einer 10-fach höheren  $EC_{50}$  als das Ausgangskonstrukt.

Damit hat die für die Stabilität der cGMP-Bindungstasche als wichtig postulierte Salzbrücke [1, 105] zwischen Lys und Asp im NKFDE-Motiv der PDE5 (GAF A) eine

geringere Bedeutung als in PDE2A GAF B [1, 25], PDE6 GAF A und B [26] oder CyaB1 GAF B [14, 15]. In den genannten anderen PDEn hatten derartige Mutationen einen Verlust der cGMP-Bindung zur Folge. Auch im Falle der unter 5.2.3 und 5.2.2 diskutierten Bedeutung dieser Salzbrücke in den CyaB2-GAF-Domänen verhinderte deren Zerstörung durch die Mutation von Asp zu Ala im Konstrukt ohne die stabilisierenden Einschübe eine Aktivierung durch cAMP-Bindung an GAF A und B. Da für die PDE5 GAF-Domänen bisher keine Struktur vorliegt, können keine Angaben darüber gemacht werden, ob hier die Bindungstasche einen anderen Aufbau als in PDE2A oder CyaB2 besitzt und damit die Salzbrücke entweder gar nicht existiert bzw. einen geringeren Einfluß hat oder ob es in PDE5 wie in CyaB2 Bereiche gibt, die die Bindungstasche auch ohne Salzbrücke stabilisieren.

Nachdem eine mögliche Struktur der PDE5-Bindungstasche in GAF A analog zur PDE2A GAF B-Struktur postuliert wurde [31] und durch eine Mutation von F205 (F438 in PDE2A) der Verlust der cGMP-Bindung gezeigt werden konnte (wie dies auch bei PDE2A der Fall ist [1, 25]), liegt die Annahme nahe, dass sich die Bindungstasche der PDE5 nicht sehr von denen anderer GAF-Domänen unterscheidet. Damit wird die zweite Hypothese wahrscheinlicher, dass in PDE5 andere Bereiche die Bindungstasche stabilisieren. Diese Vermutung bestätigen auch die nachfolgend diskutierten Einflüsse des N-Terminus.

### 5.3.3 Einfluß des PDE5 N-Terminus

Die Untersuchung von N-terminal verkürzten PDE5 GAF-CyaB1 AC-Konstrukten lieferte unerwartete Ergebnisse. Zum einen wurde mit zunehmender Verkürzung ein starker Anstieg der Basalaktivität beobachtet, in gleichem Ausmaß sank der Aktivierbarkeitsfaktor. Auch die  $EC_{50}$ -Werte sanken auf  $0,2 \mu\text{M}$  (Übersicht in Abb. 5.2). In den verkürzten Konstrukten zeigte sich, dass bei abgeschnittenem N-Terminus auch ohne cGMP eine Aktivierung der AC erfolgt. Die Basalaktivitäten stiegen bis zu 25-fach. Durch Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der PDE5 Q148-CyaB1 AC-Chimäre wurde ausgeschlossen, dass diese Veränderungen auf einer anderen Kinetik der katalytischen Domäne beruhen. Damit sind die erhaltenen  $EC_{50}$ -Werte der verkürzten Konstrukte mit denen anderer PDE5-Chimären vergleichbar. Die gefundenen Veränderungen im Aktivierbarkeitsprofil müssen demnach auf eine veränderte cGMP-Bindung an die GAF-Domänen bzw. auf eine aktivierende Konformationsänderung zwischen PDE5 GAF-Domänen und CyaB1 katalytischer Domäne auch ohne cGMP zurückzuführen sein. Ein intakter N-Terminus verhindert demnach eine Aktivierung bei geringen cGMP-Konzentrationen.

Betrachtet man die verkürzten Mutanten genauer, so findet sich die maximale katalytische Aktivität bei dem vor P87 abgeschnittenen Konstrukt (vgl. Tab. 4.6, Seite 139). Bis zu dieser AS ist ein Anstieg des Aktivierbarkeitsfaktors bei vergleichsweise geringem Basalaktivitätsanstieg erkennbar. Dies läßt den Schluß zu, dass die ersten 86 AS des N-Terminus den Aufbau der eigentlichen Bindungstasche nicht stören. Wenn cGMP gebunden ist, verbessert sich die Signalübertragung zur katalytischen

Domäne, möglicherweise, weil im Holoenzym der jetzt entfernte N-Terminus –räumlich betrachtet– im Wege ist. Die ersten 86 AS der PDE5 scheinen damit längenabhängig und unspezifisch das Ausmaß der aktivierenden Wechselwirkung zwischen GAF und katalytischer Domäne zu stören. Das Verhalten der PDE5 P87-CyaB1 AC-Chimäre entspricht genau dem einer Mutationen von Asp oder Lys zu Ala in PDE5 GAF B (vgl. 4.3.3). Auch dort sank die  $EC_{50}$  für GMP leicht, während der Aktivierbarkeitsfaktor stark stieg. Damit stellt sich die Frage, ob der N-Terminus (bis zur AS P87) und GAF B normalerweise einzeln hemmend auf die cGMP-Bindung an GAF A wirken oder ob sich beide über GAF A zusammenlegen und so gemeinsam die Bindung von cGMP hemmen.

Weitere Verkürzungen zeigen, dass vor allem zwischen I101 und P109 die Basalaktivität ansteigt (vgl. Abb. 5.2) und der Aktivierbarkeitsfaktor abfällt. Der Bereich zwischen I101 und P109, in dem auch die Phosphorylierungsstelle S102 liegt, scheint damit die unaktivierte Form zu stabilisieren. Möglicherweise hält er über Wechselwirkungen mit GAF A oder mit unbekanntem Bereichen von GAF B die Struktur der GAF-Domänen in der unaktivierten, geschlossenen Form (vgl. Abb. 5.3). Wird nun der Bereich zwischen I101 und P109, inklusive S102, entfernt, fällt der Hauptstabilisator der geschlossenen Form weg und das Enzym klappt schon ohne gebundenes cGMP in eine aktivere Form. Eine Möglichkeit für eine höhere katalytische Aktivität besteht darin, dass im Holoenzym aufgrund räumlicher Trennung nur wenige katalytische CyaB1-Domänen dimerisieren können und die Aktivität deshalb gering ist. Nach dem Entfernen des Stabilisators dieser unaktivierten Konformation wäre es möglich, dass das ganze Molekül flexibler wird und sich mehr katalytische Zentren zur Dimerisierung treffen, was in einer höheren Basalaktivität resultiert.

Die Bedeutung dieses Bereiches für den unaktivierten Zustand zeigt sich auch daran, dass eine Phosphorylierung an S102 die  $EC_{50}$  erniedrigt. Durch andere Wechselwirkungen im Enzym aufgrund des negativen Phosphats an S102 ist die geschlossene, vorher fixierte Form weniger stabil und es reichen geringere cGMP-Spiegel für das Öffnen dieser unaktivierten Konformation aus (auch 5.3.4).

cGMP als allosterischer Aktivator wäre damit ein Strukturbrecher der unaktivierten Form. Im Holoenzym braucht man große Mengen um den Übergang zur aktivierten Form zu erreichen. Wenn durch Phosphorylierung oder die Entfernung des N-Terminus bzw. der GAF B die Struktur offen vorliegt, reicht weniger cGMP aus um das Enzym vollständig in die aktive Form umzuwandeln.

Bei P109 scheint die Bindungstasche die optimale Anordnung erreicht zu haben, weitere Verkürzungen erbringen keine Erniedrigung der  $EC_{50}$  und des Aktivierbarkeitsfaktors. Im Gegenteil, sie scheinen einen negativen Einfluß auf die erreichbare Maximalaktivität zu haben, denn diese sinkt bei T121 und Q148 ab. Dies mag zum Teil auf den unterschiedlichen Reinigungsgrad zurückzuführen sein, da aber alle Konstrukte unter den gleichen Bedingungen exprimiert und gereinigt wurden, sollte ein Vergleich möglich sein. Möglicherweise bewirkt eine zu starke Verkürzung eine weniger optimale Interaktion zwischen aktivierender GAF-Domäne und katalytischem Zentrum.

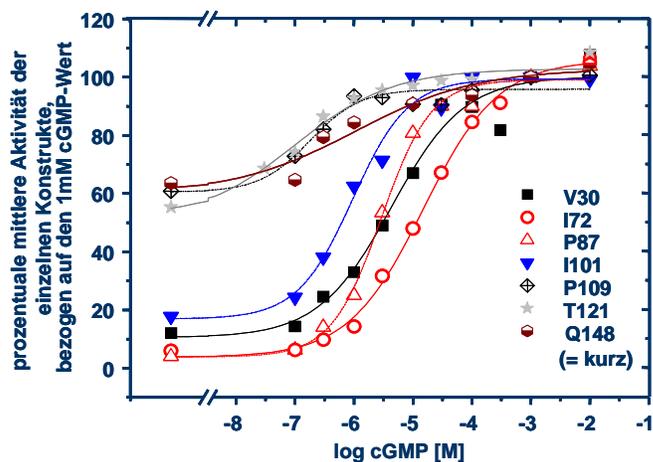
### 5.3.4 Eine Phosphorylierung an S102 erhöht die spezifische Aktivität der PDE5 GAF-CyaB1 AC-Chimäre nur geringfügig

Die Phosphorylierung der PDE5 GAF-CyaB1 AC führte bei Aktivierung durch cGMP nur zu einem geringfügigen Anstieg der spezifischen Aktivität um 30 - 50%, die  $EC_{50}$ -Werte unterschieden sich nicht. Trotz eines positiven Signals im Autoradiogramm mußte von einer nicht vollständigen Phosphorylierung ausgegangen werden, vor allem da zur Phosphorylierung PKA eingesetzt und kein cGMP zugesetzt wurde (widersprüchliche Erkenntnisse in [28, 33, 34, 39, 39, 41]). Der Zusatz von cGMP zum Phosphorylierungsansatz soll die Chimäre in die aktivierte Form überführen und zu einer Bindung von cGMP an die GAF-Domänen führen. In einigen Studien stieg dadurch der Anteil an phosphorylierter PDE5. Die S102D-Mutante täuschte durch ihre permanent negative Ladung an dieser Stelle eine vollständige Phosphorylierung vor und besaß gegenüber PDE5 GAF-CyaB1 AC eine signifikant um den Faktor 5 erniedrigte  $EC_{50}$ . Dies deckt sich mit einer Untersuchung, in der die PDE-Aktivität im phosphorylierten PDE5 Holoenzym vor allem bei geringen cGMP-Konzentrationen um bis zu 86% erhöht war [33]. Im Bindungstest zeigte sich in derselben Studie eine größere Auswirkung der Phosphorylierung, der  $K_d$ -Wert für die Bindung von cGMP war im phosphorylierten Konstrukt um den Faktor 4 niedriger (vgl. Tab. 5.1). Dieses Ergebnis deckt sich mit der 5-fach geringeren  $EC_{50}$  der PDE5 S102D-CyaB1 AC-Chimäre. Ein Unterschied zwischen der Bindung von cGMP an die GAF-Domänen und der dadurch resultierenden Aktivierung kann damit in phosphorylierter PDE5 GAF-CyaB1 AC nicht festgestellt werden. Inwieweit dieser relativ geringe Aktivitätsanstieg durch eine Phosphorylierung in lebenden Zellen bedeutsam sein könnte, ist ungeklärt.

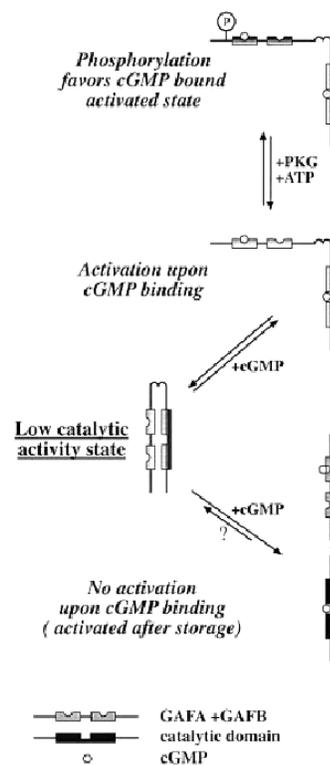
Als physiologische Bedeutung der Phosphorylierung werden im Moment verschiedene Thesen diskutiert. Zum einen wird ihr auf zellulärer Ebene eine Bedeutung bei der Desensibilisierung gegenüber NO-Signalen nachgesagt. Es wurde beobachtet, dass für eine Aktivierung des PDE5 Holoenzym sehr hohe cGMP-Konzentrationen nötig sind, für eine Deaktivierung allerdings sehr geringe [37, 38]. Dies läßt die Vermutung zu, dass durch cGMP-Bindung ein Übergang von einer niedrig affinen cGMP-Bindungstasche zu einer hochaffinen cGMP-Bindungstasche erfolgt. Das Zurückklappen in den niedrig affinen Zustand scheint auch bei geringen cGMP-Konzentrationen langsam abzulaufen. Im Falle einer Phosphorylierung an S102 bestand diese hohe katalytische Aktivität bei nur 10 nM cGMP in Lösung 60 min lang fort [38]. Dieser Effekt konnte für das phosphorylierte PDE5 GAF-CyaB1 AC-Konstrukt nicht gezeigt werden. Eine Phosphorylierung verlängerte  $k_{off}$  nicht. Mögliche Ursachen dafür sind die schon im unphosphorylierten Fall beobachtete schnellere Signalübertragung und Konformationsänderung in der PDE5-CyaB1 AC-Chimäre. Auch ein Anstieg von  $k_{off}$  von z.B. 2 sec auf 2 min war mit den hier angewendeten Methoden nicht meßbar, obwohl dieser Effekt physiologisch bedeutsam wäre.

