

**Klonierung einer Adenylatcyclase aus
*Paramecium tetraurelia***

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Kristina Hambach

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2002
Dekan: Prof. Dr. H. Probst
Erster Berichterstatter: Prof. Dr. J.E. Schultz
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

Der experimentelle Teile der vorliegenden Arbeit wurde zwischen Juni 1998 und September 2001 am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. Schultz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Schultz danke ich für das stete Interesse an der Arbeit und seine allzeit offene Tür.

Jürgen Linder danke ich für seinen kompetenten Rat, seine Anregungen und die lebhaften Diskussionen.

Axel Trefzer und Volker Pfeifer möchte ich für die Einführung in das Arbeiten mit Streptomyces-Kulturen und für viele hilfreiche Informationen danken.

Nikolaj Kloecker danke ich für die Durchführung der Fluoreszenzlokalisationsuntersuchungen.

Herrn Prof. Heide und all seinen Mitarbeitern danke ich für vielfache Hilfe. Darüber hinaus gilt Herrn Prof. Heide mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ursula Kurz möchte ich für die zügige Durchführung des größten Teils der Gensynthese und für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Bei Frau Anita Schultz bedanke ich mich für die hilfreiche und unkomplizierte Unterstützung bei vielen Klonierungen. Frau Gertrud Kleefeld und Frau Ingrid Mayer möchte ich für die Zucht der Paramecien und die technischen Hilfestellungen danken. Herrn Brökel gilt mein Dank für die Pflege der Kaninchen.

Meinen Kollegen und Kolleginnen im Arbeitskreis danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Bei Stefan Schmitt möchte ich mich für die geduldige Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Tanja Xydeas und Axel Spitzner danke ich für ihre Geduld insbesondere während der Niederschrift dieser Arbeit und ihr offenes Ohr. Allen Freunden, die zum Gelingen dieser Arbeit mit Rat und Tat beigetragen haben, danke ich herzlich.

Ralf Bingler danke ich für die aufmunternde Motivierung in der Endphase dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern für ihre stete Unterstützung in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biochemische Signale bei mehrzelligen Organismen und Protozoen	1
1.2	Elektrophysiologie von <i>Paramecium</i>	1
1.3	Signalweiterleitung.....	2
1.4	Eine mammalia-AC ähnliche Guanylatcyclase aus <i>Paramecium tetraurelia</i>	4
1.5	Aufgabenstellung	5
2	Material	7
2.1	Chemikalien, Enzyme und Kits.....	7
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	8
2.3	Oligonukleotide.....	10
2.3.1	Sequenzier-Primer	10
2.3.2	Primer für die Homologieklonierung.....	10
2.3.3	Oligonukleotide für die Gensynthese	11
2.3.4	Sonstige Oligonukleotide für PCR	13
2.4	Verwendete Plasmidvektoren.....	16
2.5	Puffer und Lösungen und verwendete Genbanken.....	20
2.5.1	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	20
2.5.2	Puffer und Lösungen für Proteinchemie	22
2.5.3	Puffer und Lösungen für Zellkulturen	25
2.5.4	Verwendete Genbanken	28
3	Methoden	31
3.1	Gentechnologische Methoden	31
3.1.1	Grundlegende Methoden der Analyse, Prozessierung und Rekombination von DNA.....	31
3.1.2	Arbeiten mit <i>E.coli</i> -Bakterien.....	37
3.2	Screening von Genbanken	38
3.2.1	Allgemeine Techniken zur Herstellung von Phagenplatten, Titern von Genbanken und deren Amplifikation	38
3.2.2	Genbankdurchmusterungen	39
3.3	Allgemeine proteinchemische Methoden.....	42
3.4	Proteinreinigung	46
3.4.1	Affinitätschromatographische Reinigung mit Ni-NTA-Agarose	46

3.4.2	Antikörperreinigung.....	47
3.5	Proteinexpression in <i>E.coli</i>	49
3.6	Methoden der zellfreien Expression	50
3.6.1	Rapid Translation System RTS500	50
3.6.2	Herstellung von Paramecienlysaten als Zusatz zu zellfreien Expressionsversuchen	50
3.7	Methoden der <i>Streptomyces lividans</i>-Zellkultur	52
3.7.1	<i>Streptomyces lividans</i> 1326 als Expressionssystem	53
3.7.2	Proteinexpression mit dem <i>T7-Streptomyces lividans</i> -System.....	55
3.8	Methoden der <i>HEK293</i>-Zellkultur	58
3.9	Methoden der <i>Sf9-Insekten</i>-Zellkultur	59
3.9.1	Kultivierung von <i>Sf9</i> -Zellen.....	60
3.9.2	Herstellung rekombinanter Baculoviren.....	61
3.10	Adenylatcyclase-Enzymtest	63
3.11	Immunisierung von Kaninchen	64
3.12	Computerunterstützte Proteinanalysen	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Homologieklonierung	67
4.1.1	Strategievarianten und PCR-Experimente	67
4.1.2	Genbank-Durchmusterung	78
4.1.3	Etablierung des Gesamtgens	81
4.2	Topologievorschlag für das gefundene Adenylatcyclasegen	90
4.3	Resynthese des Gens mit universellem Code	99
4.3.1	DNA-Sequenz und allgemeine Synthesestrategie	99
4.3.2	Herstellung und Klonierung der Fragmente.....	101
4.3.3	Zusammensetzung der Fragmente zum Gesamtgen.....	104
4.3.4	Nachträgliche Sequenzmodifikationen im synthetischen Gen.....	106
4.4	Expressionsversuche mit der AC-Domäne von pAC in <i>E.coli</i>	108
4.4.1	Verkürzungen des unveränderten, cytosolischen Bereichs.....	108
4.4.2	Expression von Mutanten und Chimären	112
4.5	Heterologe Expression in <i>HEK293</i>	117
4.5.1	Expression des Holoenzym und des cytosolischen Bereichs	118
4.5.2	Expression eines Chimärs aus pAC und Säuger-AC VII	126
4.6	Experimente mit möglichen Signalpeptiden	128
4.6.1	Lokalisationsuntersuchungen in eukaryotischen Zellen	128
4.6.2	Membranständige Expression in <i>E.coli</i> mit dem N-Terminus einer mycobakteriellen AC.....	133
4.7	Versuche zellfreier Proteinexpression	134

4.7.1	Expression mit dem <i>RTS500 in vitro</i> -Expressionssystem	134
4.7.2	Paramecien-Lysat als Zusatz in der <i>in vitro</i> -Expression	136
4.8	<i>Streptomyces lividans</i> – ein bakterielles Expressionssystem	140
4.8.1	<i>Streptomyces lividans</i> 1326	140
4.8.2	<i>Streptomyces lividans</i> T7-System	141
4.9	Proteinexpression in der Insektenzellkultur Sf9	144
4.9.1	Konstrukte für die Transfektion und deren Klonierung	144
4.9.2	Expression von Verkürzungen und Chimären	149
4.10	Antikörper – Gewinnung, Reinigung, Charakterisierung	152
4.10.1	Antiseren für den Nachweis der katalytischen Domäne	152
4.10.2	Antiseren für den Nachweis des N-Terminus	158
5	Diskussion	161
5.1	Homologieklonierung, Etablierung des Gens und Topologie- vorschläge	161
5.1.1	Homologieklonierung	161
5.1.2	Analyse des gefundenen Proteins	164
5.2	Heterologe Expression und mögliche Ursachen für deren Erfolglosigkeit	173
5.2.1	Proteinfaltung	173
5.2.2	Isoenzyme	175
5.2.3	Funktionalität als Homodimer?	175
5.2.4	Etablierung der T7- <i>Streptomyces lividans</i> Zellkultur	177
6	Zusammenfassung	179
7	Anhang	181
7.1	Homologieklonierung und Proteinanalyse: Ergebnisse der Datenbanksuche	181
7.2	Alignments	181
7.2.1	Klasse III-Cyclase Alignment	183
7.2.2	Alignment der Klasse III-ACn vom cyanobakteriellen Typ	186
7.2.3	K ⁺ -Kanal Alignment	187
8	Literaturverzeichnis	193

Abkürzungen

AB	Antibiotikum	Isof.	Isoform
AC(n)	Adenylatcyclase(n)	MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
AnaCyaB1	CyaB1 aus <i>Anabaena spirulina</i>	OD	Optische Dichte
anaTPRL	TPRL der AnaCyaB1	ORF	<i>open reading frame</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	pAC	Paramecium-AC
AS	Aminosäure(n)	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Aust.	Austausche	ParaGC	(bekannte) Paramecium-GC
BSA	Rinderserumalbumin	PCR(n)	Polymerasekettenreaktion(en)
cDNA	Copy-DNA	pfu	<i>plaque forming unit</i>
cpm	<i>counts per minute</i> (gezählte Zerfälle pro Minute)	pIAC	AC aus <i>Plasmodium falciparum</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA	pITPRL	TPRL der AC aus <i>P. falciparum</i>
FCS	Fötales Kälberserum	pTPRL	TPRL der Paramecium-AC
GC(n)	Guanylatcyclase(n)	TEMED	Tetramethylethylendiamin
gDNA	genomische DNA	TM	Transmembranbereich
IPTG	Isopropylthiogalactosid	TPRL	Tetratricopeptidrepeat like
		5'-UTR	<i>5'-untranslated region</i>

Abkürzungen von Arten:

Aer.hy.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Pre.ru.	<i>Prevotella ruminicola</i>
Agr.tu.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Pse.ae.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ana.cy.	<i>Anabaena cylindrica</i>	Rat.no.	<i>Rattus norvegicus</i>
Ana.sp.	<i>Anabaena spirulina/Nostoc sp.</i>	Rhi.me.	(Sino-) <i>Rhizobium meliloti</i>
Bac.an.	<i>Bacillus anthracis</i>	Sch.po.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Bor.pe.	<i>Bordetella pertussis</i>	Schi.ma.	<i>Schistosoma mansoni</i>
Bre.li.	<i>Brevibacterium liquefaciens</i>	Sin.me.	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Cae.el.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Spi.pl.	<i>Spirulina platensis</i>
Dic.di.	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Sti.au.	<i>Stigmatella aurantiaca</i>
Dro.me.	<i>Drosophila melanogaster</i>	Str.coe.	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Hom.sa.	<i>Homo sapiens</i>	Syn.sp.	<i>Synechocystis spirulina</i>
Mes.lo.	<i>Mesorhizobium loti</i>	The.el.	<i>Thermosyncheococcus elongatus</i>
Mus.mu.	<i>Mus musculus</i>	Thi.ro.	<i>Thiocapsa roseopericina</i>
Myc.tu.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tre.pa.	<i>Treponema pallidum</i>
Neu.cr.	<i>Neurospora crassa</i>	Try.br.	<i>Trypanosoma brucei</i>
Nos.sp.	<i>Nostoc sp. (Anabaena spirulina)</i>	Xen.la.	<i>Xenopus laevis</i>
Pla.fa.	<i>Plasmodium falciparum</i>	Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Der Ausdruck Paramecium-AC bezeichnet die im Rahmen dieser Arbeit klonierte Adenylatcyclase, der Ausdruck Paramecium-GC bezeichnet die bekannte Guanylatcyclase aus *Paramecium tet.* (1).

Nukleotide und Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabencode gemäß IUPAC abgekürzt.

Daten, welche von Laborkollegen erarbeitet wurden und Einfluß auf diese Arbeit besaßen, sind kursiv gedruckt und mit Balken am rechten und linken Spaltenrand versehen.

1 Einleitung

1.1 Biochemische Signale bei mehrzelligen Organismen und Protozoen

Zellen höherer Organismen sind zu Gewebesystemen differenziert. Die Abstimmung zell- und gewebespezifischer Aufgaben macht eine Kommunikation mittels signalgebender Substanzen unabdingbar (Zell-Zell- oder Gewebe-Zell-Kommunikation). Diese Signale bewirken nach Transduktion eine adäquate Änderung im Zellstoffwechsel.

Bei Säugern wird die Gewebe-Zell-Kommunikation häufig durch solche Hormone vermittelt, die durch Bindung an ihren Rezeptor die Aktivierung eines GTP-bindenden Proteins bewirken. Die Untereinheiten aktivierter G-Proteine führen meist zur Bildung des zentralen *second messengers* cAMP, seltener cGMP, katalysiert durch die Enzyme Adenylat- respektive Guanylatcyclase. Ein anderer G-Protein vermittelter Transduktionsweg führt zur Bildung der sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol und in Folge des ersteren zur Freisetzung von Ca^{2+} im Zellinneren. Ca^{2+} kann als *third messenger* betrachtet werden.

Einzeller wie Paramecien sind autarke Individuen, welche weniger mit anderen Zellen, als primär mit ihrer Umwelt kommunizieren. Da sie nicht von einer, in ihrer Zusammensetzung in engen Grenzen definierten, Flüssigkeit umgeben sind, wie dies bei mehrzelligen Organismen der Fall ist, sondern ihr Lebensraum natürliche Gewässer sind, welche in ihrer Zusammensetzung starken Veränderungen unterliegen, ist die Aufnahme diese Veränderungen signalisierender Reize lebensnotwendig. Paramecien sind sensitiv für Reize durch Hitze, mechanische Einwirkung und organische und anorganische Chemikalien. Die Antwort auf solche Reize ist generell eine Änderung im Schwimmverhalten, die dazu führt, sich der Quelle des Reizes zu nähern oder davon zu entfernen.

Signale werden also in erster Linie nicht durch Botenstoffe anderer Zellen dargestellt, sondern durch Bestandteile ihrer Umwelt. Dies macht es wahrscheinlich, daß die Signaltransduktion bei Einzellern andere molekulare Mechanismen verfolgt, als die klassischen hormongekoppelten Wege via G-Proteine der Säuger.

Die Übertragung externer Reize ins Zellinnere erfolgt bei Ciliaten durch Änderungen in der Membranleitfähigkeit für Ca^{2+} und /oder K^+ und wird auf Basis von Potentialen, also Verschiebungen im Membranruhepotential weitergeleitet (2).

1.2 Elektrophysiologie von Paramecium (2)

Das Membranruhepotential wird bei Paramecium durch Sickerleitfähigkeiten für K^+ und Ca^{2+} gebildet. Es herrscht eine ungleiche Ionenverteilung auf beiden Seiten der Zellmembran: eine hohe intrazelluläre K^+ -Konzentration ($\approx 18-34\text{mM}$) steht einer relativ niedrigen extrazellulären Konzentration gegenüber; bei Ca^{2+} verhält es sich umgekehrt, die intrazelluläre Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen wird sehr niedrig gehalten ($\approx 0,1\mu\text{M}$), während außen höhere Konzentrationen herrschen (3). Diese Konzentrationsgradienten stellen die Triebkraft zweier antagonistischer

Ionenströme dar (K^+ -Efflux, Ca^{2+} -Influx), die durch die zurückbleibende negative Ladung begrenzt werden. Aufgrund des Antagonismus der Ströme wird das elektrochemische Gleichgewichtspotential beider Ionenbatterien nicht erreicht. Im Ruhezustand sind die entgegengesetzten Ströme ausgeglichen. Das Membranruhepotential beträgt ca. $-35mV$. Die K^+ -Ruheleitfähigkeit leistet den größeren Beitrag.

Reize, die eine Membrandepolarisation bewirken (zum Beispiel mechanische Stimuli am vorderen Zellende oder Erhöhung der externen Konzentration einwertiger Kationen) führen zu einem abgestuften Aktionspotential, getragen durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Ionenkanäle der Cilienmembran. Die Inaktivierung erfolgt durch lokale Akkumulation von Ca^{2+} -Ionen. Eine schnelle, spannungsabhängige K^+ -Leitfähigkeit moduliert das Ausmaß des Aktionspotentials; eine spannungs- und Ca^{2+} -abhängige, verzögerte K^+ -Leitfähigkeit bewerkstelligt die Repolarisation. Im Verhalten ist eine sogenannte *avoiding reaction* zu beobachten: die Zellen kehren die Cilienschlagrichtung kurzzeitig um und schwimmen rückwärts. Diese Art der Erregbarkeit ist begrenzt auf die Cilienmembran. Depolarisation der Membran decilierter Tiere führt zu keinem Ca^{2+} -Aktionspotential.

Reize, die eine Membranhypolarisation auslösen (z.B. mechanische Stimuli am hinteren Zellende oder Verdünnung der Konzentration einwertiger Kationen oder Erhöhung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration (Ca^{2+} -Paradoxon)) erhöhen den K^+ -Ausstrom und bewirken eine vorübergehende Beschleunigung des vorwärts Schwimmens.

Verschiebungen in den extrazellulären Ionenkonzentrationen nehmen unter den externen Reizen eine Sonderstellung ein, da sie zusätzlich zur Änderung des Schwimmverhaltens nach einer aktiven Anpassung verlangen, weil sie a) eine veränderte osmolare Wirkung ausüben (Regulation durch die kontraktile Vakuole) und b) Einfluß auf das Membranruhepotential besitzen. Um das Ruhepotential konstant zu halten (potentiostatische Membran), müssen Paramecien ihre Membranruheleitfähigkeit permanent den gegebenen äußeren Bedingungen anpassen, insbesondere den herrschenden K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen. Aber auch andere Kationen haben Einfluß auf das Membranpotential.

1.3 Signalweiterleitung

Die Frage ist, wie die elektrophysiologischen Ereignisse aufgrund externer Reize mit biochemischen Stoffwechseländerungen und Verhaltensänderungen verknüpft sind. Hier brachten Untersuchungen über das ubiquitär der Bildung sekundärer Botenstoffe dienende cyclische Nukleotidsystem weitere Erkenntnisse.

In den Cilien von Paramecium wurden die sekundären Botenstoffe cGMP und cAMP nachgewiesen. Des Weiteren konnten die Enzyme der gesamten regulatorischen Kaskade des cyclischen Nukleotidsystems gefunden werden: eine Guanylatcyclase, eine Adenylatcyclase, cGMP- und cAMP-abhängige Proteinkinasen, Phosphoproteinphosphatase, spezifische Phosphodiesterasen für cGMP und cAMP und Calmodulin (4).

Die membranständige Guanylatcyclaseaktivität erscheint bei der Membranpräparation der Cilien in einer bestimmten Fraktion und ist streng Ca^{2+} -reguliert. Diese Ca^{2+} -Sensitivität wird vielleicht durch vom Enzym gebundenem Calmodulin vermittelt (5, 6). Die gemeinsame Stimulation durch Ca^{2+} und die räumliche Nähe der GC zu den die ciliäre Membranerregbarkeit vermittelnden, spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen ließ eine Kopplung der cGMP-Entstehung und

des ciliären Verhaltens durch elektrische Membranereignisse nach Reizaufnahme vermuten. *In vivo* konnte gezeigt werden, daß die cGMP-Bildung durch Ca^{2+} -Einstrom sowohl durch ciliäre depolarisations-aktivierte, als auch durch somatische, hyperpolarisations-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle stimuliert wird, jedoch getrennt von den ebenfalls Ca^{2+} -stimulierten Verhaltensantworten (Cilienschlagumkehrung und Cilienschlagbeschleunigung) auftritt (7). Hier bleibt die Frage bestehen, welche biochemische Änderung durch einen cGMP-Anstieg nach Ca^{2+} -Influx in der Zelle hervorgerufen wird (7).

Die Adenylatcyclase erscheint in einer zur GC unterschiedlichen Fraktion der Cilienmembranpräparation. Die Regulation der Adenylatcyclaseaktivität war unklar. Ihre Unempfindlichkeit gegen Choleratoxin, Pertussistoxin, Fluoride, GTP und seine nicht hydrolysierbaren Analoga GMPPNP¹ u. GTP- γ -S² bestätigt, daß keine Regulation durch G-Proteine vorliegt (8). *In vivo*-Untersuchungen ergaben, daß die cAMP-Bildung durch externe Ionenkonzentrationsänderungen, die eine Hyperpolarisation der Zellmembran bewirken (9), hervorgerufen wird.

Um das Membranpotential bei schwankenden externen Ionenkonzentrationen konstant zu halten, muß die K^+ -Ruheleitfähigkeit in *Paramecium* aktiv reguliert werden. Sie ist abhängig von der Ionenkonzentration im Äquilibriumspuffer, z.B. bedingen hohe externe K^+ -Konzentrationen eine hohe K^+ -Ruheleitfähigkeit, in Niedrig- K^+ -Umgebung besteht eine niedrige K^+ -Ruheleitfähigkeit. Die herrschende K^+ -Ruheleitfähigkeit beeinflusst das Ausmaß der Hyperpolarisation bei Verdünnung externer Kationen. In unserem Labor konnte in K^+ -Verdünnungsversuchen³ eine Korrelation zwischen der zuvor herrschenden K^+ -Ruheleitfähigkeit (moduliert durch verschiedene K^+ -Konzentrationen im Äquilibriumspuffer) und damit auch dem Ausmaß der Hyperpolarisation und der akkumulierten cAMP-Menge gezeigt werden. Dies läßt eine Koregulation von K^+ -Ruheleitfähigkeit und der cAMP-Produktion vermuten, was durch Untersuchungen an der *Paramecium tetraurelia*-Mutante *restless* erhärtet werden konnte. *restless* besitzt einen Defekt in der Regulation des Membranpotentials. In Niedrig- K^+ -Lösung kann die Zelle kein konstantes Membranpotential aufrechterhalten, wie Wildtyp-Zellen dies durch Verringerung der K^+ -Ruheleitfähigkeit tun. *restless* hyperpolarisiert unter solchen Bedingungen dauerhaft wie eine Kaliumelektrode, was sich in permanentem, beschleunigtem Vorwärtsschwimmen äußert und zum Absterben der Zellen führt (10). In K^+ -Verdünnungsversuchen konnte in *restless* eine überdurchschnittlich hohe cAMP-Akkumulation nachgewiesen werden, welche durch vorherige Behandlung mit dem K^+ -Kanal-Blocker Tetraethylammonium (TEA^+) ausbleibt. Ebenfalls aufgehoben ist dieser Effekt in einer weiteren *Paramecium*-Mutante: *manxA*. Sie besitzt eine Zusatzmutation (außerhalb des mutierten Gens von *restless*), welche die regulatorischen Membranleitfähigkeitsdefekte von *restless* kompensiert. Diese Ergebnisse sprechen für eine Verbindung der K^+ -Ruheleitfähigkeit und der Regulation der cAMP-Produktion.

In Anbetracht der Ionenkanal-ähnlichen Topographie von Säuger-Adenylatcyclasen (11), ist es denkbar, daß die *Paramecium*-AC selbst als Ionenkanal fungiert.

1992 (12) gelang es im Arbeitskreis die membranständige AC aus den Cilien von *Paramecium tetraurelia* bis zur Homogenität in aktiver Form zu reinigen. SDS-PAGE-Analyse ergab ein Mo-

¹ 5'-Guanylylimidodiphosphat

² Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)

³ *Paramecien* wurden in einem Puffer bestimmter K^+ -Ionenkonzentration für mehrere Stunden äquilibriert. Für die Messungen wurde die äußere K^+ -Konzentration schlagartig verdünnt.

lekulargewicht von 96kDa für dieses Enzym. Rekonstitution der AC in künstlichen Lipid-Doppelschichtmembranen gestattete *in vitro*-Untersuchungen der möglichen Leitfähigkeit. Es konnte dargelegt werden, daß zusammen mit der AC-Aktivität eine Ionenpore mitgereinigt wurde, welche Leitfähigkeiten insbesondere für K^+ (und Cs^+) und in abgestuften Maßen für Na^+ , Ca^{2+} , Li^+ und Mg^{2+} besitzt, wobei die Interpretation der Daten eine Spezifität für einwertige Kationen mit einer Präferenz für K^+ zeigten. Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Ionenpore stellte sich als spannungsunabhängig heraus, wobei die Leitfähigkeit eines Einzelkanals mit der angelegten Spannung an der künstlichen Membran linear ansteigt. Zwischen der AC-Aktivität und der Ionenkanal-Aktivität besteht eine strikte Abhängigkeit. Bei verminderter AC-Aktivität war immer eine verminderte Aktivität der Ionenpore zu finden. Diese Ergebnisse schlagen dringend eine Kopplung von AC und Ionenkanal vor, und lassen sich dahingehend interpretieren, daß der Ionenkanal die regulatorische Domäne der AC darstellt und der K^+ -Einstrom, welcher die AC-Aktivität reguliert, eine intrinsische Aktivität des Enzyms selbst ist. Dies bedeutet eine Beteiligung der AC an der Regulation des Membranruhepotentials.

Diese Erkenntnisse zeigten zum ersten Mal eine direkte Kopplung einer AC-Aktivität mit einem Ionenkanal, so daß dieses protozoen Enzym evolutionär ein Vorgänger der membranständigen (2x 6 transmembranspannende Bereiche) mammalia AC sein könnte.

Das Labor beschäftigt sich seither mit der Klonierung dieser Adenylatcyclase aus *Paramecium tetraurelia*. Eine Proteinsequenzierung war mangels ausreichender Proteinmengen nicht möglich.

1.4 Eine mammalia-AC ähnliche Guanylatcyclase aus *Paramecium tetraurelia*

Die vermutete Ähnlichkeit der Paramecium-Adenylatcyclase zu Säuger-Adenylatcyclasen führte zu der Klonierung eines Cyclase-Gens aus *Paramecium tetraurelia* (13). Im korrespondierenden, 280kDa schweren Protein lassen sich zwei Domänen erkennen: N-terminal eine Domäne mit zehn transmembranspannenden Helices, welche Ähnlichkeiten zu P-Typ-ATPasen zeigt; C-terminal eine Nukleotidcyclase mit einer Topologie von Klasse III Säuger-Adenylatcyclasen (2x6TM). Die cytosolischen, katalytischen Schleifen besitzen Sequenzähnlichkeiten zu den Säuger-Adenylatcyclasen, sind allerdings in umgekehrter Reihenfolge angeordnet. Die heterologe Expression des Enzyms erbrachte den Nachweis für AC-Aktivität.

Die Veröffentlichungen zweier Kristallstrukturen der katalytischen Domäne von Säuger-Adenylatcyclasen (14, 15) ermöglichte erstmals, einzelnen hochkonservativen Aminosäuren Aufgaben zuzuordnen; u.a. konnten die Substratspezifität-vermittelnden Aminosäuren identifiziert werden (16-18). Diese Daten wiesen die klonierte Cyclase als Guanylatcyclase aus, was experimentell bestätigt wurde: sowohl das Holoenzym, als auch die GC-Domäne allein zeigen signifikant höhere GC- als AC-Aktivität (1, 19). Dies ist die erste bekannte Guanylatcyclase mit 2x 6TM-Struktur. Bemerkte sei noch, daß keine Ca^{2+} -regulatorischen Effekte an der GC nachgewiesen werden konnten. In der weiteren Arbeit wird diese GC als ParaGC bezeichnet.

1.5 Aufgabenstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das Gen der proteinchemisch bearbeiteten Adenylatcyclase aus *Paramecium* mit dem vermutlich gekoppelten Ionenkanal (12) zu klonieren. Die anschließende Synthese des Gens mit einer auf Säugetiere optimierten *Codonusage* sollten die heterologe Expression des Gens ermöglichen. Nachfolgende Untersuchungen sollten Aufschlüsse über die gegenseitige Beeinflussung der AC-Aktivität und der Aktivität der Ionenpore erbringen.

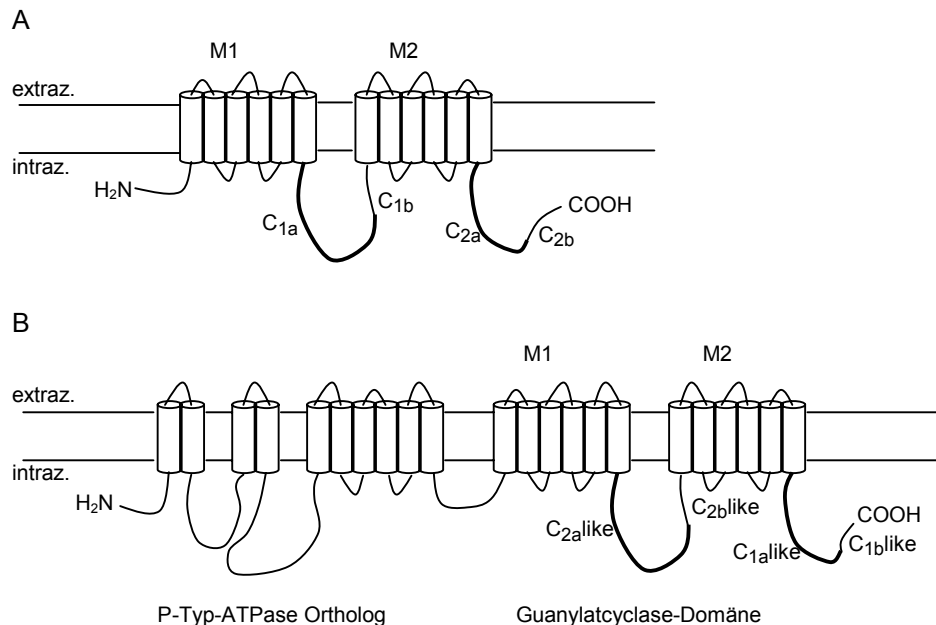


Abbildung 1: (A) Schematische Darstellung der Topologie von Säuger-Adenylatcyclasen. Mit M1 werden die Transmembranbereiche (TM) 1-6 bezeichnet, mit M2 TM 7-12. Die cytosolischen Schleifen tragen die Bezeichnung C₁ und C₂ und sind unterteilt in die Abschnitte C_{1a} und C_{1b}, respektive C_{2a} und C_{2b}. Die Abschnitte C_{1a} und C_{2a} tragen die katalytischen Bereiche; C_{2b} ist nicht bei allen Säuger-AC-Typen vorhanden. (B) Schematische Darstellung der vermuteten *Paramecium*-Guanylatcyclase-Topologie. Die P-Typ-ATPase ähnliche Domäne besteht aus 2x2TM- und 1x6TM-Kassetten und zwei cytosolischen Schleifen, einer kurzen und einer langen. Die GC-Domäne besteht aus 2x6TM, bezeichnet als M1 und M2, und den cytosolischen Schleifen C_{1a}like und C_{2a}like, jeweils unterteilt in einen a- und b-Abschnitt. Die a-Abschnitte tragen die katalytischen Bereiche. Die Anordnung der Schleifen ist umgekehrt verglichen mit der der Säuger-ACn.