Die beschriebenen Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass in PDE5 die Struk-

turen sehr viel starrer und unbeweglicher als in CyaB1 sind. Eine Phosphorylierung im für den unaktivierten Zustand wichtigen Bereich zwischen AS I101 und P109 (vgl. 5.3.3) könnte die Rückumlagerung in den unaktivierten Zustand weiter verlangsamen, so dass eine länger anhaltende Stimulation die Folge ist. Dass im aktivierten und/oder phosphorylierten Zustand eine andere Konformation des PDE5 Holoenzym vorliegt, bestätigt ein verändertes Laufverhalten dieser Konstrukte im nativen SDS-Gel [24, 34, 35, 40]. In [24] wurde das in Abb. 5.3 dargestellte Konformationsschema postuliert.



**Abb. 5.2:** Aktivierbarkeit der N-terminal-verkürzten PDE5 GAF-CyaB1 AC-Konstrukte durch cGMP. Aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten wurden die Einzelpunkte als prozentualer Anteil der Aktivität bei Stimulation durch 1 mM cGMP berechnet und aufgetragen.



**Abb. 5.3:** Mögliche Konformationsänderungen durch cGMP-Bindung und/oder Phosphorylierung im PDE 5 Holoenzym, [aus 24].

Die Annahme, dass derartige Konformationsänderungen ablaufen, läßt damit auch den Schluß zu, dass es für verschiedene gebundene cGMP-Mengen an die GAF-Domänen verschiedene Aktivierungszustände bzw. Übergangszustände in der Ausrichtung der GAF-Domänen zur katalytischen Domäne gibt. Dies bestätigen mehrere Studien [1, 34, 35, 50, 68, 115]. Sie erklären möglicherweise auch die beobachtete biphasische Abdissoziation des cGMPs (vgl. 5.3.2).

Neben einer schnelleren Hydrolyse von cGMP könnte eine weitere physiologische Bedeutung der cGMP-Bindung an die GAF-Domänen sein, cGMP durch Bindung

an die GAF-Domänen aus dem Cytosol zu entfernen und damit schnell den cGMP-Spiegel in der Zelle zu senken. Dadurch würde eine Aktivierung der PKG reduziert. Dies zeigen Studien, die in bestimmten Geweben eine höhere Konzentration an PDE5 Holoenzym als an aktivierendem cGMP fanden [36, 116, 117]. So scheint es möglich, dass die GAF-Domänen als Speichereservoir für cGMP dienen. Dieser Speichereffekt würde durch eine von der Phosphorylierung herrührende, höhere Bindungsaffinität der GAF-Domänen [33, 35] noch verstärkt und wäre damit eine weitere Funktion einer Phosphorylierung.

Dieses Verhalten paßt zu Untersuchungen, in denen eine lang anhaltende Aktivierung nicht unbedingt mit einer hohen cGMP-Konzentration in der Umgebung korrelierte.

### 5.3.5 Mögliche Hypothesen zum Aktivierungsmechanismus und zur cGMP-Bindung in PDE5

Bisher war lediglich die Bedeutung der Phosphorylierung an S102 untersucht worden (deren Einfluß auf die PDE5 GAF-CyaB1 AC-Chimäre wurde unter 5.3.4 diskutiert), nie jedoch der Einfluß des N-Terminus an sich. Die in Bindungsstudien bestimmten  $k_d$ -Werte für cGMP schwankten unphosphoryliert zwischen 27 nM und 1,9  $\mu$ M (Tab. 5.1, [2, 28, 31, 34, 35, 40]). Die Ursache dafür könnte in unterschiedlichen Meßverfahren liegen, bei genauerer Betrachtung fällt allerdings auf, dass die untersuchten Konstrukte unterschiedliche Längen haben. Zum Teil wurde mit dem Holoenzym, mit GAF A ohne N-Terminus, mit GAF A mit N-Terminus oder mit GAF A und B mit und ohne N-Terminus gearbeitet. Nachdem N-Terminus und/oder GAF B (5.3.2) aber die cGMP-Bindung an die GAF-Domänen beeinflussen, sind die bei unterschiedlichen Konstrukten gemessenen  $k_d$ -Werte nicht vergleichbar. Ein weiterer Grund für die Nichtvergleichbarkeit der  $k_d$ -Werte könnte das jeweils verwendete Expressionssystem (Tab. 5.1) und die damit unterschiedliche Aufreinigung sein. Die Unterschiede einer Expression in *E. coli*, in Insektenzellen und die Extraktion aus Lungengewebe sind vor allem in Bezug auf die mitgeführten Verunreinigungen gravierend.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich insofern mit den Bindungsstudien, dass ein Konstrukt aus GAF A und B ohne N-Terminus cGMP in Bindungstests mit der höchsten Affinität bindet (Tab. 5.1, [31, 34]). Die Bindungstasche ist hier möglicherweise offen. Die bindenden AS haben die optimale Anordnung zum cGMP, die erforderlichen H-Brücken oder andere Wechselwirkungen können direkt ausgebildet werden.

Aufgrund dieser Arbeit wäre aber im Fall der postulierten offenen Bindungstasche beim Konstrukt ohne N-Terminus für eine Aktivierung gar kein cGMP mehr nötig, weil allein die Strukturänderung für eine Aktivierung ausreicht. Warum hat das Enzym in dieser hoch aktiven Form auch die höchste Affinität für cGMP?

Welche strukturelle Änderung bewirkt die Bindung von cGMP an die GAF-Domänen, dass eine Aktivierung der AC oder PDE die Folge ist? Da in Konstrukten ohne den Bereich vor etwa AS 100 auch ohne cGMP der aktivierte Zustand vorliegt, liegt die Ver-

mutung nahe, dass im Holoenzym AS 1–100 den unaktivierten Zustand durch Wechselwirkungen mit der Bindungstasche oder GAF A aufrecht erhält. Erst durch die Bindung von cGMP oder eine Entfernung dieses Bereichs kann das Enzym in die aktivierte Form übergehen. Auch eine Phosphorylierung an S102 begünstigt den Übergang.

Dass auch im Holoenzym ein Übergang in eine Form mit erhöhter Basalaktivität und einem Verlust der Aktivierbarkeit durch cGMP möglich ist, zeigen die Effekte einer 14-tägigen Lagerung [24].

### 5.3.6 Mögliche pharmakologische Bedeutung der PDE5 GAF-Domänen

Vielleicht ist durch verschiedene Affinitäten der Bindungstasche eine sehr feine Regulation der PDE5-Aktivität möglich. Möglicherweise soll zusätzlich cGMP gebunden und aus dem Cytosol entfernt werden. Je nach Stärke des aktivierenden cGMP-Signals ist der Effekt auf die Bindung des cGMPs an die GAF-Domänen und auf die Steigerung der katalytischen Aktivität unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Zelle könnte damit auf verschieden starke NO- bzw. cGMP-Stimuli unterschiedlich reagieren (vgl. mit der physiologischen Bedeutung einer cGMP-Bindung an die GAF-Domänen unter 5.3.4). Falls die gemachten Annahmen zutreffen, wären die nachfolgend beschriebenen Zustände möglich.

Bei einem schwachen NO-vermittelten cGMP-Signal bleibt die PDE-Aktivität auf geringem Niveau und es bindet nur wenig cGMP an die GAF-Domänen. Dies führt wegen der in diesem Zustand geringeren Affinität der GAF-Domänen schnell zur Abdissoziation des cGMPs und damit zur unaktivierten Form.

Bei einem stärkeren Signal wird durch vermehrte Bindung des cGMPs an die GAF-Domänen zum einen die PDE-Aktivität erhöht und zum anderen durch die erhöhte Affinität mehr cGMP gebunden. Beide Effekte zusammen führen zu einem schnellen Abfall des cytosolischen cGMP-Spiegels. Da cGMP durch die höhere Affinität der GAF-Domänen fester gebunden ist, erfolgt aufgrund der verlangsamten Dissoziation auch ein verzögerter Übergang der PDE zurück zum unaktivierten Zustand.

Bei einem massiven cGMP-Signal oder bei Dauerstimuli (wie sie zum Beispiel bei der Gabe von Nitraten auftreten) führt der sehr hohe cGMP-Spiegel im Cytosol zusätzlich zur Aktivierung der PKG. Diese ist nun in der Lage, die aktivierte PDE5 an S102 zu phosphorylieren. Eine Phosphorylierung hält die durch cGMP aktivierte PDE5 noch länger bei niedrigen cGMP-Konzentrationen im aktivierten Zustand. Dies kann zum einen darauf beruhen, dass sie sterisch den Übergang in die unaktivierte Form blockiert oder dass sie den hochaffinen Zustand der Bindungstasche auch bei niedrigeren cGMP-Konzentrationen aufrecht erhält. Dies bestätigt die Mutation S102D in PDE5 GAF-CyaB1 AC, die den  $EC_{50}$ -Wert für eine Aktivierung durch cGMP um den Faktor 5 senkte. Eine dadurch verlängerte hohe Aktivität der PDE5 bewirkt eine Desensibilisierung der Zelle gegenüber nachfolgenden, stimulatorischen cGMP-Signalen.

## 5.4 Die Nucleotidspezifität in CyaB1 wird nicht durch einzelne AS bestimmt

Eine weiteres Ziel war in CyaB1 zu bestimmen, welche Aminosäuren für eine selektive Bindung von cAMP zuständig sind. Dieses Ziel wurde im SVFL-EIRIP-Konstrukt (VII, vgl. Abb. 4.77) und im SV-CyaB1-EL-EIRIP-Konstrukt (X, vgl. Abb. 4.81) erreicht, indem eine Umkehr der cNMP-Spezifität erfolgte. Allerdings beruht dies nicht auf dem Austausch einzelner Aminosäuren, in CyaB1 mußten dafür ganze Bereiche ausgetauscht werden. Der Austausch betraf unter anderem die komplette  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleife (Abb. 4.6). Dieser Bereich zeigt eine große Variabilität in Bezug auf Länge und Sequenz. Auch scheint er sehr flexibel zu sein wie ein Vergleich der Kristallstrukturen aus PDE2A und CyaB2 zeigt (5.2.1, Abb. 4.4, [105]). Durch die Strukturaufklärung der PDE2A-GAF-Domänen [1] wurden die AS S424, F438, D439, I458, A459, Y481, V484, D485, T488, T492 und E512 als bindungsrelevant identifiziert (Abb. 4.69, Seite 140). Folgende Experimente zeigten, dass in PDE2A die mit dem Pyrimidin-Ring interagierenden AS F438, D439 und T488 für cGMP spezifizieren. Eine Mutation jeder dieser AS zum Alanin verhinderte zwar nicht die Bindung von cGMP, erhöhte aber die Affinität der Bindungstasche zu cAMP um bis zu 8-fach, so dass eine fast gleich affine Bindung von cAMP und cGMP an die Bindungstasche möglich war [25]. In PDE 5 blockierte die Mutation des zu F438 in PDE2A analogen F205 zu Alanin die Bindung von cGMP sogar völlig [31]. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei PDE6, dort war jede der zu F438, D439, T488 und T492 analogen AS essentiell für eine cGMP-Bindung [23]. Die unterschiedlichen Effekte der gleichen Mutationen könnten auf der unterschiedlichen Selektivität der jeweiligen PDE für cGMP beruhen (sofern man davon ausgeht, dass die Strukturen der jeweiligen Bindungstaschen vergleichbar sind). Die Selektivität einer cGMP-Bindung an die PDE2A GAF B ist mit einem Wert von 10 sehr gering verglichen mit den GAF Domänen aus PDE5 und PDE6 oder der cAMP-Selektivität von CyaB1 oder CyaB2 [14, 23, 27, 107], für die Selektivitätswerte von 300-fach bis hin zu keiner Bindung des anderen cyclischen Nucleotids nachgewiesen wurden. Damit wäre es möglich, dass in der Bindungstasche der PDE2A GAF B der Verlust einzelner AS durch andere Wechselwirkungen kompensiert werden kann, während die Bindungstaschen von PDE5 oder PDE6 beim Verlust der jeweiligen AS keine ausgleichenden Bindungen eingehen können. Nachdem T. Kanacher zeigte, dass einzelne Mutation von W270 zu Ala, Phe oder Tyr und ein Austausch von W270 gegen Val und A274 gegen Phe (entsprechend D439 in PDE2A) in CyaB1 keinerlei Änderungen in der Spezifität zur Folge hatte, liegt auch für CyaB1 der Schluß nahe, dass die Bindungstasche einzelne Veränderungen ohne Spezifitätsverlust kompensieren kann. Dies bestätigt die Mutante CyaB1-FDG-Holo (4.4.8). Bei dieser wurden drei aufeinanderfolgende AS der  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleife (AAA 274-276) gegen FDG (AS 433-435) aus rPDE2a ersetzt. Die resultierende Chimäre besaß immer noch eine 20-fach höhere Selektivität für cAMP als für cGMP, auch wenn die Bindung von cAMP gegenüber dem CyaB1 Holoenzym 22-fach erniedrigt war. Damit liegt die Vermutung

nahe, dass diese AS zwar an der Spezifizierung des Nucleotids beteiligt sind, dass sie jedoch nicht alleine für die hohe Selektivität ( $\geq 300$ ) verantwortlich sind. Dass die in PDE2 an der Bindung beteiligten AS insgesamt bei cAMP-bindenden GAF-Domänen eine geringere Rolle spielen könnten, dafür spricht auch, dass in der cAMP-bindenden Trypanosomen-PDE2B die Mutation von T317 zum Alanin (entsprechend T492 in PDE2A) nur einen 4-fachen Affinitätsverlust für cAMP zur Folge hatte [32]. In CyaB1 bewirkte erst der Austausch des ganzen Bereiches zwischen EL und EIRIP gegen rPDE2a eine Aufhebung der selektiven cAMP-Bindung (4.4.3). Der Austausch dieses großen Bereiches schien die Struktur der Bindungstasche viel weniger zu stören als der kleine Austausch von AAA gegen FDG. Die spezifische Aktivität und die  $EC_{50}$ -Werte lagen im Bereich des Holoenzym.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich der ausgetauschte Bereich (der neben einigen vorgeschalteten AS auch die gesamte  $\beta 2$ - $\beta 3$ -Schleife beinhaltet) genau wie in PDE2A falten kann. Da für PDE2A und CyaB2 eine Flexibilität in diesem Bereich bei gleicher Lage der angrenzenden  $\beta$ -Faltblätter gefunden wurde (Abb. 4.4), scheint eine derartige Anordnung auch für CyaB1 plausibel. Damit würde sich der ausgetauschte Bereich ohne Veränderung der angrenzenden Strukturen in die GAF B-Domäne von CyaB1 einpassen. Wenn z.B. nur drei AS (wie AAA) ausgetauscht werden, kann dies die gesamte Flexibilität der Schleife und damit auch ihre Lage zu den angrenzenden  $\beta$ -Faltblättern stören, was eine schlechtere Nucleotidbindung zur Folge hat.

Wurde der Bereich zwischen AR und EL gegen die Sequenz der rPDE2a ausgetauscht, war keine Nucleotidbindung mehr möglich. Dies kann zum einen daran liegen, dass in diesem Bereich cAMP spezifiziert wird und nach Austausch dieses Bereiches keine Bindung mehr erfolgt. Bei Betrachtung der Kristallstruktur der PDE2A [1] scheint es jedoch wahrscheinlicher, dass der ausgetauschte Bereich, der sich vom Ende der  $\alpha 2$ -Helix bis ins  $\beta 2$ -Faltblatt erstreckt, die Struktur der Bindungstasche der CyaB1 zerstört.

Der Austausch des ganzen Bereiches zwischen AR und EIRIP führte zu einer cGMP-stimulierbaren AC. Die Aktivität dieses Konstruktes war sehr gering, was vermutlich auf ähnliche Faltungsprobleme wie in AR-EL zurückzuführen ist. Die Stimulierbarkeit durch cGMP zeigte jedoch, dass prinzipiell eine Bindung von cyclischen Nucleotiden möglich ist und dass die Spezifizierung für cAMP wirklich im Bereich zwischen AR und EL stattfinden muss. Nachdem auch im AR-EIRIP-Konstrukt mit einer zumindest in Grundzügen erhaltenen Bindungstasche kein cAMP gebunden wurde, erhärtete sich die Vermutung, dass in einem Konstrukt mit EL-EIRIP aus rPDE2a die Bindung von cAMP im Bereich zwischen AR und EL ermöglicht wird. Mutagenesestudien in diesem Bereich bestätigen dies.

In SVFL-EIRIP (VII, vgl. Abb. 4.77) und SV-CyaB1-EL-EIRIP (X, vgl. Abb. 4.81) erfolgt eine fast selektive Aktivierung durch cGMP. Nur die Doppelmutante T258S/L259V zeigt im EL-EIRIP-Konstrukt diesen Effekt.

Wurde nur L259 zu Val mutiert, war wieder eine 11-fach höhere Affinität der Bindungstasche für cAMP meßbar. Dieses Ergebnis ist widersprüchlich. Mit der Mutation des Leucins aus CyaB1 zum Valin aus rPDE2a sollte, so die Überlegung, die

Affinität zu cAMP (im Vergleich zum EL-EIRIP-Konstrukt) verringert werden. L259V erhöhte jedoch die Affinität für cAMP im Vergleich zum EL-EIRIP-Konstrukt. Diese Chimäre wies eine sehr geringe Aktivität auf, scheinbar stört allein der Austausch eines Leucins gegen ein Valin mit einer um CH<sub>2</sub> verkürzten Seitenkette die Struktur der Bindungstasche derartig, dass beide Nucleotide schlecht gebunden werden. Die Auswirkungen auf die cGMP-Bindung sind jedoch gravierender. Dieses Ergebnis zeigt wiederum, dass die selektive Bindung eines Nucleotids nicht auf eine einzelne AS sondern auf ein komplexes Netzwerk von Bindungen in der Bindungstasche zurückzuführen ist. Einen ähnlichen, wenn auch von der Affinität her gegenteiligen Effekt zeigte die Mutante SL-CyaB1-EL-EIRIP (IX, vgl. Abb. 4.82). Die alleinige Mutation T258S im EL-EIRIP-Konstrukt erhöhte die Affinität der Bindungstasche selektiv für cGMP um fast 100-fach. Der Serinrest besitzt damit eine wichtige Funktion bei der cGMP-Bindung in dieser Chimäre, allerdings ist er, wie das EL-EIRIP-Konstrukt zeigt, nicht das alleinige Spezifitätsmerkmal. Diese Ergebnisse lassen sogar die Hypothese zu, dass im rPD2a Holoenzym die Kombination von SL an Position 419 und 420 eine höhere Selektivität für cGMP bewirken würde als das tatsächlich vorhandene SV. Es kann davon ausgegangen werden, dass die nur 10-fache Bevorzugung von cGMP in den GAF-Domänen der PDE2 einen physiologischen Sinn hat. Für die feinen Regulationsmechanismen innerhalb lebender Zellen könnte die fehlende Spezifität der Nucleotidbindung in PDE2 wichtig sein, die Bindungstasche soll damit gar keine größere Affinität zu cGMP besitzen.

Dass die in dieser Chimäre gemachten Beobachtungen keinesfalls auf andere GAF-Domänen übertragbar sind, zeigt sich im Verhalten der trypanosomalen PDE2B. Diese besitzt an den eben diskutierten Stellen ein konserviertes SL (vgl. Alignment 4.6, S. 95) und bindet hochspezifisch cAMP [32].

Dass die beiden AS Serin und Valin zwar in der EL-EIRIP-Mutante unter Erhalt der Stimulation durch cGMP die Aktivierung durch cAMP weitgehend abschalten können, läßt keinen Rückschluß auf die Bedeutung dieser Aminosäuren in anderen Konstrukten zu. Dies zeigt die Mutante SV-CyaB1-Holo (XI, Abb. 4.83). Die EC<sub>50</sub> stieg zwar im Vergleich zum CyaB1 Holoenzym um den Faktor 6, die Spezifität für cAMP war jedoch unverändert. Sogar Konzentrationen von mehr als 1 mM cGMP bewirkten kaum einen Aktivitätsanstieg. Von EL-EIRIP-rPDE2a-CyaB1 AC (III) ausgehend wurden weitere Konstrukte, in denen immer einige AS des Bereiches EL-EIRIP aus rPDE2a zur CyaB1 zurückmutiert waren, untersucht. Sie zeigten, dass der Anschalter für cGMP nicht in einer einzelnen AS begründet ist, sondern dass die Affinität schrittweise mit größeren Bereichen aus rPDE2a ansteigt. Die EC<sub>50</sub>-Werte dieser Konstrukte sind nicht vergleichbar. Manche Mutationen hatten offensichtlich viel größere Auswirkungen auf die absolute Affinität und die erreichbare Maximalaktivität als andere. Damit ist nur die Diskriminierung der Nucleotidbindung auswertbar.

Der Versuch eine mögliche *stacking*-Interaktion des CyaB1 Y325 mit dem Adeninring des cAMPs durch eine Mutation zum Alanin nachzuweisen verlief erfolgreich. Y325A im EL-EIRIP-Konstrukt (XVII) reduzierte die Affinität der Bindungstasche zu cAMP im Vergleich zu CyaB1  $\geq$  1000-fach, die Bindung von cGMP wurde jedoch

nicht beeinträchtigt. Dies bestätigt die Vermutung, dass in CyaB1 eine Wechselwirkung zwischen Adeninring und Tyrosin 325 besteht, die für die Bindung entscheidend ist. Dass die Affinität für cGMP im Vergleich zum EL-EIRIP-Konstrukt nur um den Faktor 86 absank, zeigt, dass Y325 beim cAMP stärker an einer richtigen Orientierung in der Bindungstasche beteiligt ist als bei cGMP. Dieser Effekt könnte allerdings auch auftreten, weil durch die Einführung des EL-EIRIP-Stückes AS, die normalerweise für die cAMP-Bindung wichtig sind, entfernt wurden. Für die Orientierung und Bindung von cGMP ist in der EL-EIRIP-Chimäre F433 aus rPDE2a als zusätzlicher Stabilisator vorhanden. Die Auswirkungen der Mutation Y325A wurden im Holoenzym nicht untersucht, diese Chimäre könnte aber Erkenntnisse über die reale Bedeutung von Y325 für die Selektivität liefern.

Eine Übertragung der durch die Spezifitätsuntersuchungen an CyaB1 GAF B erhaltenen Ergebnisse auf die rPDE2A GAF B-Domäne in einer rPDE2a GAF-CyaB1 AC-Chimäre mißlang. Der Austausch der Bereiche zwischen AR und EIRIP in rPDE2a GAF-CyaB1 AC lieferte zwar aktive, aber nicht durch cAMP oder cGMP aktivierbare Konstrukte. Dies mag zum einen auf einer völligen Fehlfaltung der Proteine beruhen, oder vielleicht paßt sich die  $\beta 2$ - $\beta 3$ -Schleife aufgrund von Wechselwirkungen mit anderen AS nicht so gut in die rPDE2a-Struktur ein wie das in der umgekehrten Mutante der Fall ist. Auch die in rPDE2a GAF-CyaB1 AC im Vergleich zum CyaB1 Holoenzym sehr geringe Aktivierung um den Faktor 10 erschwert das Messen von Effekten.

Die gesamten Untersuchungen zur Nucleotidspezifität zeigen, wie schwierig es ist durch verschiedene Mutationen in der Bindungstasche einer GAF-Domäne Rückschlüsse auf die Selektivität der Nucleotidbindung zu ziehen. Da nie die Gesamtauswirkungen einer Mutation auf die Struktur des Enzyms vorhersehbar sind, können nur relative Effekte, wie Änderungen in der Nucleotidselektivität bestimmt und verglichen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht, oder nur mit Vorsicht auf andere GAF-Domänen übertragbar. Für eine genaue Analyse wären Kristallstrukturen jeder Mutante erforderlich.

## 5.5 Offene Fragen und Ausblick

In PDE2, 5, 6, 10 und 11 erschwert die Doppelfunktion der cyclischen Nucleotide als allosterischer Aktivator an den GAF-Domänen und als Substrat im katalytischen Zentrum eine isolierte Messung der Effekte einer cNMP-Bindung an die GAF-Domänen. Eine solche Messung ist in Chimären mit dem katalytischen Zentrum der CyaB1-Adenylatcyclase möglich. Hier stellt sich die Frage, inwieweit die Ergebnisse solcher Chimären auf PDE Holoenzyme übertragbar sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ergebnisse von Aktivitätsuntersuchungen mit Bindungsstudien verglichen. Es ist bisher jedoch nicht geklärt, ob eine cNMP-Bindung immer eine Aktivierung der PDE bewirkt.

Im Falle der PDE5 widersprechen sich die Untersuchungen. Verschiedene Bindungskonstanten, verschiedene  $k_{off}$ -Werte und biphasisches Bindeverhalten wie auch die

Bedeutung der Phosphorylierung an S102 geben Rätsel auf. Auch der Einfluß des N-Terminus wurde bisher nicht gezielt am PDE5 Holoenzym untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten hemmenden Effekte des N-Terminus und der GAF B müssen durch Untersuchungen am Holoenzym bestätigt werden.

Weiter stellt sich die Frage, ob die für die Expression der untersuchten Konstrukte verwendeten Zellen (*E.coli*, *Sf9*, *COS*, etc.) eine Rolle auf ihre Stabilität und ihr Verhalten haben. Für eine Vergleichbarkeit wären Untersuchungen mit Konstrukten aus dem gleichen Expressionssystem hilfreich.

PDE5 GAF-CyaB1 AC-Konstrukte ohne N-Terminus zeigten eine sehr hohe Aktivität auch ohne anwesendes cGMP. Warum steigt bei diesen Konstrukten, wenn sie schon fast maximal aktiviert sind, die Affinität zu cGMP? Ist dies ein Effekt, der auch im Holoenzym auftritt und wenn ja, welche physiologische Bedeutung hat er? Treffen die unter 5.3.5 gezogenen Schlüsse zu?