2 Material

2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

AGS, Heidelberg: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: *ECL Plus Western Blot Detection System, Rainbow Protein-Standards, Hyperfilm ECL, Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, Thermo Sequenase primer cycle sequencing kit, Rediprime DNA labeling system, Protein A-Sepharose 4 Fast Flow, OnePhorAll-Puffer für Restriktionsendonukleasen, G418 (Sulfat), 25mM MgCl₂-Puffer for PCR (USB)*

AppliChem, Darmstadt: HEPES, Acrylamid 4K-Lösung 30%

Appligene Oncor, Heidelberg: *Taq-DNA-Polymerase mit Reaktionspuffer*

BIO-RAD, München: *BIO-RAD Protein Assay-Reagenz, Affi-Gel 10, Coomassie Brilliant-Blue G-250*

Biogenes, Berlin: Herstellung der Peptidantikörper *anti-pAC-NT*

Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf: *Sequagel™ XR, Sequagel™ Complete Buffer Reagent, Chill Out 14 Liquid Wax* von MJ Research

Canberra Packard, Taunusstein: *Ultima Gold XR* Szintillator

Charles River, Sulzfeld: *New Zealand White* Kaninchen

Clontech, de Schelp (Niederlande): Expressionsplasmid *pEGFP*, bicistronisches Expressionsplasmid *pIRES1neo*

Dianova, Hamburg: Sekundärer Ziege-anti-Kaninchen Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, sekundärer Ziege-anti-Maus Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase

Difco Laboratories, Detroit (USA): Agar, Yeast Extract, Tryptic Soy Broth, Casamino Acids, Bacto Trypton, Malt Extract

ECHAZ microcollections, Tübingen: Peptidsynthese (Antigen *EVDNQSVISEDSDNED*), Lipopeptide Adjuvant

Eurogentec, Seraing (Belgien): Oligonukleotide für Gensynthese

Fluka, Buchs (Schweiz): Sodiumdodecylsulfat, L-Prolin

Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe: Insektenzellkultur-Medium *TC100*, *CellFECTIN™*, Plasmid *pFastBac1*, *E.coli DH 10 Bac*-Bakterienzellen, Gentamycin-Lösung (50mg/ml), Zellkulturmedium *MEM*

ICN, Eschwege: Radionukleotide [α -³²P]-ATP, [α -³²P]-dCTP, *7X™ PF* Reinigungsdetergenz, Ehtidumbromid Tabletten

Invitrogen, Groningen (Niederlande): Sf9-Insektenzellen, Expressionsplasmid *pRSETa*

Macherey-Nagel, Düren: *Nucleobond AX PC 20*, *Nucleotrap*

Merck, Darmstadt: Aluminiumoxid 90 aktiv, Ethanol, Methanol, Chloroform, 2-Mercaptoethanol, Isoamylalkohol, DMSO, Glycerol 87%, Essigsäure 100%, Dioxan, alle nicht aufgeführten Chemikalien in *p.a.* Qualität

Messer, Griesheim: Kohlendioxid

MWG-Biotech, Ebersberg: Oligonukleotide (PCR-Primer und Fluoreszenz-markierte Sequenzier-Primer (5'-IRD 800-Markierung))

New England Biolabs, Schwalbach/Taunus: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern, *T4-Polynukleotid-Kinase*, BSA für Molekularbiologie

Novagen, Darmstadt: *E.coli BL21 (DE3) [pREP4]*, *E.coli BL21 (DE3) [pLysS]*

Promega, Madison (USA): *Wizard Plus SV Plasmid Purification Kit (MiniPreps und MidiPreps)*, *Recombinant RNasin* (RNase-Inhibitor), *Pfu-DNA-Polymerase* mit Reaktionspuffer

Qiagen, Hilden: *pQE30-Expressionsvektor*, *E.coli M15 [pREP4]-Bakterienzellen*, *Ni²⁺-NTA-Agarose*, monoklonaler Antikörper anti-RGS(His)₄

Roche Diagnostics, Mannheim: Restriktionsendonukleasen mit 10x Reaktionspuffern, Alkalische Phosphatase, Klenow-Polymerase, *Rapid DNA Ligation Kit*, dNTP's, Fötale Kälberserum, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, ATP *Nuklease S7*, *Rapid Translation System RTS500 E.coli Circular Template Kit*, Proteaseinhibitorcocktail-Tabletten *Complete™ Mini* (mit EDTA)

Roth, Karlsruhe: Glycin, Brillant Blau R250, Ampicillin, Kanamycin

Serva, Heidelberg: Chloramphenicol, Polyethylenglycol 1000, TES

Sigma, Deisenhofen: Glycerol 99%, MOPS, Tris, EDTA, EGTA, X-Gal, IPTG, Dowex 50WX4-400, Ponceau S, Tween 20, Pluronic-F68 10% Lösung, TEMED, LB-Agar Fertigpulver, LB-Broth Fertigpulver, Phenol, Harnstoff, Guanidiniumchlorid, Dithiothreitol, Kanamycin, Tetracyclin, Thiostrepton, Streptomycinsulfat, Spectinomycin Dihydrochlorid, Bromphenolblau, Xylencyanol, Thioglycerin, Calciumchlorid für Zellkultur

Stratagene, Heidelberg: Plasmid *pBluescript II SK(-)*, *E.coli XL1Blue MRF'-Bakterienzellen*, *E.coli SOLR-Bakterienzellen*, *ExAssist™*-Helferphage, Plasmid *pBK-CMV*

Südzucker, Mannheim: Fein Zucker (Saccharose)

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Amersham Pharmacia, Freiburg: *Hybond™-N* Nylonfilter (82mm und 132mm), Liquid Scintillation Counter Rackbeta 1209, Elektrophorese-Spannungsquellen *EPS 301*, *EPS 601*, *ECPS 3000/150*

Beckmann, München: Ultrazentrifuge *Optima L 60*, Rotor Ti50

Becton-Dickinson, Heidelberg: Insulinspritzen *Micro-Fine+*

Bender & Hobein, Ulm: *Vortexer Genie2*

Biometra, Göttingen: *TRIO-Thermoblock thermocycler, TRIO Heated Lid* beheizbare Deckel für *TRIO-Thermoblock*

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

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

Eberhard-Karls-Universität (Werkstatt Pharmazie), Tübingen: Flachbett-Gelelektrophoresekammern

ependorf, Hamburg: Thermoblock *3401* und *5320*, Thermoschüttler *5436*, Tischzentrifugen *Zentrifuge 3200* und *Centrifuge 5414* und *mini spin*, Kühlzentrifuge *5402*, *BioPhotometer*, Pipetten *Varipette 4810* (0,2-10µl; 10-100µl; 50-250µl; 100-1000µl)

Fröbel, Lindau: Consort *Microcomputer Electrophoresis Power Supply E411*

Gesellschaft für Labortechnik GFL, Burgwedel: Wasserbäder *Typ GFL1083*

Heraeus, Osterode: *Megafuge 1.0R (BS 4402/A)*, *Varifuge 3.0*, Ölzentrifuge *4121*, Tischzentrifuge *Biofuge A*, *Laminair HLB2448*, Begasungsbrutschrank

Hoefer, San Francisco (USA): Gelgießapparatur *Mighty Small SE245*, Gellaufkammer *SE250*

H.Saur Laborbedarf, Reutlingen: Vakuumzentrifuge *Typ BA-VC-300H*

Kodak, New Haven (USA): Röntgenfilm *Biomax MR*

Kontron-Hermle, Gosheim: *Centrikon H401* und *ZK401*, Rotoren *A6.14 (SS34)* und *A8.24*

KSG Sterilisatoren, Olching: Hochdruckdampf-Sterilisator *KSG 40-2-1*

Leitz, Wetzlar: Mikroskop *Labovert*

Logeman, USA: Hand-Homognisator (US Pat. 2064.402)

LTF Labortechnik, Wasserburg: Videoprinter *Mitsubishi Video Copy Processor P91* mit *Sony CCD Video Camera Modul XC-ST500E*, Thermopapier *K65HM*, Software *BioCapt Version 99.01s*

Macherey-Nagel, Düren: Blotmembran *porablot PVDF*, *porablot NCP* (0,45µm)

Memmert, Schwabach: Kühlbrutschrank *BK80*

Metrohm, Herisau (Schweiz): pH-Meter *E 512*

Millipore, Eschborn: Reinwasseranlage *MilliQ UF Plus*

MWG, Ebersberg: *LI-COR DNA sequencer model 4000*, Hybridisierschrank *Mini OvenMKII*, *Hybaid HB-OV BL* Glasröhren

Panasonic, Osaka (Japan): *CCTV Camera WV-CD20*, Videorecorder *AG 7350*

Promega, Madison (USA): *Vac-Man* (Vakuuman schlüsse für Plasmidpräparationen)

Roche Diagnostics, Mannheim: *Quick-Spin-Column* (Gelfiltrationssäulen)

Sartorius, Göttingen: Tischwaage *BP 2100 S*, Analysenwaage *handy*, Sterilfilter 0,2µm

Savant, (USA): Vacuumzentrifuge *Speed Vac concentrator SVC 100 A*

Schleicher & Schuell, Dassel: Whatmanpaper 3MM, Blotmembran *Optitran BA-S 83* (0,2µm) und *protran BA 83* (0,2µm)

Stratagen, Heidelberg: UV-Ofen *Stratalinker 2400*

UniEquip, Martinsried: Begasungsbrutschrank *CO₂ Unitherm 170*

Vetter, Wiesloch: UV Kontaktlampe *Chroma 43*

Wolf, Geislingen: Tischautoklav *Sanoclav*

WTB binder, Ulm: Kühlbrutschrank *KB 240*, Wärmeschränke (u.a. für Heißluftsterilisation), Kühlbrutschränke

Zeiss, Oberkochen: Spektralphotometer *PM2 DL*, Mikroskop *47 30 11-9901*

2.3 Oligonukleotide

Im Folgenden werden alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgelistet.

2.3.1 Sequenzier-Primer

Die folgenden Oligonukleotide wurden für die DNA-Sequenzierung verwendet und sind am 5'-Ende Fluoreszenz-Farbstoff IRD 800 markiert.

Tabelle 1: Primer für die DNA-Sequenzierung

Bezeichnung.		Position	Sequenz 5'→3'	T _m	Bemerk.
M13univ.	as	599-616	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	56°C	
T3-Primer	s	791-772	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	56°C	<i>pBluesc.</i>
T7-Primer	as	626-645	TAA TAC GAC GCA CTA TAG GG	56°C	<i>pBluesc.</i>
U-pQE-IR	s	88-108	GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA	54°C	<i>pQE30</i>
R-pQE-IR	as	233-212	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G	54°C	<i>pQE30</i>
pIRES-as	as	1015-1035	GCC CGC TTT TGA GAG GGA GTA	56°C	<i>pIRES</i>
pRSET-rev	as	2658-2639	TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG	56-58°C	<i>pRSETa</i>
pIVEX-as	as	886-868	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	56-58°C	<i>pIVEX2.4b</i>

2.3.2 Primer für die Homologieklonierung

Die Primer der folgenden Auflistung wurden für die unterschiedlichen Strategien der AC-Suche verwendet.

Tabelle 2: Primer der AC-Homologieklonierung durch PCR

Bezeichnung.		Prot.seq.	Sequenz 5'→3'	Bemerk.
CIIIAC1-s	s	VKTIG(D/E)	GTA AA(AG) ACI AT(ATC) GG(GATC) GA	24x Deg.
CIIIAC1-as	as	GPTVN(V/M) A	GC CA(CT) ATT AAC IGT (GATC)GG (GATC)CC	32x Deg.
S1 (sense)	s	EKIKTVG	GAA AAA ATC AAG AC(GC) GT(GC) GG	4x Deg.
S2 (sense)	s	KTYMAA	AAA ACC TAT ATG GCT GC	
CIIIAC2-s	s	DIAGFT	GAT AT(AT) GC(AT) GG(GATC) TT(TC) AC	32x Deg.
CIIIAC2-as	as	DIYGP(D/E)	TC (AT)GG ACC GTA (AT)AT (AG)TC	8x Deg.
CIIIAC3-s	s	TIGDC(Y/Q)	ACC ATA GG(GATC) GA(TC) TG(TC) TA	16x Deg.

Bezeichnung.		Prot.seq.	Sequenz 5'→3'	Bemerk.
CIIIAC3-as	as	R(I/M)GVHT G	CC TGT ATG IAC (GATC)CC (GATC)AT (TC)CT	32x Deg.
CIIIAC3b-as	as	RVGIHTG	CC TGT ATG (AT)AT (GATC)CC (GATC)AC (CT)CT	64x Deg.
CIIAC1a-s	s	KSS(D/N)WG	AAA TC(AT) TC(AT) (AG)A(TC) TGG GG	16x Deg.
CIIAC1b-s	s	KSS(D/N)WG	AAA TC(AT) AG(TC) (AG)A(TC) TGG GG	16x Deg.
CIIAC1c-s	s	KSS(D/N)WG	AAA AG(TC) TC(AT) (AG)A(TC) TGG GG	16x Deg.
CIIAC1d-s	s	KSS(D/N)WG	AAA AG(TC) AG(TC) (AG)A(TC) TGG GG	16x Deg.
CIIAC1a-as	as	TADYDLF	AA CAA ATC ATA (GA)TC (AC)GC (AC)GT	8x Deg.
CIIAC1b-as	as	TADYDLF	AA CAA ATC ATA (GA)TC (ATC)GC (ATC)GT	18x Deg.
CIIAC1c-as	as	TADIDLF	AA CAA ATC (AT)AT (GA)TC (AC)GC (AC)GT	16x Deg.
CIIAC1d-as	as	TADIDLF	AA CAA ATC (AT)AT (GA)TC (ATC)GC (ATC)GT	36x Deg.
CIIIbAC1-s	s	DIR(N/D)FT	GAT ATT AG(GA) (GA)A(TC) TT(TC) AC	16x Deg.
CIIIbAC1-as	as	VN(I/M/V)AS (R/S)	CT ACT (AT)GC (GATC)A(CT) (AG)TT (GATC)AC	128x Deg.