Wie weit sind in vitro-Untersuchungen auf lebende Zellen übertragbar? Gibt es neben PKA und PKG noch weitere Proteine die mit PDE5 wechselwirken? Dass ein Unterschied besteht, zeigten Untersuchungen [37,38], die neben PDE5 auch PKG und die NO-sensitive GC coexprimierten und die im phosphorylierten Fall verlängerte  $k_{off}$ -Werte für die Aktivierung der PDE5 fanden. Da diese Ergebnisse nicht auf die PDE5 GAF-CyaB1 AC-Chimäre übertragbar waren, stellt sich die Frage, ob dort ein anderer, schnellerer Übertragungsmechanismus vorliegt. Auch die Bedeutung des NKFD-Motivs in PDE5 blieb unklar. In GAF A ist dieses Motiv indirekt an der Aktivierung beteiligt, in GAF B scheint es die cGMP-Bindung an GAF A zu hemmen. Da die Struktur der PDE5 GAF-Domänen nicht bekannt ist, kann über den Aufbau der Bindungstasche und eventuell stabilisierende Bereiche nur spekuliert werden. Dass von einer Struktur nicht auf alle GAF-Domänen geschlossen werden kann, zeigen die Untersuchungen mit CyaB1 und dem Bereich AR-EL-EIRIP aus rPDE2a.

Nachdem Phosphodiesterasen vor allem durch *Viagra* zum interessanten Target nicht nur für die Behandlung der erektilen Dysfunktion, sondern auch zur Behandlung von Asthma oder COPD wurden, ist ein Ziel der Pharmaindustrie, eine möglichst hohe Selektivität bei der Hemmung einer bestimmten PDE zu erreichen. Da nur fünf der elf PDE-Familien GAF-Domänen besitzen, stellen sie ein interessantes *drug target* dar.

Vor einer Entwicklung spezifischer Inhibitoren muss jedoch die genaue Aufgabe der GAF-Domänen geklärt werden.

Soll durch sie schnell eine maximale Aktivität der jeweiligen PDE erreicht werden, um dem cNMP-Signal durch Abbau entgegenzuwirken? Dienen sie dazu Signale besser differenzieren oder verstärken zu können?

Soll bei einem starken Signal durch cGMP schnell eine Phosphorylierung bewirkt werden, um damit länger eine hohe Aktivität zu erhalten?

Soll durch die starke cGMP-Bindung an die GAF-Domänen der cGMP-Spiegel in der Zelle gesenkt werden, um andere Proteine, wie z.B. PKG gar nicht zu aktivieren?

All diese Fragen sind abschließend zu klären, neben den erforderlichen physiologischen Untersuchungen wäre vor allem eine Kristallstruktur mit N-Terminus, sei es von PDE2A, PDE5 oder CyaB1 hilfreich.



## 6 Zusammenfassung

Die Kristallstruktur der CyaB2 GAF-Domänen zeigt ein antiparalleles Dimer, das cAMP an GAF A und B gebunden hat. Mit einer Chimäre aus CyaB2-GAF-Domänen und CyaB1 katalytischem Zentrum wurde gezeigt, dass beide GAF-Domänen an der Aktivierung der AC beteiligt sind. Die GAF-Domänen der CyaB2 (GAF A und B) besitzen im Vergleich mit anderen GAF-Domänen ein zusätzliches Strukturelement. Zwischen K und F im NKFDE-Motiv liegen 14 bzw. 19 ASn. Diese Einschübe sind zum einen für die positive Kooperativität der allosterischen Aktivierung durch cAMP verantwortlich. Zum anderen machen sie die für die Stabilität der Bindungstasche wichtige Salzbrücke zwischen Lys und Asp im NKFDE-Motiv entbehrlich. Das für cNMP-bindende GAF-Domänen typische NKFDE-Motiv liegt wie in PDE2A auch in beiden GAF-Domänen der CyaB2 außerhalb der Bindungstasche. Durch Mutation der Aspartate zum Alanin wurde in um die Einschübe verkürzten Konstrukten der CyaB2 die Bedeutung dieses Motivs für die Stabilisierung der Bindungstasche gezeigt. Die Aktivierung der CyaB2 über eine Bindung von cAMP an beide GAF-Domänen läßt vermuten, dass es sich hier um eine evolutionäre Zwischenstufe auf dem Weg zu den GAF-Domänen der Säuger-PDEn handelt.

Durch Austausch der CyaB1-GAF-Domänen gegen die der humanen PDE5A gelang es, eine cGMP-stimulierbare AC zu erzeugen. Die biochemischen Eigenschaften entsprachen dem CyaB1 Holoenzym. Die  $k_{on}$ - und  $k_{off}$ -Werte für die cGMP-Aktivierung waren im Gegensatz zum PDE5 Holoenzym sehr klein. Eine Phosphorylierung des PDE5 GAF-CyaB1-Konstruktes an S102 erbrachte eine geringfügige Erhöhung der spezifischen Aktivität, die Mutante PDE5 GAF S102D-CyaB1 zeigte eine 5-fach erhöhte Affinität zu cGMP. Die Phosphorylierung besaß keine Auswirkungen auf  $k_{on}$ - und  $k_{off}$ -Werte. Mutationen konservierter Aspartate und/oder Lysine in einer oder beiden GAF-Domänen der PDE5 verhinderten die Aktivierung durch cGMP nicht, sondern bewirkten einen 10- bis 23-fachen Anstieg der  $EC_{50}$ -Werte. Bei Mutation in PDE5 GAF B stieg der Aktivierbarkeitsfaktor, möglicherweise hemmt die GAF B-Domäne die cGMP-Bindung in GAF A oder die Signalübertragung zum katalytischen Zentrum. Die Entfernung des 147 AS langen N-Terminus der PDE5 erhöhte die Basalaktivität, senkte den Aktivierbarkeitsfaktor und reduzierte die  $EC_{50}$ . Bis AS P87 stieg der Aktivierbarkeitsfaktor an, zwischen I101 und P109 verringerten sich die  $EC_{50}$ -Werte bei gleichzeitigem Anstieg der Basalaktivität. Es scheint, als hemmte der PDE5 N-Terminus längenabhängig die Bindung von cGMP und die Aktivierung des katalytischen Zentrums.

Untersuchungen zur Nucleotidspezifität in CyaB1 GAF B erfolgten durch Austausch einzelner AS oder ganzer Bereiche gegen AS oder Bereiche der PDE2a GAF B der

Ratte. Die untersuchten Bereiche wurden aufgrund der Kristallstruktur der PDE2A-GAF B ausgewählt. Der Austausch von CyaB1 W270 bis I283 gegen rPDE2a V429 bis Y443 (EL-EIRIP) ergab eine gleichermaßen cAMP- wie cGMP-stimulierbare AC. Dieser Bereich enthält die  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Schleife, in der einige für die Spezifizierung von cGMP wichtige AS zu finden sind. Durch Mutation von T258S und L259V wurde im EL-EIRIP-Konstrukt unter Erhalt der cGMP-Aktivierung ein cAMP-Effekt weitgehend verhindert. Im CyaB1 Holoenzym veränderten die Mutationen T258S und L259V die Spezifität für cAMP nicht. Auch weitere Mutationen in diesem Bereich bestätigten, dass in CyaB1 GAF B zum einen keine einzelnen AS für eine spezifische Bindung von cAMP verantwortlich sind und dass zum anderen von Wechselwirkungen in der Bindungstasche einer untersuchten GAF-Domäne nicht auf den Aufbau und die Funktion anderer GAF-Domänen geschlossen werden kann. Dies bestätigte sich auch dadurch, dass der Austausch von rPDE2a N411 bis Y443 gegen CyaB1 I250 bis I283 in einem Konstrukt aus rPDE2a GAF-Domänen und CyaB1 katalytischer Domäne zu aktivieren, aber weder durch cAMP noch durch cGMP aktivierbaren Chimären führte.

Es wurde versucht eine solche cGMP-aktivierbare Chimäre der CyaB1 (SVFLLDQNEL-EIRIP) zu kristallisieren. Bisher wurden kleine Nadeln erhalten.

# 7 Anhang

## 7.1 DNA- und Proteinsequenzen der verwendeten Gene

### 7.1.1 CyaB1-Holoenzym

Der Ausgangsklon mit dem Gen für CyaB1 [gene ID (DNA): 1105863, Protein: accession No. **D89623.2**, gi 15553050, Acc.nb: BAA13998] wurde von Prof. M. Ohmori, Tokio, zur Verfügung gestellt. Verwendete und durch *silent mutations* eingefügte Schnittstellen sind eingezeichnet. Mutierte AS oder ausgetauschte Bereiche sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Die GAF-Domänen von *cyaB2* & *PDE5* wurden über *BamHI* (vor dem Start liegend) und *XhoI* eingefügt.

ATG	ACT	CTT	CCC	AAT	CCT	GGT	AGC	GTT	TTG	GCT	TCG	TTA	ACA	42 BP
M	T	L	P	N	P	G	S	V	L	A	S	L	T	14 AS
GAA	CTG	ACT	CAA	GTT	AAT	CGT	ACC	CAC	GCT	TTA	TTG	CGT	CGG	84 BP
E	L	T	Q	V	N	R	T	H	A	L	L	R	R	28 AS
GTC	AAA	GAC	CTT	TCT	GTT	AAC	GAA	TTT	GTT	TGC	TTG	CTA	GAC	126 BP
V	K	D	L	S	V	N	E	F	V	C	L	L	D	42 AS
					<i>SfuI</i> (144)						<i>MfeI</i> (161)			
TTT	ATC	ACT	GCC	GAA	<b>TTT CAA</b>	CAA	TTT	CTC	AGA	<b>GCA ATT GAA</b>			168 BP	
F	I	T	A	E	F	Q	Q	F	L	R	A	I	E	56 AS
CTC	ATT	AAT	AAT	GAA	GCT	CTA	GAA	AAT	ATG	TTG	GAG	AAA	GTG	210 BP
L	I	N	N	E	A	L	E	N	M	L	E	K	V	70 AS
TTG	GAA	GCA	ATT	ACA	CTG	AAA	ATC	GGT	CAA	ATT	CTC	CAA	GCA	252 BP
L	E	A	I	T	L	K	I	G	Q	I	L	Q	A	84 AS
GAA	CAT	ACA	GCC	ATT	TTC	TTA	GTT	GAC	TAT	GAT	AAA	TGT	CAA	294 BP
E	H	T	A	I	F	L	V	D	Y	D	K	C	Q	98 AS
TTA	TGG	TCA	AAA	GTA	CCC	CAA	GAT	AAT	GGG	CAG	AAA	TTT	TTA	336 BP
L	W	S	K	V	P	Q	D	N	G	Q	K	F	L	112 AS
									<i>EcoRI</i> (362)					
GAA	ATT	CGT	ACT	CCC	ATT	ACT	GTA	<b>GGA ATT CCT</b>			GGT	CAT	GTT	378 BP
E	I	R	T	P	I	T	V	G	I	P	G	H	V	126 AS
GCT	AGT	ACA	GGT	CAA	TAT	TTA	AAT	ATC	TCA	GAA	ACT	GCT	ACT	420 BP
A	S	T	G	Q	Y	L	N	I	S	E	T	A	T	140 AS
CAT	CCT	TTG	TTT	AGC	CCA	GAA	TTA	GAG	AGA	CAA	ATG	GGC	TAT	462 BP
H	P	L	F	S	P	E	L	E	R	Q	M	G	Y	154 AS
AAG	ATT	AAT	AAT	ATT	TTA	TGT	ATG	CCT	GTC	GTT	AGT	AGC	AAA	504 BP
K	I	N	N	I	L	C	M	P	V	V	S	S	K	168 AS
												<i>PstI</i> (541)		
GAT	CAA	ATT	GTC	GCA	GTA	GTA	CAA	TTA	GCT	AAT	AAG	<b>ACA GGA</b>		546 BP
D	Q	I	V	A	V	V	Q	L	A	N	K	T	G	182 AS
AAT	ATA	CCC	TTC	AAT	CGA	AAT	GAT	GAA	GAG	TCT	TTT	CGT	GAT	588 BP
N	I	P	F	N	R	N	D	E	E	S	F	R	D	196 AS
TTT	GCT	GCT	TCT	ATT	GGG	ATT	ATT	TTA	GAA	ACC	TGT	CAA	TCT	630 BP
F	A	A	S	I	G	I	I	L	E	T	C	Q	S	210 AS
TTT	TAT	GTT	GCA	GCT	CGC	AAT	CAA	CGG	GGA	GTC	ACA	GCA	CTT	672 BP
F	Y	V	A	A	R	N	Q	R	G	V	T	A	L	224 AS

TTA	CGC	GCT	ACT	CAA	ACA	CTA	GGG	CAA	<i>XbaI</i> (702) AGT TTA GAT			TTA	GAG	714 BP		
L	R	A	T	Q	T	L	G	Q	S	L	D	L	E	238 AS		
GCT	ACT	TTG	CAA	ATA	GTG	ATG	GAA	CAA	GCC	CGA	ATT	TTG	ATG	756 BP		
A	T	L	Q	I	V	M	E	Q	A	R	I	L	M	252 AS		
CAG	GCA	GAC	CGC	AGC	ACA	TTA	TTT	CTG	TAT	CGC	AAA	GAA	ATG	798 BP		
Q	A	D	R	S	T	L	F	L	Y	R	K	E	M	266 AS		
GGC	GAA	CTC	TGG	ACT	AAA	GTA	GCA	GCA	GCA	GCA	GAT	ACC	ACA	840 BP		
G	E	L	W	T	K	V	A	A	A	A	D	T	T	280 AS		
CAG	TTA	ATA	GAA	ATT	CGG	ATT	CCG	GCG	AAT	CGC	GGT	ATT	GTC	882 BP		
Q	L	I	E	I	R	I	P	A	N	R	G	I	V	294 AS		
GGC	TAT	GTG	GCA	TCT	ACA	GGC	GAT	GCG	CTG	AAT	ATC	TCT	GAT	924 BP		
G	Y	V	A	S	T	G	D	A	L	N	I	S	D	308 AS		
GCT	TAT	AAA	GAC	CCC	CGG	TTT	GAT	CCA	ACA	ACA	GAC	AGA	AAA	966 BP		
A	Y	K	D	P	R	F	D	P	T	T	D	R	K	322 AS		
ACA	GGC	TAT	TTG	ACC	AGA	AAT	ATT	TTG	TGT	TTG	CCA	GTC	TTT	1008 BP		
T	G	Y	L	T	R	N	I	L	C	L	P	V	F	336 AS		
AAT	TCA	GCC	AAT	GAA	TTG	ATC	GGA	GTA	ACA	CAG	TTA	ATT	AAT	1050 BP		
N	S	A	N	E	L	I	G	V	T	Q	L	I	N	350 AS		
AAG	CAA	CAA	GGA	AGT	TTT	ACG	GCT	TCT	GAT	GAA	GAG	TTT	ATG	1092 BP		
K	Q	Q	G	S	F	T	A	S	D	E	E	F	M	364 AS		
CGG	GCT	TTT	AAT	ATT	CAA	GCC	GGA	GTT	GCT	TTA	GAA	AAT	GCT	1134 BP		
R	A	F	N	I	Q	A	G	V	A	L	E	N	A	378 AS		
									<i>XhoI</i> (1156) CTA GAA							
CGT	TTA	TTT	GAA	AAT	GTA	TTA	CTA	GAA	AAA	CAA	TAT	CAA	AAA	1176 BP		
R	L	F	E	N	V	L	L	E	K	Q	Y	Q	K	392 AS		
				<i>HindIII</i> (1188) CA A GC TT G												
GAC	ATT	TTA	CA	A	GC	TT	G	TCA	GAT	GCT	GTA	ATT	TCT	ACA	GAT	1218 BP
D	I	L	Q	S	L	S	D	A	V	I	S	T	D			406 AS
ATG	GCC	GGG	AGA	ATT	GTC	ACA	ATT	AAT	GAT	GCA	GCC	TTG	GAA			1260 BP
M	A	G	R	I	V	T	I	N	D	A	A	L	E			420 AS
TTA	CTC	GGT	TGT	CCT	TTA	GGT	GAT	GCT	AAT	CAT	AAA	AGT	AAT			1302 BP
L	L	G	C	P	L	G	D	A	N	H	K	S	N			434 AS
AAG	CTG	CTG	TGG	GAA	CAA	AAT	TTA	ATT	GGT	CGC	GTA	GTT	TGG			1344 BP
K	L	L	W	E	Q	N	L	I	G	R	V	V	W			448 AS
				<i>MfeI</i> (1355) CCA ATT GAA												
GAA	ATT	GTA	CCA	ATT	GAA	AAT	TTG	CAG	ATG	CGC	TTA	GAA	GAT			1386 BP
E	I	V	P	I	E	N	L	Q	M	R	L	E	D			462 AS
AGT	TTA	AAA	AGT	GGT	GCT	AAA	CAT	TAT	GTG	CCA	GAA	CAA	AGT			1428 BP
S	L	K	S	G	A	K	H	Y	V	P	E	Q	S			476 AS
TTG	ATA	GTG	GGA	ATT	TAT	CAA	TTA	CAA	ATG	TCT	GAA	AGT	CGG			1470 BP
L	I	V	G	I	Y	Q	L	Q	M	S	E	S	R			490 AS
GTT	TTG	CAT	GAA	ACT	CAA	GAC	TAC	TCT	ATT	TTG	ACA	GTA	CGC			1512 BP
V	L	H	E	T	Q	D	Y	S	I	L	T	V	R			504 AS
GAT	CGC	ATC	AAC	CCA	GAT	ATT	TTT	CTC	CCC	TGG	AAT	TTA	CCC			1554 BP
D	R	I	N	P	D	I	F	L	P	W	N	L	P			518 AS
CAA	ACC	CCC	CAG	TCG	CAA	TTT	ATC	ACC	CCG	GAA	GAA	GTA	CAA			1596 BP
Q	T	P	Q	S	Q	F	I	T	P	E	E	V	Q			532 AS
ATC	TTA	GAA	CGC	AGT	ATT	AAT	CTT	ACC	GTT	AAT	CCT	TTG	ACG			1638 BP
I	L	E	R	S	I	N	L	T	V	N	P	L	T			546 AS
AAC	CCA	GAA	GGC	GGT	GTC	CGT	GGT	GGT	TTG	GTA	GTT	TTG	GAA			1680 BP
N	P	E	G	G	V	R	G	G	L	V	V	L	E			560 AS
GAT	ATT	AGT	CAA	GAG	AAG	CGC	CTC	AAA	ACT	ACT	ATG	TAT	CGC			1722 BP
D	I	S	Q	E	K	R	L	K	T	T	M	Y	R			574 AS
TAC	CTT	ACA	CCC	CAT	GTA	GCT	GAA	CAG	GTA	ATG	GCT	TTA	GGG			1764 BP
Y	L	T	P	H	V	A	E	Q	V	M	A	L	G			588 AS
GAA	GAT	GCC	TTA	ATG	GTT	GGT	GAA	CGC	AAG	GAG	GTG	ACT	GTT			1806 BP
E	D	A	L	M	V	G	E	R	K	E	V	T	V			602 AS
				<i>EcoRV</i> (1818) GAT ATC												
TTA	TTT	TCA	GAT	ATC	CGA	GGC	TAC	ACC	ACA	CTT	ACG	GAA	AAT			1848 BP
L	F	S	D	I	R	G	Y	T	T	L	T	E	N			616 AS
CTA	GGT	GCG	GCT	GAA	GTG	GTA	TCA	CTC	CTG	AAC	CAA	TAT	TTT			1890 BP
L	G	A	A	E	V	V	S	L	L	N	Q	Y	F			630 AS
GAA	ACA	ATG	GTT	GAA	GCA	GTT	TTC	AAC	TAT	GAA	GGC	ACA	CTG			1932 BP
E	T	M	V	E	A	V	F	N	Y	E	G	T	L			644 AS
GAT	AAA	TTT	ATC	GGT	GAT	GCT	TTA	ATG	GCT	GTT	TTT	GGT	GCG			1974 BP
D	K	F	I	G	D	A	L	M	A	V	F	G	A			658 AS

CCA	CTA	CCA	CTC	ACA	GAA	AAT	CAT	GCT	TGG	CAA	GCA	GTA	CAG	2016 BP
P	L	P	L	T	E	N	H	A	W	Q	A	V	Q	672 AS
TCA	GCA	TTA	GAT	ATG	CGC	CAA	CGC	CTG	AAG	GAA	TTT	AAC	CAA	2058 BP
S	A	L	D	M	R	Q	R	L	K	E	F	N	Q	686 AS
CGA	CGC	ATC	ATT	CAG	GCA	CAA	CCA	CAA	ATC	AAA	ATC	GGT	ATT	2100 BP
R	R	I	I	Q	A	Q	P	Q	I	K	I	G	I	700 AS
GGT	ATT	AGT	TCT	GGA	GAA	GTA	GTT	TCT	GGT	AAC	ATC	GGT	TCT	2142 BP
G	I	S	S	G	E	V	V	S	G	N	I	G	S	714 AS
CAC	AAG	CGT	ATG	GAT	TAC	ACA	GTC	ATT	GGT	GAT	GGT	GTG	AAT	2184 BP
H	K	R	M	D	Y	T	V	I	G	D	G	V	N	728 AS
TTA	AGT	TCC	CGC	TTG	GAA	ACT	GTC	ACC	AAA	GAA	TAT	GGC	TGT	2226 BP
L	S	S	R	L	E	T	V	T	K	E	Y	G	C	742 AS
GAT	ATT	ATC	CTC	AGT	GAG	TTT	ACT	TAC	CAA	TTA	TGC	AGC	GAT	2268 BP
D	I	I	L	S	E	F	T	Y	Q	L	C	S	D	756 AS
CGC	ATT	TGG	GTA	CGT	CAG	TTA	GAT	AAA	ATC	CGA	GTC	AAA	GGG	2310 BP
R	I	W	V	R	Q	L	D	K	I	R	V	K	G	770 AS
AAA	CAC	CAA	GCT	GTC	AAT	ATC	TAT	GAG	TTG	ATT	AGC	GAT	CGC	2352 BP
K	H	Q	A	V	N	I	Y	E	L	I	S	D	R	784 AS
<i>ScaI</i> (2353)														
<u>AGT ACT</u>		CCC	TTA	GAT	GAC	AAC	ACC	CAA	GAG	TTC	CTC	TTT	CAC	2394 BP
S	T	P	L	D	D	N	T	Q	E	F	L	F	H	798 AS
TAT	CAT	AAT	GGT	CGG	ACT	GCC	TAC	TTA	GTC	CGC	GAT	TTT	ACC	2436 BP
Y	H	N	G	R	T	A	Y	L	V	R	D	F	T	812 AS
CAG	GCG	ATC	GCT	TGT	TTT	AAC	TCA	GCT	AAA	CAT	ATT	CGA	CCC	2478 BP
Q	A	I	A	C	F	N	S	A	K	H	I	R	P	826 AS
ACA	GAC	CAA	GCT	GTC	AAT	ATT	CAC	CTA	GAA	CGC	GCC	TAC	AAT	2520 BP
T	D	Q	A	V	N	I	H	L	E	R	A	Y	N	840 AS
TAT	CAA	CAA	ACT	CCA	CCA	CCT	CCT	CAA	TGG	GAC	GGC	GTA	TGG	2562 BP
Y	Q	Q	T	P	P	P	P	Q	W	D	G	V	W	854 AS
ACA	ATT	TTC	ACA	AAG	TAG									2580 BP
T	I	F	T	K	.									859 AS

### 7.1.2 CyaB2: N-Terminus–GAF A und B

Der Ausgangsklon mit dem Gen für CyaB2 [gene ID (DNA): 1105496, Protein: accession No. **D89624.1**, gi 1754640, Acc.nb: BAA13999] wurde von Prof. M. Ohmori, Tokio, zur Verfügung gestellt. Verwendete und durch *silent mutations* eingefügte Schnittstellen sind eingezeichnet. Mutierte AS oder ausgetauschte Bereiche sind durch Fettdruck gekennzeichnet. Der N-Terminus und die CyaB2 GAF-Domänen (AS M1-K441) von wurden über *BamHI* (vor dem Start liegend) und *XhoI* eingefügt.

atg	tca	ttg	caa	cag	cgt	aat	ttt	ggg	gag	act	ggc	gat	ttg	42 BP
M	S	L	Q	Q	R	N	F	G	E	T	G	D	L	14 AS
atc	tta	ggt	acg	caa	aac	caa	gag	caa	aac	ttg	cca	gaa	act	84 BP
I	L	G	T	Q	N	Q	E	Q	N	L	P	E	T	28 AS
tcg	gct	cct	gtc	ggc	aca	cta	gcc	cgc	aga	aaa	ggt	act	att	126 BP
S	A	P	V	G	T	L	A	R	R	K	G	T	I	42 AS
tcg	aca	ttt	ctt	gct	ccc	tta	act	cag	gat	act	ttt	aaa	caa	168 BP
S	T	F	L	A	P	L	T	Q	D	T	F	K	Q	56 AS
gtt	gtt	aca	gaa	gtc	gag	caa	aaa	ctc	caa	att	gtg	cat	caa	210 BP
<i>V<sub>krist</sub></i>	V	T	E	V	E	Q	K	L	Q	I	V	H	Q	70 AS
acc	ctg	tca	atg	ttg	gat	tct	cac	ggg	ttt	gaa	aat	atc	ctg	252 BP
T	L	S	M	L	D	S	H	G	F	E	N	I	L	84 AS
caa	gag	atg	ttg	cag	tca	att	acc	tta	aaa	act	ggg	gaa	ttg	294 BP
Q	E	M	L	Q	S	I	T	L	K	T	G	E	L	98 AS