2.3.3 Oligonukleotide für die Gensynthese

Tabelle 3: Oligonukleotide für die Gensynthese

Bezeichnung		Sequenz 5'→3'
a1u (121 Basen)	s	AAAAGGCGCCGCCACCATGAGCGAGGCCAGGTTAACCCCGAAG TCGATAACCAGTCCGTGATCTCCGAGGACTCCAACAACGAGGACG TGGACGTGTTCCGGCCAGGACCAAGAGATCGAC
a1r (122 Basen)	as	TGCGGATATCGTCGCCGAACAGGGCGTAGATGGTGAGCAGGTTCA CCAGGATTTGGGACCAGGAGGAGTCCAGGATGGAGGTGAGCAGG GGGAACCTGTCGATCTCTTGGTCCTGGCCGAAC
a2u (112 Basen)	s	CGACGATATCCGCATCATCGCCTTCGACAAGCGGGCCGACGACG GCTTCGACGTGATCACCATCATCTGCATGATCATCTTCTCCATCGA AATCATCATCGCCTCCCTGGTC
a2r (106 Basen)	as	TGAAACTAGTGATGTCCAGGATTTGGGACACGGTGGAGATGATGT CCAGCCAGAAGAAGAAGGAGTTGAAGTAGTCGGTGCGGACCAGG GAGGCGATGATGATTTTC
a3u (110 Basen)	s	CATCACTAGTTTCAACATCGCCGTCCGCCTGCAGGGCTCCGTGGC CGCGAAGTCCGCCTCCCAACTGTCCCAAGCCAACAAGGCCCTCCAA GACCTCCTCCAAAGCCATCC
a3r (103 Basen)	as	TTGAAAGCTTGCTCTTGGGAGTAGGAGGCGGCCTTGTACAGCTTC ACGATGCGGATCAGGCGCACCAGGCGCACCACGCGGATGGCTTT GGAGGAGGTCTTGG
b1u (129 Basen)	s	GAGCAAGCTTTCAAGCGCCAGCCATCCGCACCCAGACCACCAAG AAGTCCAAGGCCACCATCTACCCCTCCGTGTACGAGAACATCAAC AACGGCCCCGTGGAACAAGAGAACCTGAACAAGAAGGAG
b1r (121 Basen)	as	AGTTATCGATTTGCTGCTGCTTGGCGACCATGTTCTGGTTCTCGCG GTTCTCTTGGGAGTTGGCGTTGTCTCGCCCTCGCGCTGCTCGGT GTTGTTCTCCTTCTTGTTCAGGTTCTCTTG

Bezeichnung		Sequenz 5' → 3'
c1u (139 Basen)	s	GCAAATCGATAACTCCATCCCCAAAGTCCAGCAGATCCGCCGCCA ATCCATGAAGGAGCCCTCGCAAGTGAAGGCCAAGGAGAAGAAGGA GTCCCGCGTGTCCAAGCGCCTGTCCGACTCCACCACCAAGAAGGT CATC
c1r (130 Basen)	as	CACCACGCGTACGTATTCGGCGGCGTAGGCCAGGGAGTAGGAGG GTTCAAAGTAGTAGTCGGAGGAGAACAGGGGCATGATGAGCAGGA GCAGGATCACCAGGATGATGACCTTCTTGGTGGTGGAGTCG
c2u (118 Basen)	s	ACGTACGCGTGGTGGCCGAGATCCCCAACACCAAGCTGACCGAG ATCAACCAGACCATCTACTTCGTCATCGACCAGCACAAGTCCTTCG ACACCCCCGTGGCTACATCACCAACCC
c2r (107 Basen)	as	CCACGAGCTCGAAGTAGTAGGACTTGGAGGACTCGCGCAGGTATT GGTAGGAGGGGTCTCGTAGTTCTCGATCTCGGTGAAGGGGTTG GTGATGTAGCCGACGGG
d1u (127 Basen)	s	CTTCGAGCTCGTGGACCCCGTGCTGGTCCGGCCTGGAGTACATCG GCGACCCCGTCATCCTGTTCTGTGTCGACAACCTCCGACGTCGAAT CCAAGAACTCCATCATCAACATCGTGAACACCCTGTTC
d1r (102 Basen)	as	CGGTCAATTGGCTTCAGGGCCACGTTGTTGGCGTCGTTGGAGAAG GCGATGGCCCCGAACAGCAGCACGGCGGAGACGAACAGGGTGT CACGATGTTGATG
d2u (126 Basen)	s	AAGCCAATTGACCGCATGATCGTGAAGGTGAACCTGATCGCCAAG AACCCCCAACTGGCGAAGGAGATGAAGCTGGAGTCCGACGGCAC GCAGAAGGAGACCACCCAAATCGAGAACGCCATCATC
d2r (116 Basen)	as	TGGGGTCGACGTCGCCGGAGGAGGCCATGTTGGTGCCGATGATG GCGGAGCCGGCGTCGCCGAAGCCGAGGGCCAGCAGTGCCCGGA TCTTGATGATGGCGTTCTCGATTTGGGTG
e1u (157 Basen)	s	CGACGTCGACCCCATGCTGCCCGCAAACGCAAATGGGCCATCTA CGGCTTCTGCGACATCCGCAACTTCACCGACGCCACGGAAGTCCT GCAGAAGGACGTCATGCTGTTTCGTCAACAACATCGCCGAGATCGT GCACTCCATGGTTCGATCGCTAC
e1r (153 Basen)	as	GTCGGCTAGCTGGTTGATGAAGGTCAGGTTGGACCACTTGATCTC GTTGCCGTCTCGTACCACTGGCTGTCGTTGATCTTCCACACGAG CAGGAAGGCGTCGCCGATGTTCTTGTGGCGGAGCCTTGGTAGCG ATCGACCATGGAGTGAC
e2u (115 Basen)	s	ACCAGCTAGCCGACTGCGCCCTGATCGCCTTCATGAAGATCTACG CCAAGATCAACCGCGAGCCCAAGATCCTGGAATACCGCAACGACG AGCGCCTGTCCCAACGCCTCCCCGG
e2r (111 Basen)	as	TAGGACGCGTCGATCTTGAACCTCGGAGCCGATGGCCCCCTCGATG CCCCAGCCGATGTGCAGGCCGAAGCCCATCTTGACTTTGTAGCCG GGGAGGCGTTGGGACAGGCGC
e3u (129 Basen)	s	ATCGACGCGTCCTACCTGTCCCCAACGTGAACATGGCCTCCCGC CTGGAAGCCGCCACGAAGCAGTACGGCGTGGCCGTGCTGATCAG CAGCGAGCTGCACCAGTACTTCTCCAACGAGGTCAAGAAG
e3r (127 Basen)	as	CTGTTTCGAAGGCGGCAGGTCGTCCGCCCTCCATCTCCACGGTGAA CAGGCCGATGGGCTTACGGAGCCCTTACGGTGACTTTGTTCGAT CTGGCGGGTGTACTTCTTGACCTCGTTGGAGAAGTAC
f1u (107 Basen)	s	CGCCTTCGAAACAGGACTACCCGCAAGAGGAGAAGCAGCAAGTCA TGACGAGAAGAAGCAGATCTTCTGCAACAACCTGGAGTCCGGCG ACTTCAACGCCGAGCTG
f1r (103 Basen)	as	GCCTTGCCAAACTGGTGCAGGAACTCCTGGTTCACGTTCTTGGT GATCAGGCCAGGTCCTTGTGCGCTTGATGTACAGCTCGGCGTT GAAGTCGCCGGAC

Bezeichnung		Sequenz 5'→3'
f2u (110 Basen)	s	AGTTTGGCCAAGGCTTCCAGGGCTACCTGCTGGGCAACTGGAAGG AGGCCACATGCTGTTTCGAGAAGGCCAAGCAGATCCGCCCAACG ACGGCCCCATCTCCACCCTG
f2r (112 Basen)	as	TTTTGCGGCCGCTCACTTCTCGGTTCAGCTCGCGGTAGCCCTTCCA GTGCTCGGGGCCTTGAAGTTGGTCTCGCCCATGACGTTGAACAG GGTGGAGATGGGGCCGTCGTTG
d2rll	as	TGGGGTCGACGTCTCCAGATGATGCCATGTTTCGTTCCGATGATGG CAGATCCAGCATCTCCGAATCCGAGTGCCAGCAGTGCGCCGATCT TGATGATGGCGTTCTCGATTTGGGTG
d2neu2-s (bp 1363-1402)	s	AAG CCA ATT GAC CGC ATG ATC GTC AAA GTC AAC CTG ATC G
d2neu2-as (bp 1558-1579)	as	TGG GGT CGA CGT CTC CAG ATG A

2.3.4 Sonstige Oligonukleotide für PCR

Tabelle 4: Folgende PCR-Primer dienen der Herstellung von Konstrukten, der Einführung oder dem Anhängen von Schnittstellen und *tags*, der Einführung von Mutationen oder der Vervielfältigung. *Kursiv* gedruckte Basen binden nicht an der Matrize.

Bezeichng.		Position ⁴ [bp]	Sequenz 5'→3'	Bemerk.
u-Primer	-		AAT ACG ACT CAC TAT AG	
r-Primer	-		AAC AGC TAT GAC CAT G	
ACpS1	s		GAT GCC ACT GAA GTC TTG	Sonde 1
ACpAS1	as		TTA ATC TCT CAT CAT TTC	Sonde 1
ACp-s2	s	cKlon: 02-19	GAA GCT CAA GTA AAT CCG	Sonde 2
ACp-as2	as	cKlon: 296-310	AAA TAG TCA GTT CTA	Sonde 2
pACAnfg-s1	s	gKlon: 222-239	GGA ATA TGA TGA AAG GGA	
pACAnfg-as1	as	gKlon: 510-517	AAA ATG TTA GAT TTT GGT	
ACpQE830s	s	1570-1587	GGA <i>TCC</i> GTC GAC CCC ATG CTG CCC	
ACpQE830as	as	2236-2253	GGA <i>TCC TCA</i> TTT CGA AGG CGG CAG GTC	
FragfDer1-s	s	2242-2259	CCG CCT TCG AAA CAG GAC	
FragfDer1-as	as	2578-2595	TGC GGC CGC CTT CTC GGT CAG CTC GCG	ΔStop
FrageDer1Bam-s	s	1561-1587	TCC GGA <i>TCC</i> GTC GAC CCC ATG CTG CCC	
FrageDer1Asc-as	as	2254-2280	CTG GCG CGC CTC TTG CGG GTA GTC CTG	
AC7mutC1Bam-as	as	ACVII ⁵ mut ⁵ 721-747	GAT GGA <i>TCC</i> CTT CAT GCC CAT GGA GAT	

⁴ Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Positionsangaben auf pACsyn.

⁵ AC VII mut ist ein Konstrukt von Andreas Reimer basierend auf der Säuger-AC VII bei welchem eine *silent* Mutation zur Einführung einer Asc I-Schnittstelle durchgeführt wurde (20).

Bezeichng.		Position ⁴ [bp]	Sequenz 5'→3'	Bemerk.
AC7mutC1Sal-s	s	ACVIIImut 601-618	ATG GTC GAC GCC TCC CAC	
AC7mutC2Bam-as	as	ACVIIImut 2563-2589	CTT GGA TCC GAT GAA GTG GGC GGC CAC	
AC7mutC2Xho-s	s	ACVIIImut 2440-2457	CAG CTC GAG TAT TAT TGC	
KozpQE-s	s	pQE30 115-132	TTG ATA TCG CCG CCA CCA TGA GAG GAT CGC ATC AC	
FragfNot-as	as	2589-2606	TTG CGG CCG CTC ACT TCT CG	
SigPara-s1	s	1-18	AAA CCC GGG ATG AGC GAG GCC CAG GTT	
SigPara-s2	s	85-105	AAA CCC GGG CAG GAC CAA GAG ATC GAC	
Myktub1-s	s	Rv1625c 2-18	AAA GGA TCC ATG GCG GCA AGA AAA TGC	Myc.tu. ⁶ v. JW ⁷
SigMycP-as	as	Rv1625c 82-99	AAA CCC GGG AGC GCG GGC CTG AGT	Myc.tu.
IRK1s	s	IRK1 1-18	AT GGG CAG TGT GAG AAC C	Kir2.1 IRK1
IRK1as1	as	IRK1 67-84	AAA GTT AAC ATT GGC ATC TGC AAT AGT	
IRK1as2	as	IRK1 211-230	AAA GTT AAC ACA GGT AGT AAA GAT GTC	
rSK2s	s	rSK2 1-18	AAA AGG CGC CGC CAC CAT GAG CAG CTG CAG GTA C	
rSK2as1	as	rSK2 60-79	AAA GAT ATC GTG CAG GTT CCG GCG GGA	
rSK2as2	as	rSK2 370-389	AAA GAT ATC AAA CAG GGC ACG CCG ATG	
GERKEpAC-s	s	stopMut ⁸ 1603-1620	AAA GGA TCC GGT GAA CGC AAG GAG GCA ATT TAT GGA TTT TGT	
GER-VLpAC-s	s	stopMut 1615-1632	AAA GGA TCC GGT GAA CGC AAG GAG GTG ACT GTT TTA TTT TGT GAT ATT CGT AAT	
pACQe3	as	stopMut 2146-2163	AAA CAG CTG TCT GGT GTA TTT CTT GAC	von JL ⁹
GKRKWana-s	s	AnaCyaB1 1798-1815	AAA GGA TCC GGT AAA CGT AAA TGG GTG ACT GTT TTA TTT TCA	
GKR-YGana-s	s	AnaCyaB1 1810-1827	AAA GGA TCC GGT AAA CGT AAA TGG GCA ATT TAT GGA TTT TCA GAT ATC CGA GGC	
ANCB1as	as	AnaCyaB1 2563-2580	AAA GGA TCC CTA CTT TGT GAA AAT TGT	von JL

⁶ Myc.tu.: *Mycobacterium tuberculosis*

⁷ v. JW: Primer wurde von Jost Weber zur Verfügung gestellt

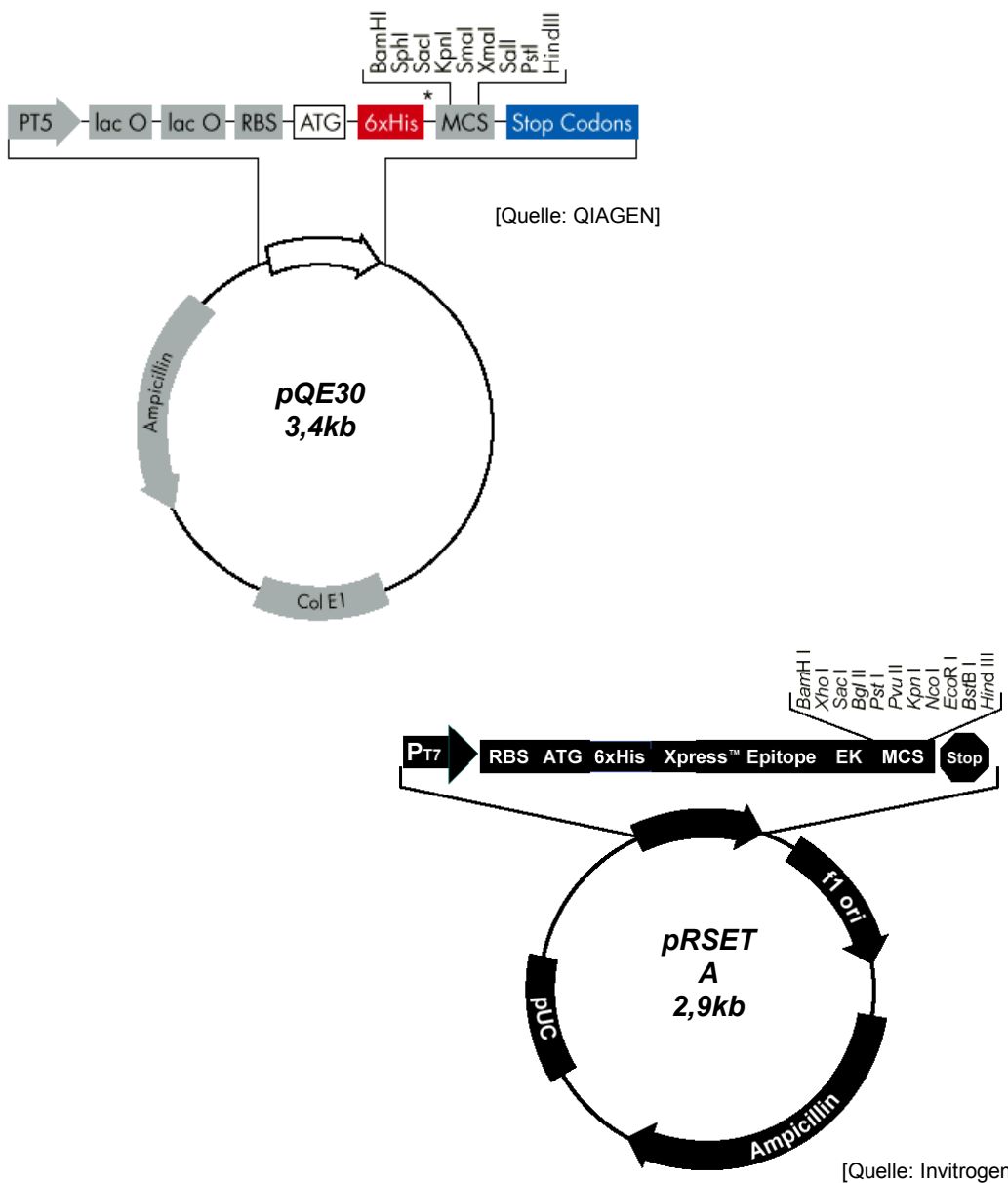
⁸ stopMut: Stopcodon-Mutante des Frag. d von pACsyn (s. Abschn. 4.3.4.2)