ttg	ggg	gca	gat	cgg	acg	act	ata	ttt	ttg	cta	gat	gaa	gaa	336 BP		
L	G	A	D	R	T	T	I	F	L	L	D	E	E	112 AS		
aaa	caa	gaa	ttg	tgg	tcg	att	gtc	gcc	gcc	gga	gaa	ggc	gat	378 BP		
K	Q	E	L	W	S	I	V	A	A	G	E	G	D	126 AS		
cgc	tcc	cta	gaa	att	cgc	atc	ccc	gcc	gac	aag	ggg	att	gcc	420 BP		
R	S	L	E	I	R	I	P	A	D	K	G	I	A	140 AS		
ggt	gaa	gtc	gct	act	ttt	aaa	caa	gta	gtt	aat	ata	ccc	ttt	462 BP		
G	E	V	A	T	F	K	Q	V	V	N	I	P	F	154 AS		
gac	ttt	tat	cac	gat	cct	cgg	tcg	ata	ttt	gcc	caa	aaa	caa	504 BP		
D	F	Y	H	D	P	R	S	I	F	A	Q	K	Q	168 AS		
gag	aaa	atc	act	ggc	tac	cgc	aca	tat	aca	atg	ctg	gct	tta	546 BP		
E	K	I	T	G	Y	R	T	Y	T	M	L	A	L	182 AS		
ccg	cta	ttg	agt	gag	caa	ggg	cga	tta	gtc	gcg	gtg	gta	cag	588 BP		
P	L	L	S	E	Q	G	R	L	V	A	V	V	Q	196 AS		
tta	ctc	aac	aaa	tta	aaa	cct	tac	agt	cct	cct	gat	gca	ct <sup>g</sup>	630 BP		
L	L	N	K	L	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	210 AS		
<i>NheI</i> (630)																
cta	gc	a	gaa	cgg	att	gat	aat	caa	ggt	ttt	acc	agt	gca	gat	672 BP	
<b>L</b>	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	D	N	Q	G	F	T	S	A	<b>D</b>	224 AS		
<i>MfeI</i> (676)																
gag	caa	ttg	ttt	caa	gaa	ttt	gcg	ccc	tca	att	cgc	ttg	att	714 BP		
E	Q	L	F	Q	E	F	A	P	S	I	R	L	I	238 AS		
ttg	gag	tcg	tca	cgc	tcc	ttt	tat	ata	gcg	acg	caa	aaa	caa	756 BP		
L	E	S	S	R	S	F	Y	I	A	T	Q	K	Q	252 AS		
agg	gcg	gcg	gcg	gcg	atg	atg	aag	gcg	gta	aag	tct	ctg	agc	798 BP		
R	A	A	A	A	M	M	K	A	V	K	S	L	S	266 AS		
<i>XbaI<sub>methyl</sub></i> (813)																
caa	agt	agt	ctg	ga	t	(C/t)ta	ga	a	gat	acc	ctc	aaa	cgg	gta	atg	840 BP
Q	S	S	L	D	L	E	D	T	L	K	R	V	M	280 AS		
gat	gaa	gcc	aag	gaa	ctg	atg	aac	gcc	gat	cgc	agt	acc	tta	882 BP		
D	E	A	K	E	L	M	N	A	D	R	S	T	L	294 AS		
tgg	ctg	ata	gac	cgc	gat	cgc	cat	gaa	tta	tgg	acg	aaa	att	924 BP		
W	L	I	D	R	D	R	H	E	L	W	T	K	I	308 AS		
act	caa	gat	aat	ggt	tct	act	aag	gag	ttg	cgc	gtt	ccc	ata	966 BP		
T	Q	D	N	G	S	T	K	E	L	R	V	P	I	322 AS		
ggt	aaa	ggt	ttt	gcc	ggg	atc	gtc	gcc	gca	tcc	ggt	caa	aaa	1008 BP		
G	K	G	F	A	G	I	V	A	A	S	G	Q	K	336 AS		
ctc	aac	atc	cct	ttt	gat	tta	tac	gac	cat	cca	gac	tcg	gca	1050 BP		
L	N	I	P	F	D	L	Y	D	H	P	D	S	A	350 AS		
act	gcc	aaa	caa	atc	gac	cag	caa	aat	ggc	tac	cgc	acc	tgt	1092 BP		
T	A	K	Q	I	D	Q	Q	N	G	Y	R	T	C	364 AS		
agt	tta	tta	tgt	atg	cct	gta	ttt	aac	ggc	gac	caa	gaa	tta	1134 BP		
S	L	L	C	M	P	V	F	N	G	D	Q	E	L	378 AS		
att	ggt	gtg	acc	caa	ctg	gta	aat	aaa	aag	aaa	acc	gga	gag	1176 BP		
I	G	V	T	Q	L	V	N	K	<b>K<sub>G</sub></b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	392 AS		
ttc	ccc	ccc	tat	aat	cca	gaa	act	tgg	cgg	ata	gcg	ccc	gaa	1218 BP		
<b>F</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>W</b>	<b>P</b>	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	406 AS		
<i>EcoRI</i> (1252)																
tgc	ttc	caa	gcg	agt	ttt	gac	cgc	aac	gac	gaa	gaa	ttc	atg	1260 BP		
<b>C</b>	<b>F</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	420 AS		

<i>HindIII</i> (1262)																
g	aa	gct	t	tt	aat	att	caa	gcc	ggg	gtg	gct	tta	caa	aat	gct	1302 BP
E	A	F	N	I	Q	A	G	V	A	L	Q	N	A		434 AS	
cag	ttg	ttt	gcc	aca	gtc	aag									1323 BP	
Q	L	F	A	T	V	K	<b>XhoI</b>								441 AS	

### 7.1.3 rPDE2a: GAF A und B(AS E207-N546)

Aus einer cDNA-Bank aus Rattendarm wurden per PCR (siehe [15]) die GAF-Domänen der rPDE2a von E207 bis N546 (mit *SfuI*, *XbaI* & *XhoI*) erhalten [Protein: accession No. **NM\_031079.1**, gi 13592021, Acc.nb: NP\_112341] Für diese Klonierung wurden *Maus*-PDE2-Primer verwendet [15]. Der Primer *mouse sfu neu s* ([15], Seite 56) führte allerdings statt der A212 zu D212, die in allen folgenden Konstrukten als D212 vorliegt. Es ist nur die Sequenz der über *SfuI* & *XhoI* in die *CyaB1* eingebauten GAF-Domänen aufgeführt, verwendete und durch *silent mutations* eingefügte Schnittstellen und Bereiche sind gekennzeichnet. Die Nummerierung der Basenpaare und Aminosäuren bezieht sich auf das Ratten-PDE2a Holoenzym, inkl. N-Terminus (rPDE2a). Auch der Anlagerungsort der verwendeten Klonierungsprimer (Seite 18ff.) nimmt darauf Bezug.

<i>SfuI</i>																
<i>gaA</i>	aag	gga	tac	acc	gcc	cat	gac	cga	aag	atc	ctg	caa	ctg	660 BP		
E	K	G	Y	T	<b>D</b>	H	D	R	K	I	L	Q	L	220 AS		
tgt	gga	gaa	ctc	tat	gac	ttg	gat	gcc	act	tct	ctg	cag	ctc	702 BP		
C	G	E	L	Y	D	L	D	A	T	S	L	Q	L	234 AS		
<i>EcoRV</i> (715)																
aaa	gtc	ctt	c	ga	tat	c	tt	cag	cag	gag	aca	cag	gcc	act	cac	744 BP
K	V	L	R	Y	L	Q	Q	E	T	Q	A	T	H	248 AS		
tgc	tgc	ctc	ctg	ctg	gtg	tca	gag	gac	aac	ctg	cag	ctt	tcc	786 BP		
C	C	L	L	L	V	S	E	D	N	L	Q	L	S	262 AS		
tgc	aag	gtc	att	gga	gag	aaa	gtg	ctg	gga	gaa	gag	gtc	agc	828 BP		
C	K	V	I	G	E	K	V	L	G	E	E	V	S	276 AS		
<i>NcoI</i> (839)																
ttt	cca	ttg	a	cc	atg	g	ga	cgc	ctg	ggc	cag	gtg	gtg	gag	gac	870 BP
F	P	L	T	M	G	R	L	G	Q	V	V	E	D	290 AS		
aaa	cag	tgt	atc	cag	ttg	aag	gac	cta	acc	tct	gac	gat	gtg	912 BP		
K	Q	C	I	Q	L	K	D	L	T	S	D	D	V	304 AS		
<i>AflIII</i> (926)																
caa	cag	cta	caa	a	ac	atg	t	tg	ggc	tgt	gag	ctt	cg	gct	atg	954 BP
Q	Q	L	Q	N	M	L	G	C	E	L	R	A	M	318 AS		
cta	tgt	gtc	cct	gtc	atc	agt	cga	gcc	act	gac	cag	gtg	gtg	996 BP		
L	C	V	P	V	I	S	R	A	T	D	Q	V	V	332 AS		
<i>HindIII</i> (1018)																
gcc	ctg	gct	tgc	gcc	ttc	aac	aag	ctt	gga	gga	gac	ttc	ttc	1038 BP		
A	L	A	C	A	F	N	K	L	G	G	D	F	F	346 AS		
aca	gat	gag	gat	gaa	cgt	gcg	atc	caa	cac	tgc	ttc	cac	tac	1080 BP		
T	D	E	D	E	R	A	I	Q	H	C	F	H	Y	360 AS		
aca	ggc	acg	gtg	ctc	acc	agt	acc	ttg	gcc	ttc	cag	aag	gag	1122 BP		
T	G	T	V	L	T	S	T	L	A	F	Q	K	E	374 AS		



7.1 DNA- und Proteinsequenzen der verwendeten Gene

tca	tac	ttt	gtt	aga	aaa	gcc	acc	aga	gaa	atg	gtc	aat	gca	168 BP
S	Y	F	V	R	K	A	T	R	E	M	V	N	A	56 AS
tgg	ttt	gct	gag	aga	gtt	cac	acc	atc	cct	gtg	tgc	aag	gaa	210 BP
W	F	A	E	R	V	H	T	I	P	V	C	K	E	70 AS
ggt	atc	aga	ggc	cac	acc	gaa	tct	tgc	tct	tgt	ccc	ttg	cag	252 BP
G	<b>I</b>	R	G	H	T	E	S	C	S	C	P	L	Q	84 AS
cag	agt	cct	cg	gca	gat	aac	agt	gtc	cct	gga	aca	cca	acc	294 BP
Q	S	<b>P</b>	R	A	D	N	S	V	P	G	T	P	T	98 AS
agg	aaa	atc	tct	gcc	tct	gaa	ttt	gac	cg	cct	ctt	aga	ccc	336 BP
R	K	<b>I</b>	<b>S</b>	A	S	E	F	D	R	<b>P</b>	L	R	P	112 AS
att	gtt	gtc	aag	gat	tct	gag	gga	act	gtg	agc	ttc	ctc	tct	378 BP
I	V	V	K	D	S	E	G	<b>T</b>	V	S	F	L	S	126 AS
gac	tca	gaa	aag	aag	gaa	cag	atg	cct	cta	acc	cct	cca	agg	420 BP
D	S	E	K	K	E	Q	M	P	L	T	P	P	R	140 AS
ttt	gat	cat	gat	gaa	ggg	gac	cag	tgc	tca	aga	ctc	ttg	gaa	462 BP
F	D	H	D	E	G	D	<b>Q</b>	C	S	R	L	L	E	154 AS
tta	gtg	aag	gat	att	tct	agt	cat	ttg	gat	gtc	aca	gcc	tta	504 BP
L	V	K	D	I	S	S	H	L	D	V	T	A	L	168 AS
								<i>NcoI</i> (528)					<i>EcoRV</i> (538)	
tgt	cac	aaa	att	ttc	ttg	cat	at	<i>c cat gg a</i>	ctg	<i>ata tct</i>	gct			546 BP
C	H	K	I	F	L	H	I	H	G	L	I	S	A	182 AS
gac	cg	tat	tcc	ctg	ttc	ctt	gtc	tgt	gaa	gac	agc	tcc	aat	588 BP
D	R	Y	S	L	F	L	V	C	E	D	S	S	N	196 AS
gac	aag	ttt	ctt	atc	agc	cg	ctc	ttt	gat	ggt	gct	gaa	ggt	630 BP
D	K	F	L	I	S	R	L	F	D	V	A	E	G	210 AS
tca	aca	ctg	gaa	gaa	gtt	tca	aat	aac	tgt	atc	cg	tta	gaa	672 BP
S	T	L	E	E	V	S	N	N	C	I	R	L	E	224 AS
tgg	aac	aaa	ggc	att	gtg	gga	cat	gtg	gca	gcg	ctt	ggt	gag	714 BP
W	N	K	G	I	V	G	H	V	A	A	L	G	E	238 AS
								<i>NdeI</i> (734)	<i>BamHI</i> (741)					
ccc	ttg	aac	atc	aaa	gat	g	<i>ca tat g a</i>	<i>g gat cc</i>	t	cg	ttc	aat		756 BP
P	L	N	I	K	D	A	Y	E	D	P	R	F	N	252 AS
gca	gaa	gtt	gac	caa	att	aca	ggc	tac	aag	aca	caa	agc	att	798 BP
A	E	V	D	Q	I	T	G	Y	K	T	Q	S	I	266 AS
ctt	tgt	atg	cca	att	aag	aat	cat	agg	gaa	gag	gtt	ggt		840 BP
L	C	M	P	I	K	N	H	R	E	E	V	V	G	280 AS
gta	gcc	cag	gcc	atc	aac	aag	aaa	tca	gga	aac	ggt	ggg	aca	882 BP
V	A	Q	A	I	N	<b>K</b>	K	S	G	N	G	G	T	294 AS
ttt	act	gaa	aaa	gat	gaa	aag	gac	ttt	gct	gct	tat	ttg	gca	924 BP
F	T	E	K	<b>D</b>	E	K	D	F	A	A	Y	L	A	308 AS
ttt	tgt	ggt	att	gtt	ctt	cat	aat	gct	cag	ctc	tat	gag	act	966 BP
F	C	G	I	V	L	H	N	A	Q	L	Y	E	T	322 AS
tca	ctg	ctg	gag	aac	aag	aga	aat	cag	gtg	ctg	ctt	gac	ctt	1008 BP
S	L	L	E	N	K	R	N	Q	V	L	L	D	L	336 AS
										<i>XbaI</i> (1038)				
gct	agt	tta	att	ttt	gaa	gaa	caa	caa	tc	<i>t cta ga a</i>	gta	att		1050 BP
A	S	L	I	F	E	E	Q	Q	S	L	E	V	I	350 AS
ttg	aag	aaa	ata	gct	gcc	act	att	atc	tct	ttc	atg	caa	gtg	1092 BP
L	K	K	I	A	A	T	I	I	S	F	M	Q	V	364 AS
cag	aaa	tgc	acc	att	ttc	ata	gtg	gat	gaa	gat	tgc	tcc	gat	1134 BP
Q	K	C	T	I	F	I	V	D	E	D	C	S	D	378 AS