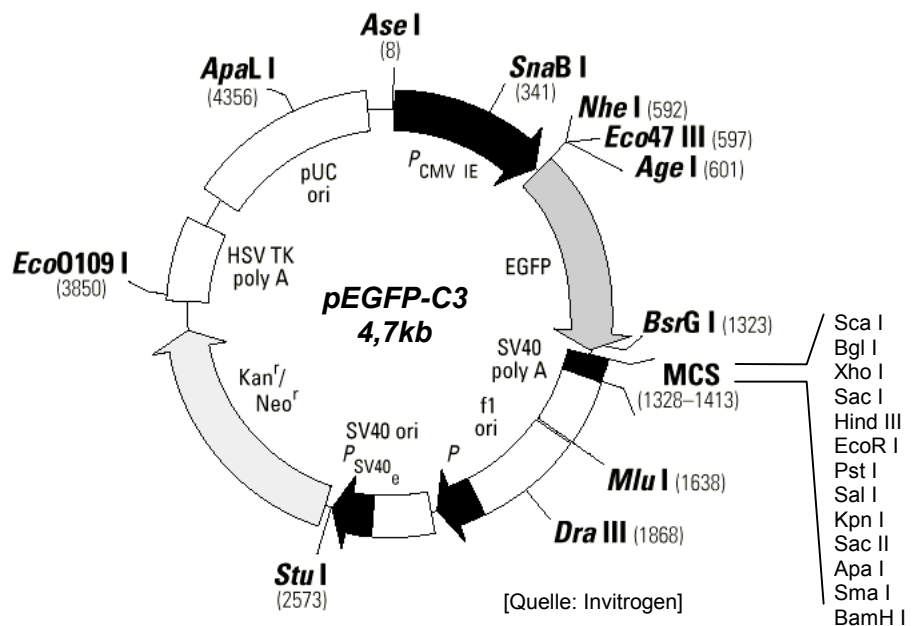
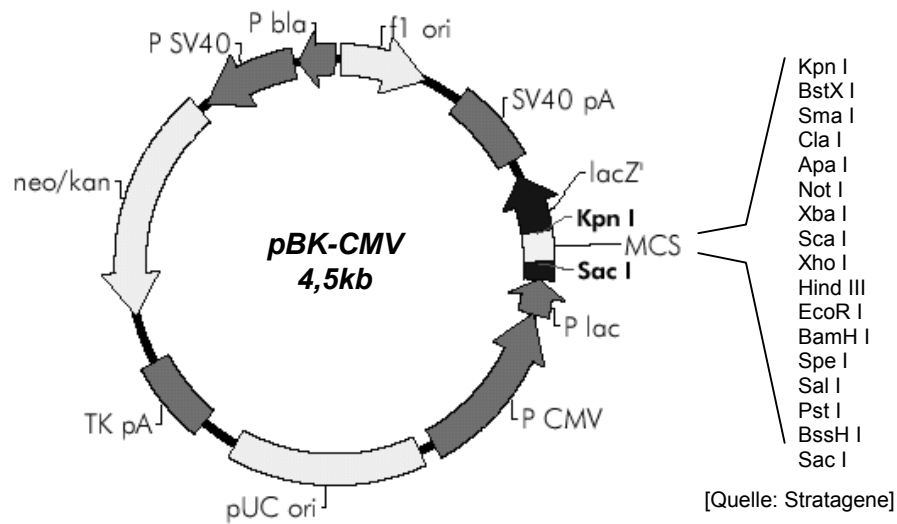
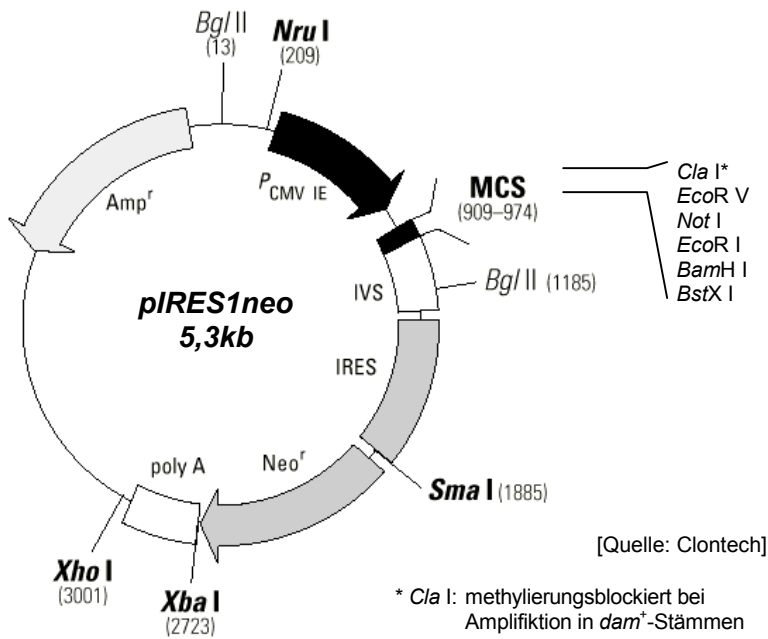
⁹ von JL: Primer wurde von Jürgen Linder zur Verfügung gestellt

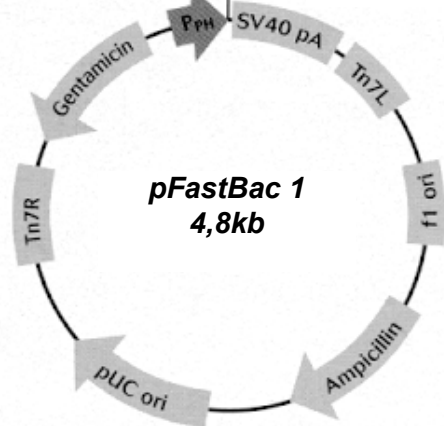
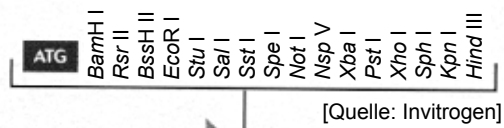
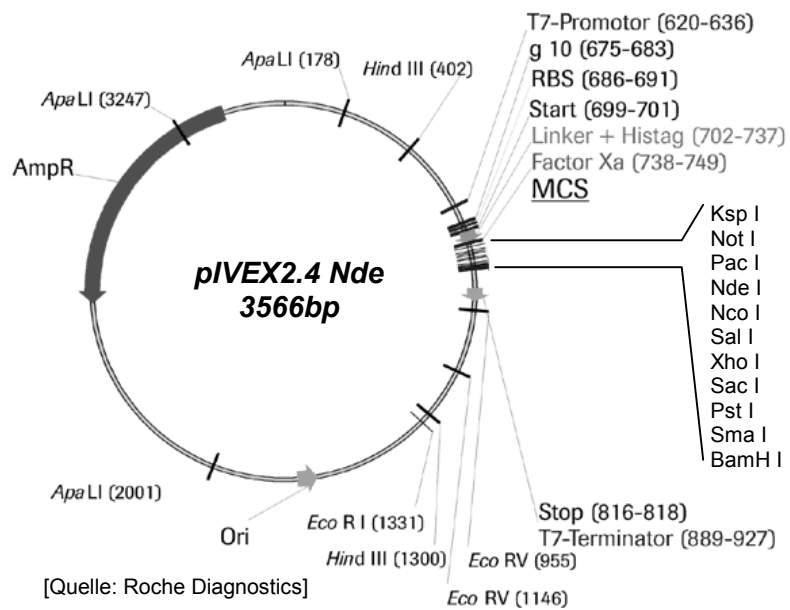
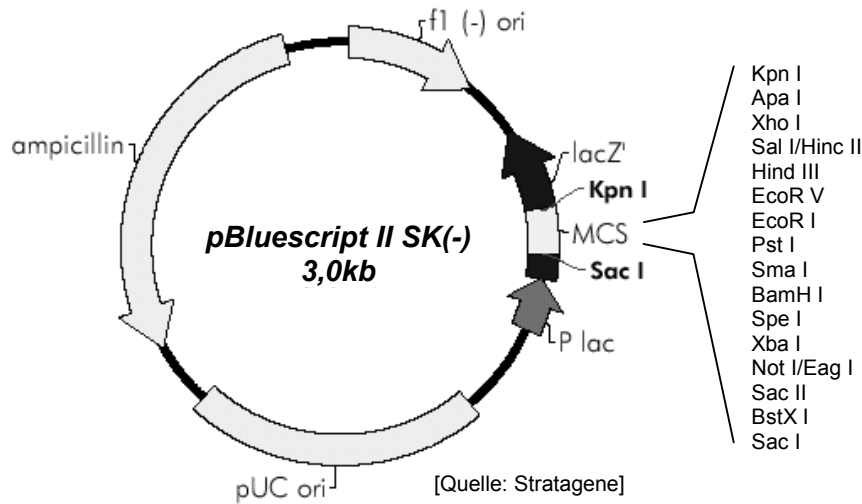
Bezeichnung.		Position ⁴ [bp]	Sequenz 5'→3'	Bemerk.
ParAC QKD-QAAD	s	stopMut 1663-1680	AAA CTG CAG GCC GCT GAT GTG ATG TTG TTT GTA	
pACs-4as	as	pACsyn 2302-2319	TTG TTG CAG GAA GAT CTG	von JL
pACsyn-NdeGKRKW-s	s	1588-1608	AAA CAT ATG GGC AAA CGC AAA TGG GCC ATC	
pACsyn-stopSma-as	as	2578-2598	AAA CCC GGG TCA CTT CTC GGT CAG CTC GCG	
FCYENE-s	s	Kir2.1 1104-1137	AAC TCG AGT CAA ATG CAA ATT CAT TTT GCT ATG AAA ATG AAG	Kir2.1 IRK1
FCYENE-as	as	Kir2.1 1119-1154	AAG GCG CCT TTG CTT GTT AGG GCA ACT TCA TTT TCA TAG CAA AA	Kir2.1 IRK1
PIACsyntKat-s	s	plACsyn 1576-1593	AAA GGA TCC GGC GAG ATC GTG TAC TCC	von JW
PlasmMsc-as	as	plACsyn 1738-1758	AA TGG CCA GAC CAG CAG GAA GGC GTC	
PlasmDraDra-mut-s	s	plACsyn 1759-1809	AA TTT AAA TAC CAG AAG AAG GAG TAC TCC AAC AAG AAG ATG AAC ATG TTC AAA TCC	
PIACsyntKat-as	as	plACsyn 2642-2663	AAGC GGC CGC TCA GGA CTT TTG C	von JW
plAC+pSfu-as	as	plACsyn 2239-2256	ATTT CGA AGG CGG GAT CTT GTT CAG GCA GAT	
HpaplAC-s	s	plACsyn 2264-2286	AG GTT AAC ATG GAG AAC TTC GAC	
ACeV1s	s	1600-1617	GGA TCC GGC AAA CGC AAA TGG GCC	von JL
pAC+plHpa-as	as	2236-2253	AA GTT AAC CTT CTT GGT CAG GTC GTC GGC CTC CAT	
pAC-sys	s	2275-2292	AAG CAG CAA GTC ATG TAC	
plAC-synt-EcoRV-s	s	plACsyn 2230-2247	ACC TTC GAT ATC TGC CTG	von JW
pUC-rev	as		AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG	Bacmid

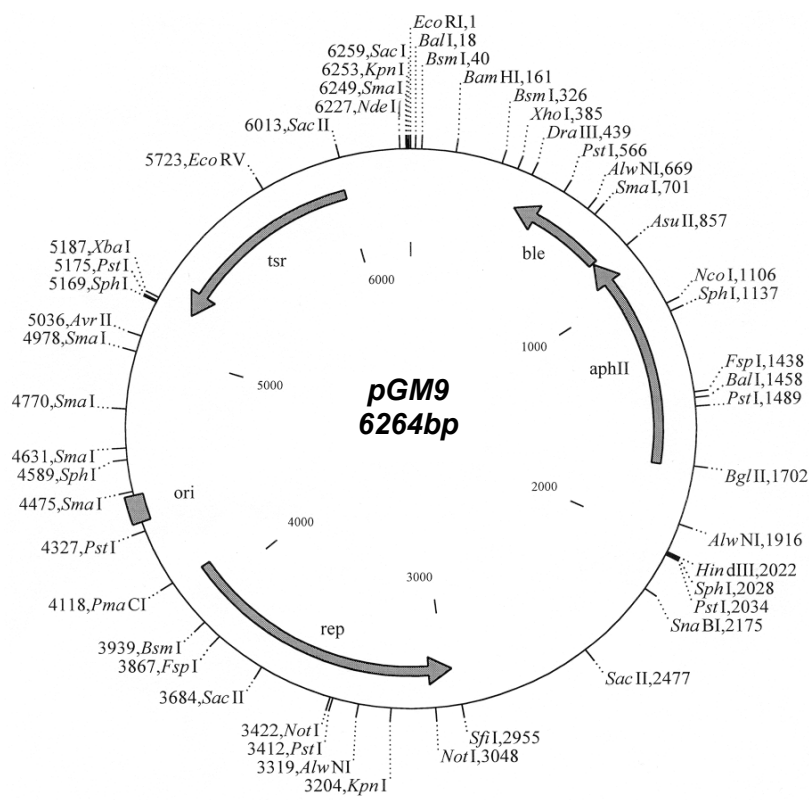
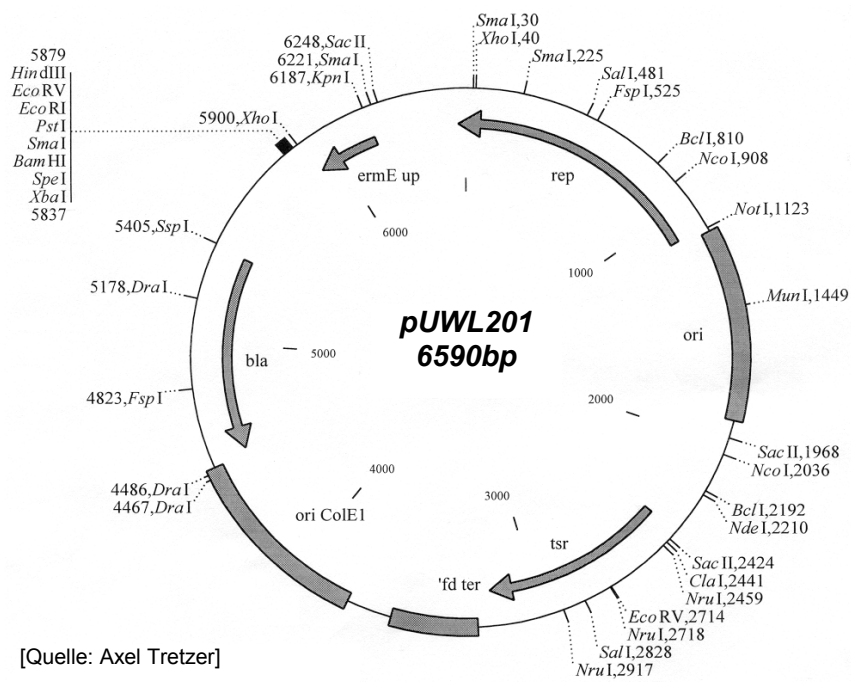
2.4 Verwendete Plasmidvektoren

Abbildung 2: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmidvektoren: *pBluescript II SK(-)* (Stratagene): Klonierungsprojekte; *pQE30* (Qiagen): Proteinexpression in *E.coli M15 [pRep4]* und *E.coli BL21(DE3)[pRep4]*; *pIRES1neo* (Clontech): bicistronischer Vektor für Proteinexpression in *HEK293*; *pBK-CMV* (Stratagene): Insert-Umgebung der genomischen DNA-Bank; Fluoreszenz-Lokalisationsuntersuchungen in *CHO*-Zellen; *pEGFP-C3* (Clontech): Fluoreszenz-Lokalisationsbestimmungen in *OK*-Zellen; *pIVEX2.4b Nde I* (Roche Diagnostics): *in vitro*-Proteinexpression mit *RTS500*-System; *pUWL201* (erhalten von Axel Trefzer): Proteinexpression in *Streptomyces lividans 1326*; *pRSETa* (Invitrogen): T7-Expressionsvektor für Fusion mit Streptomycetenvektor *pGM9*; *pGM9* (erhalten von Volker Pfeifer): Proteinexpression in *T7-S.lividans*; *pFastBac1* (Invitrogen): Donorplasmid für Bacmidherstellung für *Sf9*-Transfektion.









2.5 Puffer und Lösungen und verwendete Genbanken

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt, wenn nicht anders angegeben, bei RT.

2.5.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Die Sterilisierung aller Puffer und Lösungen erfolgte durch autoklavieren (121°C, 1bar, 20min) oder Sterilfiltration (0,2µm).

2.5.1.1 Puffer für die Isolierung, Reinigung, Elektrophorese, Sequenzierung und Prozessierung von DNA

TAE

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

10x TBE-Puffer (LI-COR)

1,34M Tris
440mM Borsäure
25mM EDTA

TE-Puffer

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

10x Klenow

200mM Tris/HCl pH 7,9
60mM MgCl₂
10mM Dithiothreitol
0,1% BSA

10x CM

100mM CaCl₂
100mM MgCl₂

Probenpuffer (Agarosegel)

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

Phenol/Chloroform-Lösung

50% (v/v) Phenol, pH 7,5
48% (v/v) Chloroform
2% (v/v) Isoamylalkohol

Chloroform/Isoamylalkohol-Lsg.

96% (v/v) Chloroform
4% (v/v) Isoamylalkohol

10x Dephosphorylierungspuffer

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

dNTPs

20mM je dNTP

2.5.1.2 Puffer und Lösungen für Genbibliothek-Screening:

20x SSC

300mM NaCitrat pH 7,0
3M NaCl

50x Denhards Lösung

5g/500ml Ficoll
5g/500ml Polyvinylpyrrolidin
5g/500ml BSA

Prähybridisierungs-Lösung

5x Denhards Lösung
 5x SSC
 50% Formamid
 0,1% SDS
 100µg/ml denaturiertes
 Heringssperma

Hybridisierungs-Lösung

$1,5 \times 10^6$ - 6×10^6 cpm/ml
 denaturierte, radioaktiv markierte Sonde
 in Prähybridisierungs-Lösung

Denaturierungs-Lösung

0,5M NaOH
 1,5M NaCl

Neutralisations-Lösung

0,5M Tris/HCl pH 7,5
 1,5M NaCl

Wasch-Puffer

1x SSC
 0,1% SDS

2.5.1.3 Nährmedien für *E.coli*-Bakterien**LB-Medium**

20g/l LB Broth (Fertigpulver)

NZY-Medium

10g/l NZ-Amine
 5g/l Hefeextrakt
 5g/l NaCl
 2g/l MgSO₄

LB-Plattenagar

35g/l LB Agar (Fertigpulver)

NZY-Plattenagar

1,5% Agar
 in NZY-Medium

LB-Plattenagar mit Antibiotika

100µg Ampicillin und/oder
 50µg Kanamycin und/oder
 10µg Tetracyclin und/oder
 7µg Gentamycin
 pro ml Plattenagar

NZY-Topagar

0,75% Agarose
 in NZY-Medium

SM-Puffer

50mM Tris/HCl pH 7,5
 100mM NaCl
 15mM MgSO₄

Prä-SOB-Medium (für *E.coli*)

10g/l Bacto Trypton
 0,5g/l NaCl
 5g/l Hefeextrakt
 11g/l KCl

SOC-Medium (für *E.coli*)

10mM MgCl₂
 25mM Glucose
 in Prä-SOB-Medium

2.5.2 Puffer und Lösungen für Proteinchemie

2.5.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer

1,5M Tris/HCl pH 8,8
0,4% SDS

Sammelgelpuffer

500mM Tris/HCl pH 6,8
0,4% SDS

Hoefer-Laufpuffer

25mM Tris
192mM Glycin
0,1% SDS
pH nicht einstellen! (ca. 8,3)

Probenpuffer

130 mM Tris/HCl pH 6,8
10% SDS
2% Lithiumdodecylsulfat
10% β-Mercaptoethanol
20% Glycerol
0,03% Bromphenolblau

Coomassie Färbelösung

0,2% Brilliant Blue G-250
40% Methanol
1% Essigsäure

Entfärber

10% Essigsäure
30% Ethanol

2.5.2.2 Puffer für Western Blots und verwendete Antikörper

Transferpuffer (nach Towbin)

25mM Tris/HCl pH 8,3
192mM Glycin
20% Methanol

M-TBS

5% Milchpulver
in TBS-Puffer

TBS-Puffer

20mM Tris/HCl pH 7,6
0,8% NaCl

TBS-T

0,1% Tween 20
in TBS-Puffer

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper, deren Verdünnung in Immunoblots (in M-TBS) und die Kombinationen primärer und sekundärer Antikörper im Blot

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
anti-pAC-1.x und anti-pAC-2.x Immunsereen aus eigener Herstellung, die z.T. gereinigt wurden. Epitop: katalyt. Bereich der pAC (AS 524-751) Verdünnung: üblicherweise 1:2000	Ziege-anti-Kaninchen konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase Firma Dianova Epitop: F _c -Fragment Kaninchen-IgG Verdünnung: 1:5000
anti-pAC-NT #2573 und #2574 Immunsereen, die bei Firma Biogenes hergestellt wurden; z.T. affinitätsgereinigt Epitop: Peptid des N-terminalen Bereich der pAC EVDNQSVISEDNNED (AS 9-24) Verdünnung: üblicherweise 1:2000	

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
anti-myc-Antikörper ¹⁰ Monoklonaler Antikörper aus Kulturüberständen einer Maus-Hybridoma-Zellkultur (ungereinigt eingesetzt) Epitop: <i>Hexamyc-tag</i> (s. S. 45) (6x 13AS des menschlichen c-myc Protoonkogens) Verdünnung: 1:100	Ziege-anti-Maus konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase Firma Dianova Epitop: F _c -Fragment Maus-IgG Verdünnung: 1:5000
anti-RGS(His) ₄ -Antikörper Monoklonaler Antikörper der Firma Qiagen. Epitop: Peptid- <i>tag</i> RGSHHHH Verdünnung: 0,1 µg/ml	

2.5.2.3 Puffer für denaturierende Proteinreinigung an Ni-NTA-Agarose

Puffer A

6M Guanidiniumchlorid
 100mM NaH₂PO₄
 10mM Tris/HCl pH 8,0

Puffer B

8M Harnstoff
 100mM NaH₂PO₄
 10mM Tris/HCl pH 8,0

Puffer C

8M Harnstoff
 100mM NaH₂PO₄
 10mM Tris/HCl pH 6,3

Puffer E (Elutionspuffer)

8M Harnstoff
 100mM NaH₂PO₄
 10mM Tris/HCl pH 4,5

2.5.2.4 Puffer für native Proteinreinigung an Ni-NTA-Agarose

Für Expressionsprodukte des RTS500-Systems und aus *Streptomyces lividans*:

Die pH-Einstellung erfolgte auf Eis

Lysispuffer (P2) *

50mM Tris/HCl pH 8,5
 10mM Thioglycerol
 50mM NaCl

Wasch Puffer P3

50mM Tris/HCl pH 8,5
 10mM Thioglycerol
 2mM MgCl₂
 400mM NaCl
 5mM Imidazol

Wasch Puffer P4

50mM Tris/HCl pH 7,5
 10mM Thioglycerol
 2mM MgCl₂
 400mM NaCl
 15mM Imidazol

¹⁰ Dieser Antikörper wurde uns freundlicherweise in Form von Kulturüberständen von Dr. Wulf Dirk Leuschner zur Verfügung gestellt (Kulturmedium: 10% FCS in RPMI). Er stammt aus Maus-Hybridomazellen (Klon 9E10).

Wasch Puffer P5 *

50mM Tris/HCl pH 7,5
 10mM Thioglycerol
 2mM MgCl₂
 10mM NaCl
 15mM Imidazol

Elutionspuffer *

50mM Tris/HCl pH 7,5
 10mM Thioglycerol
 2mM MgCl₂
 10mM NaCl
 150mM Imidazol

* Für die native Reinigung aus *Streptomyces l.* war in den Puffern 10mM β-Mercaptoethanol anstelle von Thioglycerol enthalten. Der pH-Wert der Puffer betrug pH 8,0.

Für die Reinigung von Expressionsprodukten aus Sf9-Zellen ¹¹:

Bei diesen Puffern wurde Thioglycerol erst unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

Sf9-Lyse-/Bindepuffer

50mM Tris/HCl pH 8,0
 2mM MgCl₂
 0,025% Thioglycerol
 15mM Imidazol

Elutionspuffer

37,5mM Tris/HCl pH 8,0
 0,188% Thioglycerol
 261,25mM Imidazol

2.5.2.5 Puffer und Lösungen für Adenylatcyclase-Enzymtests

AC-Suspensionspuffer

20mM Tris/HCl oder MOPS¹²
 pH 7,5
 20% Glycerol
 1% Thioglycerol
 1Tab/10ml *Complete™ Mini* *
 (enthält 1mM EDTA)

* zu Beginn der Arbeit wurde mit den folgenden Proteasinhitoren gearbeitet (anstelle der Tabletten *Complete™ Mini*):
 1mM Benzamidiniumchlorid
 1mM EDTA

Sf9-AC-Suspensionspuffer

50mM Tris/HCl pH 8,0
 100mM KCl
 2mM MgCl₂
 0,025% Thioglycerol¹³

E.coli-Aufnahmepuffer

50mM Tris/HCl pH 7,5
 20% Glycerol

AC-Substrat-Lösung (10x)

750μM ATP
 inkl. 16-30kBq [α-³²P]-ATP

AC-Stoppuffer (1,5x)

3mM cAMP
 1,5% SDS

¹¹ Nach einem optimierten Protokoll von Jost Weber

¹² Wenn im Text keine anderen Angaben gemacht werden, wurde der Test mit Tris/HCl-haltigem Suspensionspuffer durchgeführt.

¹³ Thioglycerol wurde wegen seiner geringen Stabilität in Lösung direkt vor Verwendung frisch zugegeben

AC-Cocktail (2x)

43,5% Glycerol
 100mM Tris/HCl pH 7,5 oder 8,0
 100mM KCl
 4mM cAMP
 inkl. $\approx 100\text{Bq}$ [2,8- ^3H]-cAMP
 0,46mg Kreatinkinase
 6mM Kreatinphosphat
 4mM MnCl_2 und/oder
 20mM MgCl_2

2.5.2.6 Puffer für Antikörper-Herstellung und -Reinigung**PBS**

8g/l NaCl
 0,2g/l KCl
 1,44g/l Na_2HPO_4
 0,24g/l KH_2PO_4
 HCl bis pH 7,4

2.5.2.7 Antikörperreinigung mittels Protein A-Sepharose**Äquilibrierungs-Puffer**

100mM Tris/HCl pH 8,0

Waschpuffer I

100mM Tris/HCl pH 8,0

Waschpuffer II

10mM Tris/HCl pH 8,0

Elutionspuffer

100mM Glycin/HCl pH 3,0

2.5.2.8 Antikörperreinigung an Antigen-gekoppeltem Affi Gel 10**Äquilibrierungspuffer**

10mM Tris/HCl pH 7,5

Hochsalzpuffer

500mM NaCl
 10mM Tris/HCl pH 7,5

Elutionspuffer

100mM Glycin/HCl pH 2,5

2.5.3 Puffer und Lösungen für Zellkulturen

Die Lösungen wurden sterilisiert durch autoklavieren (121°C , 1bar, 20min) oder, bei nicht-autoklavierbaren Inhaltsstoffen, durch Sterilfiltration ($0,2\mu\text{m}$). Steril gelieferte Fertigmedien waren hiervon ausgenommen; hier wurden sterilisierte Zusätze unter keimarmen Bedingungen zugegeben.

2.5.3.1 Eukaryotische Zellkulturen

HEK293-Medium

500ml MEM (Gibco)
50ml FCS
10mg Gentamycin

2x HEBS

50mM HEPES pH 7,08
280mM Na₂HPO₄
1,5mM NaCl

Calcium-Transfektions-Lsg.

2,5M CaCl₂

G418-Lösung

10mg/ml G418 (Geneticin)
100mM HEPES/NaOH pH 7,1

Sf9-Monolayerkultur-Medium

500ml TC100 Insektenmedium
50ml FCS
5mg Gentamycin

Sf9-Suspensionskultur-Medium

500ml TC100 Insektenmed.
50ml FCS
5mg Gentamycin
0,1% Pluronic F-68

Sf9-Transfektionsmedium

TC100 Insektenmedium
ohne Zusätze

Sf9-Einfriermedium

15% DMSO
in Monolayerk.-Med.

2.5.3.2 Herstellung der Paramecienlysate für RTS500-Expressionsversuche

Waschpuffer

20mM MOPS/Tris pH 7,2
6mM KCl
1mM MgCl₂
50µM CaCl₂

Lyse-Puffer

20mM MOPS/Tris pH 7,2
6mM KCl
1mM MgCl₂
50µM CaCl₂
1Tab/10ml *CompleteMini* (Roche)
(enthält 1mM EDTA)

Nuklease S7-Lösung

150000U/ml Nuklease S7
50mM Glycin pH 9,2
5mM CaCl₂

2.5.3.3 Streptomyceten-Kultur

Protoplastierungspuffer (P-Puffer)

25mM	TES pH 7,2
103g/l	Saccharose
10mM	MgCl ₂
2,5mM	CaCl ₂
1,4mM	K ₂ SO ₄
0,4mM	KH ₂ PO ₄
0,2%	Spurenelement-Lsg.

Transformationspuffer (T-Puffer)

25%	PEG 1000
2,5%	Saccharose
1,4mM	K ₂ SO ₄
400µM	KH ₂ PO ₄
50mM	Tris/Maleat pH 8,0
10mM	MgCl ₂
10mM	CaCl ₂
0,3%	Spurenelement-Lsg.

Spurenelement-Lösung

740µM	FeCl ₃ ·6H ₂ O
26µM	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O
8µM	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O
59µM	CuCl ₂ ·2H ₂ O
50µM	MnCl ₂ ·4H ₂ O
300µM	ZnCl ₂

CRM-Medium

103g/l	Saccharose
20g/l	Tryptic Soy Broth
10,12g/l	MgCl ₂ ·6H ₂ O
10g/l	Hefeextrakt

HA-Medium

4g/l	Hefeextrakt
10g/l	Malzextrakt
4g/l	Glucose
1mM	CaCl ₂
herstellen mit Leitungswasser	
pH 7,3	

HA-Agarplatten

18g/l	Agar
in HA-Medium	

R5-Medium

103g/l	Saccharose
10g/l	Glucose
0,25g/l	KSO ₄
10,12g/l	MgCl ₂ ·6H ₂ O
0,1g/l	Casaminoacids
5g/l	Hefeextrakt
5,73g/l	TES
2ml/l	Spurenelement-Lsg.
8ml/l	1N NaOH
in 955ml/l H ₂ O bidest.	