tct	ttt	tct	agt	gtg	ttt	cac	atg	gag	tgt	gag	gaa	tta	gaa	1176 BP		
S	F	S	S	V	F	H	M	E	C	E	E	L	E	392 AS		
aaa	tca	tct	gat	aca	tta	aca	agg	gaa	cat	gat	gca	aac	aaa	1218 BP		
K	S	S	D	T	L	T	R	E	H	D	A	N	K	406 AS		
atc	aat	tac	atg	tat	gct	cag	tat	gtc	aaa	aat	act	atg	gaa	1260 BP		
I	N	Y	M	Y	A	Q	Y	V	K	N	T	M	E	420 AS		
cca	ctt	aat	atc	cca	gat	gtc	agt	aag	gat	aaa	aga	ttt	ccc	1302 BP		
P	L	N	I	P	D	V	S	K	D	K	R	F	P	434 AS		
tgg	aca	act	gaa	aat	aca	gga	aat	gta	aac	cag	cag	tgc	att	1344 BP		
W	T	T	E	N	T	G	N	V	N	Q	Q	C	I	448 AS		
				<i>BsrGI</i> (1356)												
aga	agt	ttg	ctt	<i>tgt aca</i>		cct	ata	aaa	aat	gga	aag	aag	aat	1386 BP		
R	S	L	L	C	T	P	I	K	N	G	K	K	N	462 AS		
aaa	gtt	ata	ggg	gtt	tgc	caa	ctt	gtt	aat	aag	atg	gag	gag	1428 BP		
K	V	I	G	V	C	Q	L	V	N	<b>K</b>	M	E	E	476 AS		
aat	act	ggc	aag	gtt	aag	cct	ttc	aac	cga	aat	gac	gaa	cag	1470 BP		
N	T	G	K	V	K	P	F	N	R	N	<b>D</b>	E	Q	490 AS		
		<i>HindIII</i> (1478)									<i>BamHI</i> (1505)					
ttt	ctg	g	<i>aa gct t</i>		tt	gtc	atc	ttt	tgt	ggc	ttg	g	<i>gg atc c</i>		ag	1512 BP
F	L	E	A	F	V	I	F	C	G	L	G	G	I	Q		504 AS
aac	acg	cag	atg	tat	gaa	gca	gtg	gag	<b>GTC</b>	<b>GAG</b>						1545 BP
N	T	Q	M	Y	E	A	V	E	<b>V</b>	<b>E</b>						515 AS

# Literaturverzeichnis

- [1] S. E. Martinez, A. Y. Wu, N. A. Glavas, X. B. Tang, S. Turley, W. G. Hol, and J. A. Beavo. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(20):13260–5, 2002.
- [2] Y. S. Ho, L. M. Burden, and J. H. Hurley. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.*, 19(20):5288–99, 2000.
- [3] C. Mehats, C. B. Andersen, M. Filopanti, S. L. Jin, and M. Conti. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol. Metab.*, 13(1):29–35, 2002.
- [4] V. Anantharaman, E. V. Koonin, and L. Aravind. Regulatory potential, phylogenetic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J. Mol. Biol.*, 307(5):1271–92, 2001.
- [5] L. Aravind and E. V. Koonin. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J. Mol. Biol.*, 287:1023–1040, 1999.
- [6] L. Aravind and C. P. Ponting. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 22(12):458–9, 1997.
- [7] P. Ponting, C and L. Aravind. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.*, 7:R674–R677, 1997.
- [8] B. L. Taylor and I. B. Zhulin. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(2):479–506, 1999.
- [9] C. A. Amezcua, S. M. Harper, J. Rutter, and K. H. Gardner. Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation. *Structure*, 10(10):1349–61, 2002.
- [10] M. H. Hefti, K. J. Francoijs, S. C. de Vries, R. Dixon, and J. Vervoort. The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *Eur. J. Biochem.*, 271(6):1198–208, 2004.

- [11] A. Pandini and L. Bonati. Conservation and specialization in PAS domain dynamics. *Protein Eng. Des. Sel.*, 18(3):127–37, 2005.
- [12] S. E. Martinez, J. A. Beavo, and W. G. Hol. GAF Domains: Two-Billion-Year-Old Molecular Switches that Bind Cyclic Nucleotides. *Mol. Interv.*, 2(5):317–23, 2002.
- [13] R. Little and R. Dixon. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. *J. Biol. Chem.*, 278(31):28711–8, 2003.
- [14] T. Kanacher, A. Schultz, J. U. Linder, and J. E. Schultz. A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.*, 21(14):3672–80, 2002.
- [15] Tobias Kanacher. *Die Adenylatcyclase CyaB1 aus Anabaena sp. PCC 7120 ist ein cAMP-sensitives Protein*. PhD Thesis, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2003.
- [16] R. Zoraghi, J. D. Corbin, and S. H. Francis. Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol. Pharmacol.*, 65(2):267–78, 2003.
- [17] J. H. Hurley. GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. *Science's Stke*, 2003(164):PE1, 2003.
- [18] H. Charbonneau, R. K. Prusti, H. LeTrong, W. K. Sonnenburg, P. J. Mullaney, K. A. Walsh, and J. A. Beavo. Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(1):288–92, 1990.
- [19] J. D. Corbin and S. H. Francis. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J. Biol. Chem.*, 274(20):13729–32, 1999.
- [20] S. H. Soderling and J. A. Beavo. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12(2):174–9, 2000.
- [21] W. K. Sonnenburg, P. J. Mullaney, and J. A. Beavo. Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *J. Biol. Chem.*, 266(26):17655–61, 1991.
- [22] M. Groß-Langenhoff, K. Hofbauer, J. Weber, A. Schultz, and J.E. Schultz. cAMP is the ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. *unpublished, sent to J. Biol. Chem.*, 2005.

- [23] D. Huang, T. R. Hinds, S. E. Martinez, C. Doneanu, and J. A. Beavo. Molecular determinants of cGMP binding to chicken cone photoreceptor phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, 279(46):48143–51, 2004.
- [24] S. D. Rybalkin, I. G. Rybalkina, M. Shimizu-Albergine, X. B. Tang, and J. A. Beavo. PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *EMBO J.*, 22(3):469–78, 2003.
- [25] A. Y. Wu, X. B. Tang, S. E. Martinez, K. Ikeda, and J. A. Beavo. Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A. *J. Biol. Chem.*, 279(36):37928–38, 2004.
- [26] A. E. Granovsky, M. Natchin, R. L. McEntaffer, T. L. Haik, S. H. Francis, J. D. Corbin, and N. O. Artemyev. Probing domain functions of chimeric PDE6 $\alpha'$ /PDE5 cGMP-phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, 273(38):24485–90, 1998.
- [27] L. M. McAllister-Lucas, T. L. Haik, J. L. Colbran, W. K. Sonnenburg, D. Seger, I. V. Turko, J. A. Beavo, S. H. Francis, and J. D. Corbin. An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, 270(51):30671–9, 1995.
- [28] I. V. Turko, S. H. Francis, and J. D. Corbin. Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation. *Biochem. J.*, 329(Pt 3):505–10, 1998.
- [29] I. V. Turko, S. H. Francis, and J. D. Corbin. Studies of the molecular mechanism of discrimination between cGMP and cAMP in the allosteric sites of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J. Biol. Chem.*, 274(41):29038–41, 1999.
- [30] I. V. Turko, T. L. Haik, L. M. McAllister-Lucas, F. Burns, S. H. Francis, and J. D. Corbin. Identification of key amino acids in a conserved cGMP-binding site of cGMP-binding phosphodiesterases. A putative NKXnD motif for cGMP binding. *J. Biol. Chem.*, 271(36):22240–4, 1996.
- [31] S. Sopory, S. Balaji, N. Srinivasan, and S. S. Visweswariah. Modeling and mutational analysis of the GAF domain of the cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase, PDE5. *FEBS Lett.*, 539(1-3):161–6, 2003.
- [32] S. Laxman, A. Rascon, and J. A. Beavo. Trypanosome cyclic nucleotide phosphodiesterase 2B binds cAMP through its GAF-A domain. *J. Biol. Chem.*, 280(5):3771–9, 2005.

- [33] J. D. Corbin, I. V. Turko, A. Beasley, and S. H. Francis. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur. J. Biochem.*, 267(9):2760–7, 2000.
- [34] R. Zoraghi, E. P. Bessay, J. D. Corbin, and S. H. Francis. Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. *J. Biol. Chem.*, 280(12):12051–63, 2005.
- [35] S. H. Francis, E. P. Bessay, J. Kotera, K. A. Grimes, L. Liu, W. J. Thompson, and J. D. Corbin. Phosphorylation of isolated human phosphodiesterase-5 regulatory domain induces an apparent conformational change and increases cGMP binding affinity. *J. Biol. Chem.*, 277(49):47581–7, 2002.
- [36] V. K. Gopal, S. H. Francis, and J. D. Corbin. Allosteric sites of phosphodiesterase-5 (PDE5). A potential role in negative feedback regulation of cGMP signaling in corpus cavernosum. *Eur. J. Biochem.*, 268(11):3304–12, 2001.
- [37] F. Mullershausen, A. Friebe, R. Feil, W. J. Thompson, F. Hofmann, and D. Koesling. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J. Cell Biol.*, 160(5):719–27, 2003.
- [38] F. Mullershausen, M. Russwurm, D. Koesling, and A. Friebe. In vivo reconstitution of the negative feedback in nitric oxide/cGMP signaling: role of phosphodiesterase type 5 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell*, 15(9):4023–30, 2004.
- [39] S. D. Rybalkin, I. G. Rybalkina, R. Feil, F. Hofmann, and J. A. Beavo. Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 277(5):3310–7, 2002.
- [40] L. Liu, T. Underwood, H. Li, R. Pamukcu, and W. J. Thompson. Specific cGMP binding by the cGMP binding domains of cGMP-binding cGMP specific phosphodiesterase. *Cell. Signal.*, 14(1):45–51, 2002.
- [41] M. K. Thomas, S. H. Francis, and J. D. Corbin. Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J. Biol. Chem.*, 265(25):14971–8, 1990.
- [42] A. Gal, U. Orth, W. Baehr, E. Schwinger, and T. Rosenberg. Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase  $\beta$ -subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat. Genet.*, 7:64–67, 1994.
- [43] S. H. Francis, I. V. Turko, and J. D. Corbin. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 65:1–52, 2001.

- 
- [44] R. Zoraghi and T. Seebeck. The cAMP-specific phosphodiesterase TbPDE2C is an essential enzyme in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(7):4343–8, 2002.
- [45] A. Rascon, S. H. Soderling, J. B. Schaefer, and J. A. Beavo. Cloning and characterization of a cAMP-specific phosphodiesterase (TbPDE2B) from *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(7):4714–9, 2002.
- [46] J. A. Beavo, M. Conti, and R. J. Heaslip. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol. Pharmacol.*, 46(3):399–405, 1994.
- [47] J. A. Beavo. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.*, 75(4):725–48, 1995.
- [48] Q. Huai, Y. Liu, S. H. Francis, J. D. Corbin, and H. Ke. Crystal structures of phosphodiesterases 4 and 5 in complex with inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine suggest a conformation determinant of inhibitor selectivity. *J. Biol. Chem.*, 279(13):13095–101, 2004.
- [49] L. Fawcett, R. Baxendale, P. Stacey, C. McGrouther, I. Harrow, S. Soderling, J. Hetman, J. A. Beavo, and S. C. Phillips. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(7):3702–7, 2000.
- [50] J. D. Corbin, M. A. Blount, 2nd Weeks, J. L., A. Beasley, K. P. Kuhn, Y. S. Ho, L. F. Saidi, J. H. Hurley, J. Kotera, and S. H. Francis. [<sup>3</sup>H]sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP. *Mol. Pharmacol.*, 63(6):1364–72, 2003.
- [51] J. Kotera, K. Fujishige, Y. Imai, E. Kawai, H. Michibata, H. Akatsuka, N. Yanaka, and K. Omori. Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. *Eur. J. Biochem.*, 262(3):866–73, 1999.
- [52] R. M. Wallis, J. D. Corbin, S. H. Francis, and P. Ellis. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carnea and aortic rings in vitro. *Am. J. Cardiol.*, 83(5A):3C–12C, 1999.
- [53] K. Yuasa, Y. Kanoh, K. Okumura, and K. Omori. Genomic organization of the human phosphodiesterase PDE11A gene. Evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. *Eur. J. Biochem.*, 268(1):168–78, 2001.
- [54] P. Stacey, S. Rulten, A. Dapling, and S. C. Phillips. Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247(2):249–54, 1998.