R5-Agarplatten

18g/l	Agar
in R5-Medium	

nach Autoklavieren zugeben:

20ml/l	1M CaCl ₂
10ml/l	40mM KH ₂ PO ₄
15ml/l	20% L-Prolin

S-Medium mit 0,75% Glycin

Lösung A und Lösung B getrennt
autoklavieren, dann mischen

Lösung A: 4g Pepton
4g Hefe-Extrakt
4g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$
2g KH_2PO_4
7,5g Glycin
ad 800ml H_2O bidest.

Lösung B: 10g Glucose
0,5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
ad 200ml H_2O bidest.

NB-Weichagar

8g/l Nutrient Broth
5g/l Agar

R3-Weichagar

171g Saccharose
10g Glucose
4g Pepton
0,5g KCl
8,1g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
2,2g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$
8g Agar
auf 860ml mit Wasser auffüllen

nach autoklavieren steril zugeben:

40ml 40mM K_2HPO_4
100ml 250mM TES pH 7,2

2.5.4 Verwendete Genbanken

Zur Verfügung standen zwei Genbanken, die von Jürgen Linder 1995 (13) hergestellt worden waren:

cDNA-Genbank aus *Paramecium tetraurelia* 51s

Es handelt sich um eine Genbank, die mit folgenden Kits der Firma Stratagene hergestellt worden war: *Messenger RNA Isolation Kit*, *ZAP cDNA Synthesis Kit*, *ZAP Express EcoR I/Xho I Vector Cloning Kit*¹⁴, *Gigapack II Gold Packaging Extract* (21, 22). Es wurden zwei Primärbanken hergestellt (getrennt verpackt), bezeichnet als Fraktion1 und Fraktion2. Sie unterscheiden sich in der Länge der eingesetzten cDNA-Stücke¹⁵. Primärbank Fraktion1 besitzt einen Titer von $3,1 \times 10^6$ pfu/ μ g, Fraktion2 $3,5 \times 10^6$ pfu/ μ g. Neben den Primärbanken lagen amplifizierte Subfraktionen vor. Von Primärbank Fraktion1 waren 9 Subfraktionen à 50000pfu der Primärbank verfügbar. Von Subfraktion 8 wiederum lagen 20 Amplifikate à 10000pfu vor.

¹⁴ Die unmittelbare Umgebung des cDNA-Inserts in diesem Vektor ist *pBK-CMV*, das heißt *in vivo* Excision führt zu cDNA-Inserts im Plasmid *pBK-CMV*.

Genomische DNA-Bank aus *Paramecium tetraurelia* 51s

Diese Genbank war mit folgenden *Kits* der Firma Stratagene ausgehend von *EcoR* I-verdauter, gescherter, genomischer DNA hergestellt worden: *Predigested Lambda ZAP II/EcoR I/CIAP Cloning Kit*¹⁶ (23), *Gigapack II Gold Packaging Extract*. Die entstandene Primärbank zeigte einen Titer von insgesamt 3×10^6 pfu. Außerdem standen auch von dieser Primär-Genbank amplifizierte Subfraktionen zur Verfügung: Subfraktionen 1-20 mit jeweils max. 50000 unterschiedlichen Viren.

¹⁵ Fraktionen 1 und 2 einer Größenfraktionierung der hergestellten cDNA über *Sephacryl S 400*; die erhaltenen cDNA-Fraktionen wurden getrennt weiterverarbeitet (Ligation mit dem *Lambda ZAP Expressvektor* und *in vitro*-Verpackung)

¹⁶ Unmittelbare Umgebung der genomischen DNA-Inserts sind Arme des Plasmids *pBluescript II SK(-)*.

3 Methoden

3.1 Gentechnologische Methoden

3.1.1 Grundlegende Methoden der Analyse, Prozessierung und Rekombination von DNA

3.1.1.1 Routineverfahren

Phenol/Chloroform-Extraktion

Die zu reinigende DNA-Probe wurde mit Wasser auf ca. 300µl verdünnt. Dies dient der Volumenvergrößerung um absolute Verluste bei den folgenden Phasentrennungen zu verringern. Es wurde die gleiche Menge (300µl) Phenol/Chloroform-Lösung zugesetzt und durch kräftiges *vortexen* gut gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge (3-5min, 10000xg, RT). Die obere, wäßrige Phase enthält die DNA und wurde in ein frisches Eppendorf-Cup überführt. Der Reinigungsschritt mit Phenol/Chloroform-Lösung wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die abgetrennte, wäßrige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung versetzt und durch starkes Schütteln und *vortexen* gut durchmischt. Die Phasen wurden in der Tischzentrifuge (2min, 10000xg, RT) getrennt. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und zur weiteren Reinigung und Aufkonzentration einer Ethanol-fällung unterzogen.

Ethanol-Fällung

Die DNA-Lösung wurde mit einem Zehntel ihres Volumens an 3M NaAcetat pH 4,5 gemischt und anschließend mit dem 2,5x Volumen an eiskaltem, absolutem Ethanol versetzt und *gevortext*. Nach Inkubation von mind. 30min bei -20°C wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (30min, 15000xg, 4°C) und der Überstand abdekantiert. Zum Waschen des Pellets wurden 500µl eiskaltes Ethanol 70% zugegeben und erneut zentrifugiert (20-25min, 15000xg, 4°C). Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet entweder bei RT (10-15min) oder in der *Speed Vac* (ca. 5min; evtl. ohne Heizung) getrocknet. Die DNA wurde im gewünschten Volumen Wasser oder einem geeigneten Puffer aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von wäßrigen Nukleinsäure-Lösungen wurde UV-spektrometrisch bei $\lambda=260\text{nm}$ durchgeführt. Die Berechnung des Nukleinsäuregehalts erfolgt gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

$$c[\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} \times f \times \text{Verdünnung}$$

f stellt den Absorptionskoeffizienten dar.

Für Nukleinsäuren gilt:

$$f_{\text{dsDNA}} = 50\text{ng}/\mu\text{l}$$

$$f_{\text{Oligonukleotide}} = 30\text{ng}/\mu\text{l}$$

Als Maß für die Reinheit der DNA-Lösung wurde das Verhältnis $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ bestimmt. Ein Quotient $\geq 1,8$ zeigt eine ausreichende Reinheit für weitere Anwendungen.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Flachbett-Gelelektrophorese wurde für analytische und präparative Zwecke zur Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Restriktionsverdauen, Klonierungsversuchen und PCR-Reaktionen verwendet.

Der Agarosegehalt der Gele richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente und betrug zwischen 0,8-2,5%, in Ausnahmefällen 4%.

Für die Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen (Mikrowelle) gelöst und anschließend im Gelschlitten erstarren gelassen. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden in 1/5 ihres Volumens an Probenpuffer aufgenommen. Die Trennung erfolgte bei konstanter Spannung von 80-100V. Als Probenpuffer diente TAE-Puffer. Zur Detektion wurden die Gele in Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und nach weiteren 10min Elektrophorese auf einer UV-Kontaktlampe betrachtet. Zur Dokumentation diente ein Videoprintersystem.

Als DNA-Größenstandard wurden *EcoR I/Hind III*-verdauete λ -DNA und *Msp I/Ssp I*-verdauter *pBluescript II SK(-)* verwendet.

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Umpufferung von DNA-Proben

Für diese Arbeitsschritte wurde der *Nucleotrap*-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Es wurde nach den Herstellerprotokollen für „*Purification of DNA fragments from agarose gels*“ und „*Concentration and desalination of DNA fragments*“ vorgegangen.

Plasmid-Isolierung aus E.coli

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Bakterienkulturen wurden *Wizard Plus SV Plasmid Purification Kits* verwendet. Für Kulturen von 3-5ml (ca. 1-10 μ g DNA) fanden Minipräparationen Anwendung, für Kulturen von 25-100ml (100-300 μ g DNA) Midipräparationen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

DNA-Restriktionsverdau wurden mit dem vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffer des jeweiligen Restriktionsenzym angesetzt. Bei gleichzeitigem Einsatz von zwei oder mehr Endonukleasen im gleichen Ansatz wurden kompatible Puffer oder der *OnePhorAll*-Puffer von Amersham Pharmacia verwendet. Zu jedem Ansatz (10 μ l) wurden 1-5 μ g BSA zugegeben. Für den Verdau von 2-6 μ l einer Minipräparation bzw. 1-3 μ l einer Midipräparation wurden zwischen 1 und 6 Units Restriktionsenzym eingesetzt und 1-2 Stunden beim jeweiligen Temperaturoptimum (Herstellerangaben) inkubiert. Mit Restriktionsendonukleasen ohne *star activity* wurde unter Einsatz kleiner Mengen auch über Nacht verdaut. Die Analyse oder Reinigung der erhaltenen DNA-Fragmente wurde gelelektrophoretisch durchgeführt.

Glätten überhängender DNA-Enden

Zum Glätten von Einzelstrang-Überhängen wurden DNA-Moleküle mit Klenow-Enzym behandelt. Zu 7,2µl DNA wurden 0,8µl Klenow-Enzym (0,8U) und 1µl 10x Klenow-Puffer zugegeben. Nach 10min Inkubation bei 37°C wurde 1µl dNTPs zugesetzt und weitere 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C (10min) inaktiviert. Bei 5'-Überhängen wurde auf die 10-minütige Inkubation ohne dNTPs verzichtet. Lag die DNA in größeren Lösungsvolumina vor, wurde der Ansatz entsprechend vervielfacht.

5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. In Ansätze von 10-25µl wurden 10U T4-DNA-Kinase, 1mM ATP (pH 7-7,5) und 1-2,5µl mitgelieferter 10x Reaktionspuffer eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1-2Std. bei 37°C, evtl. auch über Nacht.

5'-Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Um Religationsprodukte von Plasmidvektoren zu vermeiden, wurden diese in der Regel vor der Ligation mit DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Üblicherweise wurden die Restriktionsansätze ohne Umpufferung direkt in die Dephosphorylierung eingesetzt. Um eine Anpassung des Puffermilieus zu erreichen, wurden die Ansätze um das 2,5x verdünnt. Ein 25µl-Ansatz enthielt die DNA-Probe, 1U alkalische Phosphatase und 2,5µl 10x Dephosphorylierungspuffer. Inkubiert wurde für 1-2Std. bei 37°C. Anschließend wurde zur Entfernung der Phosphatase das Plasmid gelelektrophoretisch aufgereinigt.

Ligation von DNA-Molekülen

Für die Ligation von DNA-Molekülen wurde der *Rapid Ligation Kit* von Roche nach Herstellerprotokoll verwendet. Zur Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren (linearisiert, dephosphoryliert) wurden diese in einem Stoffmengenverhältnis von (2-3):1 eingesetzt. Inkubationszeiten variierten von 10-30min. Komplizierte Ligationen wurden auch bei 15°C über Nacht durchgeführt.

3.1.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als Matrize für die DNA-Amplifikation mittels PCR diente gescherte, genomische DNA, cDNA-Genbanken, genomische DNA-Banken, Bacmid-DNA, Plasmid-DNA, DNA-Fragmente, PCR-Amplifikate selbst und lange, im 3'-Bereich zueinander komplementäre PCR-Oligonukleotide (Synthesepimer). Plasmid-DNA (Mini-/Midipräparationen) wurde 100-500fach verdünnt eingesetzt; von Proben mit geringer DNA-Kopienzahl (genomische DNA, Genbanken, Bacmid-Präparationen) wurden 1(-5)µl in den Ansatz gegeben.

Die verwendeten Polymerase-Typen waren die *Taq*-Polymerase von Appligene oder die *Pfu*-Polymerase von Promega jeweils mit ihrem mitgelieferten Reaktionspuffer. Die teurere *Pfu*-Polymerase wurde in PCR-Ansätzen verwendet, deren Produkte für den Einbau in Konstrukte bestimmt waren, da man hier den Sequenzieraufwand wegen der niedrigeren Fehlerquote (*proofreading*-Aktivität der *Pfu*-Polymerase) reduzieren konnte. Der Einsatz der *Pfu*-Polymerase ist nur möglich mit Primern, die in den letzten 6 Basen vor dem 3'-Ende keine Mutation beinhalten.

Standard-PCR mit nicht-degenerierten Primern

Die Standard-PCR diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten zur Klonierung, der Einführung von Mutationen oder Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen und dem *Screening* von Genbanken.

Standard-Reaktionsansatz (Endkonzentrationen in 50µl):

Reaktionspuffer	1x
dNTPs	je 0,2mM
PCR-Primer	je 0,5µM
Polymerase	1-1,2U
Matrizen-DNA	bis 500ng

Durch die Verwendung der Hersteller-Reaktionspuffer gelangten 1,5mM Mg²⁺ (Appligene *Taq*-Puffer) bzw. 2mM Mg²⁺ (Promega *Pfu*-Puffer) in den Ansatz.

Standard-PCR-Programm:

Tabelle 6: Phasen, Temperaturen und Dauer des Standard-PCR-Programms

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	5min	
Denaturierung	94°C	1min	20-40
Primer-Anlagerung	Primer-abhängig (s.u.)	1min	
Elongation	72°C	1min	
Auffüllen	72°C	10min	

Die Temperatur für die Primeranlagerung ist abhängig von deren Schmelztemperatur und wurde für jedes Primerpaar nach folgender Faustregel bestimmt:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Die Formel gilt für Primer < 22 Basen. In die Berechnung gehen nur Basen ein, die auf der Matrizen-DNA binden. Es wurde die Anlagerungstemperatur für beide Primer errechnet und die niedrigere verwendet. Häufig wurde auch eine Temperatur 2°C unter der berechneten angewendet.

Die Dauer der einzelnen Phasen konnte je nach Länge des PCR-Produktes leicht variieren.

PCR mit degenerierten Primern

Bei der Homologieklonierung der Paramecium-AC wurden PCR an gescherter, genomischer DNA mit verschiedenen, teilweise stark degenerierten Primern durchgeführt. Um ein Binden der Primer zu erleichtern, wurde mit weniger stringenten Methoden als in der Standard-PCR gearbeitet. Zum einen wurden erhöhte Mg²⁺-Konzentrationen eingesetzt (2,5mM, 3,5mM durch Zusatz von 2µl und 4µl 25mM MgCl₂-Puffer zum PCR-Standard-Ansatz), woraus ein unspezifischeres Anlagerungsverhalten der Primer resultiert. Zum anderen wurde das Standard-PCR-Programm modifiziert:

Tabelle 7: PCR-Programm für PCR mit degenerierten Primern

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	5min	
Denaturierung Primer-Anlagerung Elongation	94°C <i>Rampe: 37°C→72°C</i> 72°C	1min 0,15°C/sec 1min	5 Vor- zyklen
Denaturierung Primer-Anlagerung Elongation	94°C 40-48°C (<i>Primer-abh.</i>) 72°C	1min 1min 1min	35 Haupt- zyklen
Auffüllen	72°C	10min	

Die Einführung von Vorzyklen mit einer Temperatur-Rampe ermöglichte eine Primeranlagerung über einen größeren Temperaturbereich bei gleichzeitig langsam einsetzender Elongation durch die Polymerase, wodurch schwach gebundene Primer erschwert wieder herunterfielen.

Für diese Experimente fand ausschließlich die *Taq*-Polymerase Anwendung.