- [55] S. Sopory, T. Kaur, and S. S. Visweswariah. The cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5): intestinal cell expression, regulation and role in fluid secretion. *Cell. Signal.*, 16(6):681–92, 2004.
- [56] S. H. Soderling, S. J. Bayuga, and J. A. Beavo. Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(12):7071–6, 1999.
- [57] R. Mancina, S. Filippi, M. Marini, A. Morelli, L. Vignozzi, A. Salonia, F. Montorsi, N. Mondaini, G. B. Vannelli, S. Donati, F. Lotti, G. Forti, and M. Maggi. Expression and functional activity of phosphodiesterase type 5 in human and rabbit vas deferens. *Mol. Hum. Reprod.*, 11(2):107–15, 2005.
- [58] J. Kotera, K. Fujishige, H. Akatsuka, Y. Imai, N. Yanaka, and K. Omori. Novel alternative splice variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, 273(41):26982–90, 1998.
- [59] K. Loughney, J. Taylor, and V. A. Florio. 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. *Int. J. Impot. Res.*, 17(4):320–5, 2005.
- [60] C. S. Lin, S. Chow, A. Lau, R. Tu, and T. F. Lue. Human PDE5A gene encodes three PDE5 isoforms from two alternate promoters. *Int. J. Impot. Res.*, 14(1):15–24, 2002.
- [61] C. S. Lin, A. Lau, R. Tu, and T. F. Lue. Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268(2):628–35, 2000.
- [62] N. Yanaka, J. Kotera, A. Ohtsuka, H. Akatsuka, Y. Imai, H. Michibata, K. Fujishige, E. Kawai, S. Takebayashi, K. Okumura, and K. Omori. Expression, structure and chromosomal localization of the human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A gene. *Eur. J. Biochem.*, 255(2):391–9, 1998.
- [63] P. Wu and P. Wang. Per-Arnt-Sim domain-dependent association of cAMP-phosphodiesterase 8A1 with I $\kappa$ B proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(51):17634–9, 2004.
- [64] J. D. Corbin, S. H. Francis, and D. J. Webb. Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology*, 60(2 Suppl 2):4–11, 2002.
- [65] J. D. Corbin, S. H. Francis, and I. H. Osterloh. Effects of sildenafil on cAMP and cGMP levels in isolated human cavernous and cardiac tissue. *Urology*, 56(3):545, 2000.
- [66] J. D. Corbin and S. H. Francis. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Int. J. Clin. Pract.*, 56(6):453–9, 2002.

- [67] J. D. Corbin. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.*, 16 Suppl 1:S4–7, 2004.
- [68] M. A. Blount, A. Beasley, R. Zoraghi, K. R. Sekhar, E. P. Bessay, S. H. Francis, and J. D. Corbin. Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol. Pharmacol.*, 66(1):144–52, 2004.
- [69] H.D. Langtry and A. Markham. Sildenafil: a review of its use in erectile dysfunction. *Drugs*, 57:967–989, 1999.
- [70] Pressemitteilung Uniklinikum Gießen. Sildenafil zur Behandlung des Lungenhochdrucks zugelassen. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 145(24):38–40, 2005.
- [71] A. Hatzelmann and C. Schudt. Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 297(1):267–79, 2001.
- [72] P. Reid. Roflumilast Altana Pharma. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 3(8):1165–70, 2002.
- [73] R. Schlenger. PDE-4-Hemmer- Ausweg aus der Corticoidresistenz? *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 145(39):22–24, 2005.
- [74] M. J. Sanz, J. Cortijo, and E. J. Morcillo. PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacol. Ther.*, 106(3):269–97, 2005.
- [75] F. J. Soto and N. A. Hanania. Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 11(2):129–34, 2005.
- [76] D. Spina. Phosphodiesterase-4 inhibitors in the treatment of inflammatory lung disease. *Drugs*, 63(23):2575–94, 2003.
- [77] P. A. Martorana, R. Beume, M. Lucattelli, L. Wollin, and G. Lungarella. Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 172(7):848–53, 2005.
- [78] B. J. Lipworth. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 365(9454):167–75, 2005.
- [79] V. Lagente, C. Martin-Chouly, E. Boichot, M. A. Martins, and P. M. Silva. Selective PDE4 inhibitors as potent anti-inflammatory drugs for the treatment of airway diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100 Suppl 1:131–6, 2005.

- [80] R. K. Kumar, C. Herbert, P. S. Thomas, L. Wollin, R. Beume, M. Yang, D. C. Webb, and P. S. Foster. Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 307(1):349–55, 2003.
- [81] M. Mitura-Lesiuk, B. Filiks-Litwin, U. Malek, and J. R. Kowalczyk. Diagnostic and therapeutic management of essential thrombocythemia in children. *Med. Wieku. Rozwoj.*, VIII(3 Pt 2):834–838, 2004.
- [82] DAZ. Anagrelid, Neues Mittel gegen Thrombozythämie. *Dtsch. Apoth. Ztg., Beilage Neue Arzneimittel*, 52(07):85–89, 2005.
- [83] J. Hanoune, Y. Pouille, E. Tzavara, T. Shen, L. Lipskaya, N. Miyamoto, Y. Suzuki, and N. Defer. Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 128(1-2):179–94, 1997.
- [84] R. K. Sunahara, C. W. Dessauer, and A. G. Gilman. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36:461–80, 1996.
- [85] C. W. Dessauer and A. G. Gilman. The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J. Biol. Chem.*, 272(44):27787–95, 1997.
- [86] J. H. Hurley. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 274(12):7599–602, 1999.
- [87] J. J. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, and S. R. Sprang. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with Gs $\alpha$ -GTP $\gamma$ S. *Science*, 278(5345):1907–1916, 1997.
- [88] D. G. Adams and P. S. Duggan. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.*, 144:3–33, 1999.
- [89] M. J. Cann. Signalling through cyclic nucleotide monophosphates in cyanobacteria. *New Phytol.*, 161:23–34, 2003.
- [90] C. P. Wolk. Heterocyst formation. *Annu. Rev. Genet.*, 30:59–78, 1996.
- [91] M. Katayama and M. Ohmori. Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium *Anabaena sp. strain PCC 7120*. *J. Bacteriol.*, 179(11):3588–93, 1997.
- [92] M. Kasahara and M. Ohmori. Activation of a cyanobacterial adenylate cyclase, CyaC, by autophosphorylation and a subsequent phosphotransfer reaction. *J. Biol. Chem.*, 274(21):15167–72, 1999.

- 
- [93] M. Kasahara, T. Unno, K. Yashiro, and M. Ohmori. CyaG, a novel cyanobacterial adenylyl cyclase and a possible ancestor of mammalian guanylyl cyclases. *J. Biol. Chem.*, 276(13):10564–9, 2001.
- [94] T. Tada, H. Sekimoto, and M. Ohmori. Biochemical characterization of an Adenylate Cyclase, CyaB1, in the Cyanobacterium *Anabaena sp. Strain PCC 7120*. *J. Plant Res.*, 114:387–394, 2001.
- [95] M. A. Gilles-Gonzalez and G. Gonzalez. Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J. Appl. Physiol.*, 96(2):774–83, 2004.
- [96] P. J. Erbel, P. B. Card, O. Karakuzu, R. K. Bruick, and K. H. Gardner. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix–loop–helix–PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(26):15504–9, 2003.
- [97] J. Vreede, M. A. van der Horst, K. J. Hellingwerf, W. Crielaard, and D. M. van Aalten. PAS domains. Common structure and common flexibility. *J. Biol. Chem.*, 278(20):18434–9, 2003.
- [98] J. Rutter, C. H. Michnoff, S. M. Harper, K. H. Gardner, and S. L. McKnight. PAS kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(16):8991–6, 2001.
- [99] J. Yang, L. Zhang, P. J. Erbel, K. H. Gardner, K. M. Ding, J. A. Garcia, and R. K. Bruick. Functions of the Per/ARNT/Sim (PAS) domains of the hypoxia inducible factor (HIF). *J. Biol. Chem.*, 2005.
- [100] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(9):4350–4, 1979.
- [101] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51 Pt 1:263–73, 1986.
- [102] K. B. Mullis and F. A. Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335–50, 1987.
- [103] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(12):5463–7, 1977.
- [104] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–5, 1970.

- [105] S. E. Martinez, S. Bruder, A. Schultz, N. Zheng, J. E. Schultz, J. A. Beavo, and J. U. Linder. Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(8):3082–7, 2005.
- [106] Y. Salomon, C. Londos, and M. Rodbell. A highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal. Biochem.*, 58(2):541–8, 1974.
- [107] S. Bruder, J. U. Linder, S. E. Martinez, N. Zheng, J. A. Beavo, and J. E. Schultz. The cyanobacterial tandem GAF domains from the *cyab2* adenylyl cyclase signal via both cAMP-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(8):3088–92, 2005.
- [108] D. Okada and S. Asakawa. Allosteric activation of cGMP-specific, cGMP-binding phosphodiesterase (PDE5) by cGMP. *Biochemistry*, 41(30):9672–9, 2002.
- [109] S. H. Francis and J. D. Corbin. Molecular mechanisms and pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 antagonists. *Curr. Urol. Rep.*, 4(6):457–65, 2003.
- [110] B. J. Sung, K. Y. Hwang, Y. H. Jeon, J. I. Lee, Y. S. Heo, J. H. Kim, J. Moon, J. M. Yoon, Y. L. Hyun, E. Kim, S. J. Eum, S. Y. Park, J. O. Lee, T. G. Lee, S. Ro, and J. M. Cho. Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. *Nature*, 425(6953):98–102, 2003.
- [111] I. V. Turko, S. A. Ballard, S. H. Francis, and J. D. Corbin. Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol. Pharmacol.*, 56(1):124–30, 1999.
- [112] J. F. Kameni Tcheudji, L. Lebeau, N. Virmaux, C. G. Maftai, R. H. Cotte, C. Lugnier, and P. Schultz. Molecular organization of bovine rod cGMP-phosphodiesterase 6. *J. Mol. Biol.*, 310(4):781–91, 2001.
- [113] N. Kajimura, M. Yamazaki, K. Morikawa, A. Yamazaki, and K. Mayanagi. Three-dimensional structure of non-activated cGMP phosphodiesterase 6 and comparison of its image with those of activated forms. *J. Struct. Biol.*, 139(1):27–38, 2002.
- [114] M. K. Thomas, S. H. Francis, and J. D. Corbin. Characterization of a purified bovine lung cGMP-binding cGMP phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.*, 265(25):14964–70, 1990.
- [115] S. H. Francis, D. M. Chu, M. K. Thomas, A. Beasley, K. Grimes, J. L. Busch, I. V. Turko, T. L. Haik, and J. D. Corbin. Ligand-induced conformational changes in cyclic nucleotide phosphodiesterases and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Methods (Duluth)*, 14(1):81–92, 1998.

- [116] J. Kotera, S. H. Francis, K. A. Grimes, A. Rouse, M. A. Blount, and J. D. Corbin. Allosteric sites of phosphodiesterase-5 sequester cyclic GMP. *Front. Biosci.*, 9:378–86, 2004.
- [117] A. Friebe and D. Koesling. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ. Res.*, 93(2):96–105, 2003.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Doktoren:

K. H. Bartels (Pharmazeutische und medizinische Terminologie)

K. Baumann (Pharmazeutische Chemie)

F. C. Czygan (Pharmazeutische Biologie)

S. Ebel (Pharmazeutische Chemie)

G. Gresser (Pharmazeutische Biologie)

U. Groß (Mikrobiologie für Pharmazeuten)

M. Grünsfelder (Pharmazeutische Biologie)

A. Haase (Physik für Pharmazeuten)

C. Herdeis (Pharmazeutische Chemie)

U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie)

M. J. Lohse (Pharmakologie für Pharmazeuten)

W. Lutz (Toxikologie für Pharmazeuten)

C. Müller (Pharmazeutische Chemie)

M. J. Müller (Pharmazeutische Biologie)

B. Reyer (Pharmazeutische Chemie)

H. Rüdiger (Pharmazeutische Biochemie)

T. Schirmeister (Pharmazeutische Chemie)

C. Schollmayer (Pharmazeutische Chemie)

R. F. Schmidt (Physiologie für Pharmazeuten)

M. Veit (Pharmazeutische Biologie)

H. Wätzig (Pharmazeutische Chemie)

H. Walz (Pharmazeutische Technologie)

C. Weis (Pharmazeutische Chemie)

I. Zimmermann (Pharmazeutische Technologie)

# Lebenslauf

<b>Name</b>	Sandra Bruder	
<b>Geburtsdatum</b>	22. Februar 1978	
<b>Geburtsort</b>	Rothenburg o.d.T.	
<b>Schulbildung</b>	1984-1988	Grundschule Creglingen
	1988 - 1997	Gymnasium Weikersheim
	18. Juni 1997	Abitur
<b>Studium</b>	10/1997 - 09/2001	Studium der Pharmazie Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	27. August 1999	erstes Staatsexamen
	16. Oktober 2001	zweites Staatsexamen
<b>Praktische Ausbildung</b>	11/2001-04/2002	Landwehr-Apotheke, Rothenburg o.d.T.
	05/2002-10/2002	Fa. Pfizer, Freiburg
	28. November 2002	drittes Staatsexamen
	13. Dezember 2002	Erteilung der Approbation als Apotheker
<b>Promotion</b>	02/2003-09/2005	Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit „cAMP- und cGMP-bindende Tandem-GAF-Domänen: Biochemische Untersuchungen mit einer cyanobakteriellen Adenylatcyclase“ am Institut für Pharmazeutische Biochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. E. Schultz