Bacmid-PCR

Um die *in vivo*-Transposition eines Inserts aus dem Donorplasmid *pFastBac1* in das Bacmid zu analysieren, wurde das Bacmid mittels PCR auf Rekombinanz überprüft. Die PCR wurden durchgeführt mit einem Bacmid-spezifischen Primer (pUC-rev) und einem Insert-spezifischen Primer (pIACsynt-EcoRV-s bzw. pACsys), ein Produkt trat also nur bei rekombinantem Bacmid auf.

Es wurde ein Standard-Ansatz gemacht mit 1µl Bacmid-Präparation. Das PCR-Programm entsprach dem Standard-Program, die Temperatur für die Primer-Anlagerung betrug 45°C (pUC-rev + pIACsynt-EcoRV-s) bzw. 48°C (pUC-rev + pACsys). Es wurden 20 Zyklen gefahren.

PCR mit langen Oligonukleotiden für die DNA-Resynthese

Für die DNA-Resynthese wurden 100-150bp lange Oligonukleotide verwendet, die im 3'-Bereich (24bp) zueinander komplementär waren und sich bei der Elongation gegenseitig als Matrize dienten. Für die Reaktion gelangte die *taq*-Polymerase und der zugehörige Reaktionspuffer zum Einsatz.

Reaktionsansatz (Endkonzentrationen in 100µl Reaktionsvolumen):

Reaktionspuffer	1x
dNTPs	je 0,4mM
u-/r-Primer	je 0,5µM
<i>taq</i> -Polymerase	2U

Das PCR-Programm entsprach dem Standard-PCR-Programm. Die Primeranlagerung erfolgte bei 54°C.

Klonierung von PCR-Produkten

Klonierung der PCR-Produkte der Homologieklonierung:

10µl des PCR-Ansatzes wurden gelelektrophoretisch analysiert. Waren Banden von Interesse vorhanden, wurde der gesamte Ansatz einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung unterzogen. Nach Aufnahme der DNA in Wasser wurden die Enden der enthaltenen PCR-Produkte geglättet (Klenow-Reaktion) und anschließend phosphoryliert. Die Auftrennung und Reinigung der PCR-Produkte geschah mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Die zu klonierenden Banden wurden ausgeschnitten, mittels *Nucleotrap* (Macherey-Nagel) eluiert (Aufnahme des DNA-Pellets in 40µl Wasser) und in den *EcoRV*-verdauten, dephosphorylierten Klonierungsvektor *pBluescript II SK(-)* ligiert.

Klonierung von Standard-PCR-Produkten:

Standard-PCR-Produkte wurden entweder wie oben beschrieben kloniert oder der folgenden Prozedur unterworfen. Der gesamte Ansatz wurde über ein Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Banden ausgeschnitten und mit *Nucleotrap* (Macherey-Nagel) eluiert (geringes Endvolumen z.B. 20µl Wasser). Es folgte eine Klenow-Reaktion zum Glätten der Enden oder ein Restriktionsverdau zur Erzeugung bestimmter Einzelstrangüberhänge. Anschließend wurde eine Phosphorylierungsreaktion durchgeführt. Der Ansatz wurde mit Hilfe des *Nucleotrap*-Entsalzungsprotokolls gereinigt und konnte dann in den gewünschten linearisierten, dephosphorylierten Vektor ligiert werden.

DNA-Sequenzierung

Es wurde die ‚Cycle Sequencing‘-Methode unter Verwendung des *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kits with 7-deaza-dGTP* angewendet. 130ng/1kb DNA-Probe (als Plasmid-DNA) wurden mit 3,3% DMSO, 2pmol Fluoreszenz-markiertem Primer (s. Abschn. 2.3.1) vermischt und mit Wasser auf ein Volumen von 21µl aufgefüllt. 4,5µl dieser Mischung wurden mit je 1µl der vier ddNTP-Reaktionsmische vermischt (s. Herstellerprotokoll) und mit einem Tropfen *Chill Out 14 Liquid Wax* überschichtet. Die Sequenzierreaktion wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt.

Tabelle 8: PCR-Programm der Sequenzierreaktion

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	2min	
Denaturierung Primer-Anlagerung Elongation	94°C <i>Primer-abhängig</i> (s.Abschn. 2.3.1) 70°C	20sec 20sec 20sec	25
Abkühlen	4°C	∞	

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Proben mit je 6µl Stop-Puffer versetzt. 1-1,5µl jeder Probe wurden auf einem 6%-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (1500V, 37mA). Die Elektrophorese und die Detektion der DNA-Fragmente über Laserfluoreszenz-Messung ($\lambda=700\text{nm}$) wurde mit einem *LI-COR Sequencer Model 4000* durchgeführt. Für die Dokumentation und die Auswertung der Daten stand die Software *BaselmagIR V. 4.0* (MWG-Biotech) zur Verfügung. Ab Mitte 2000 wurde der zuvor genannte Sequenzier-Kit durch

Thermo Sequenase primer cycle sequencing kit abgelöst. Im Protokoll wurde lediglich die Menge der Reaktionsmische auf 2µl je Reaktionsansatz erhöht.

3.1.2 Arbeiten mit *E.coli*-Bakterien

Herstellung kompetenter E.coli-Bakterienzellen für die Transformation

Eine Übernachtskultur des *E.coli*-Stammes wird 1:100 auf 100ml LB-Medium (mit den stamm-spezifischen Antibiotika-Zusätzen) überimpft und bei 37°C und 220rpm bis zu einer Dichte von $OD_{600nm} = 0,3$ bis 0,4 heranwachsen gelassen. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (15min, 1100xg, 4°C) vom Medium abgetrennt und in 50ml kalter 100mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 20min. Anschließend wurden die Zellen in 10ml 50mM CaCl₂ in 20% Glycerin suspendiert und nach einer weiteren 2 stündigen Inkubation auf Eis in Portionen à 100µl aliquotiert. Kompetente Zellen können bei -80°C gelagert werden.

Schnelltransformation in E.coli-Zellen

Die Schnelltransformation ist nur für Plasmid-DNA in ausreichend hoher Konzentration geeignet. Zur Transformation von Ligationsansätzen oder schwer-transformierbaren Plasmiden muß eine Standardtransformation durchgeführt werden.

1µl Minipräparations-DNA (ca. 200ng Plasmid-DNA) wurden zu 100µl angetauten, kompetenten Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und für ≥10min auf Eis inkubiert. 10-50µl dieses Ansatzes wurden auf einer entsprechend antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C für mindestens 12Std. inkubiert. Einzelklone konnten dann gepickt und Flüssigkulturen damit angeimpft werden.

Standardtransformation in E.coli-Zellen

Ligations-Ansätze oder Plasmid-DNA wurden mit 10µl 10x CM-Puffer versetzt und mit Wasser auf 100µl aufgefüllt. Diese DNA-CM-Puffer-Mischung wurde zu angetauten, kompetenten *E.coli*-Zellen zupipettiert, vorsichtig gemischt und für ≥20min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 60sec bei 42°C ein Temperaturschock durchgeführt und die Zellen auf Eis wieder für 10min abgekühlt. Anschließend wurden 500µl LB-Medium (ohne Antibiotika) zum Ansatz gegeben und dieser bei 37°C 45-60min bei 220rpm geschüttelt. Nach dieser Anwachsphase wurden 50-200µl oder mehr auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausgestrichen und für mindestens 12Std. bei 37°C inkubiert. Wachsen keine Klone auf der Platte, konnte versucht werden den bei 4°C gelagerten Transformationsansatz nochmals auszuplattieren oder eine Übernachts-Flüssigkultur herzustellen (diese Mischkultur wurde bei Bedarf nochmals auf Agarplatten ausgestrichen um Einzelklone zu erhalten).

Herstellung von Bakteriendauerkulturen

500-1000µl einer Übernachtskultur wurden pelletiert und in 500µl LB-Medium ohne Antibiotika resuspendiert. Anschließend wurde die Kultur mit 500µl 50% Glycerol gemischt (Endkonzentration Glycerol in LB-Medium: 25%) und sofort bei -80°C eingefroren. Ein solcher *Glycerolstock* kann in der Regel mehrere Jahre bei -80°C gelagert werden.

3.2 *Screening* von Genbanken

3.2.1 Allgemeine Techniken zur Herstellung von Phagenplatten, Titern von Genbanken und deren Amplifikation

Herstellung von konditionierten *E.coli*-Zellen

Für die Infektion mit λ -Phagen müssen *E.coli*-Bakterien konditioniert werden.

Von einem Einzelklon *E.coli XL1Blue MRF'* wurde eine Übernachtskultur in 5ml LB-Medium mit 10mM MgSO₄ und 0,2% Maltose (ohne Antibiotikum) angeimpft (Inkubation 10-12Std., 37°C, 220rpm). Von der dicht gewachsenen Kultur wurden 200 μ l auf 20ml LB-Medium mit 10mM MgSO₄ und 0,2% Maltose (kein Antibiotikum) überimpft und bei 37°C, 220rpm bis zu einer Dichte von OD_{600nm} = 0,5-1,0 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15min, 1100xg, 4°C) geerntet und in steriler 10mM MgSO₄-Lösung zu einer Dichte von OD_{600nm} = 0,5 resuspendiert. Die konditionierten *E.coli*-Bakterien wurden bei 4°C gelagert und konnten bis zu 4 Tage für die Infektion mit λ -Phagen verwendet werden.

Herstellung von Phagenplatten

Als Basis-Nährboden für Phagenplatten dienten NZY-Agarplatten (\varnothing 92mm bzw. 142mm), welche nicht zu hoch ausgegossen wurden. Diese wurden vor Herstellung der Phagenplatten vortemperiert. Für die Infektion mit Phagen wurden für große Platten 650 μ l, für kleine Platten 200 μ l konditionierte *E.coli*-Bakterien mit der gewünschten Menge (10000-50000pfu) einer Genbank oder Phagensuspension in einem 10ml Polypropylenröhrchen versetzt und bei 37°C und 120rpm 20min inkubiert. Zu dieser Mischung wurde geschmolzener, vortemperierter NZY-Topagar (50-52°C) gegeben, durch umkippen des Röhrchens gemischt und auf die temperierten NZY-Platten gleichmäßig ausgegossen. Für große Platten wurden 9ml, für kleine Platten 3-5ml Topagar benötigt. Nach Erstarren wurden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen sind klare Plaques in einem trüben Hintergrund zu erkennen. Dies Phagenplatten konnten zur Titerung von Genbanken, zur Herstellung von Platteneluat (Amplifikation von Genbanken) oder zur Herstellung von Plattenabzügen für die Durchmusterung mit radioaktiven Sonden verwendet werden.

Titern von Genbanken und Phagensuspensionen

Phagensuspensionen wurden getitert, indem Phagenplatten mit einer Verdünnungsreihe der Suspension hergestellt und die entstandenen Plaques auszählt wurden.

Von der zu titernden Phagensuspension wurde eine Verdünnungsreihe (1:10) in SM-Puffer hergestellt und mit jeweils 10 μ l einer Verdünnung Phagenplatten gegossen (wie oben beschrieben). Die Plaques auf den Platten wurden ausgezählt, wobei nur Platten verwendet wurden, auf denen 10-200 isolierte Plaques vorhanden waren. Der Titer wurde in pfu/ml angegeben und ist nicht zu verwechseln mit der Angabe der maximalen Anzahl unabhängiger Phagen einer Phagensuspension/Genbankfraktion, welche in pfu angegeben wird.

Amplifikation von Genbanken durch Herstellung von Platteneluat

Die Amplifikation von Genbanken diente der Vermehrung der darin vorkommenden Phagen. Von der entsprechenden Phagensuspension wurden Phagenplatten wie oben beschrieben hergestellt. Zur Elution der vermehrten Phagen wurden die Platten mit 15ml SM-Puffer überschichtet und durch leichtes Schütteln über Nacht extrahiert (70rpm, 4°C). Der Überstand wurde anschließend in sterile Falcontubes überführt und mit 1/20 seines Volumens an Chloroform versetzt, geschüttelt, und 20-30min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (10min, 2000xg) wurde der phagenhaltige Überstand in ein frisches Falcontube pipettiert, erneut mit Chloroform versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Die Amplifikation der verwendeten Genbanken (vgl. Abschn. 2.5.4) wurde von Jürgen Linder (13) wie folgt durchgeführt. Von einer Primärbank waren Phagenplatten à 50000pfu hergestellt und diese mit SM-Puffer extrahiert worden. Es entstanden Subfraktionen mit je max. 50000 unabhängigen Phagen. Subfraktionen, die das gesuchte Gen enthielten (analysiert z.B. durch PCR-Durchmusterung), waren weiter amplifiziert worden, indem 10000pfu enthaltende Phagenplatten extrahiert wurden. D.h. es entstanden Subsubfraktionen mit max. 10000 unterschiedlichen pfu.

3.2.2 Genbankdurchmusterungen

3.2.2.1 Genbankdurchmusterung mittels PCR

Amplifizierte Genbanken lassen sich als Matrize in einer PCR einsetzen. Sie beinhalten ausreichende Mengen freier DNA die in der Regel mit der vorhandener Phagen übereinstimmt. 5µl einer Genbank(-fraktion) dienen im Standard-PCR-Ansatz als Matrize. Als Primer wurden spezifische Primer verwendet, welche auch zur Herstellung der Sonden-DNA-Fragmente dienen. War auf einem Agarose-Gel eine diskrete Produktbande der erwarteten Größe zu erkennen, wies dies auf das Vorhandensein des gesuchten Gens hin. Von positiven Genbankfraktionen wurden subfraktionierte Phagensuspensionen à 10000pfu wiederum mittels PCR auf das Vorhandensein des Sonden-Genabschnittes überprüft. Mit positiven Subfraktionen wurden Durchmusterungen unter Verwendung radioaktiver Sonden durchgeführt.

3.2.2.2 Herstellung einer radioaktiv markierten Gensonde

Die für die Markierungsreaktion benötigte DNA-Matrize wurde aus einem Plasmid mit geeignetem Insert entweder durch einen Restriktionsverdau oder durch PCR gewonnen. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

Herstellung der Sonde unter Verwendung des *Rediprime*-Kits

Ca. 30ng hitzedenaturierte DNA und 50µCi [α -³²P]-dCTP wurden in eine radioaktive Markierungsreaktion mit dem *rediprime DNA labelling system* eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Herstellerprotokoll (37°C, 15min) durchgeführt. Im Anschluß wurden kleine DNA-Fragmente und Nukleotide über eine Sephadex G-50-Gelfiltrationssäule (*Quick Spin-Columns G-50* von Roche; Anwendung nach Vorschrift) abgetrennt. Aus einem 2fachen Ansatz konnten ca. 85µl Eluat gewonnen werden, welches die radioaktive Sonde enthält. Die spezifische Aktivität der Sonde wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt und sollte mindestens 5×10^8 cpm/µg für

die Hybridisierung von 8 Membranen betragen. Die markierte Sonde wurde bei -80°C aufbewahrt.

Herstellung der Sonde durch manuelle Durchführung der Markierungsreaktion

Alternativ zum obigen Markierungsverfahren wurde ein Methode entwickelt, bei welcher die DNA-Matrize durch einen einzelnen, manuell durchgeführten PCR-Zyklus markiert werden konnte. Der Ansatz wurde in Anlehnung an die Standard-PCR (S. 34) erdacht und modifiziert.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die manuelle Sonden-Markierungsreaktion

Inhaltsstoff	Endkonzentr. im Ansatz	Bemerkung
zu markierende DNA	20ng/50 μl	In 25ng (entspricht der in der <i>rediprime</i> -Reaktion eingesetzten Menge) der <i>Sonde 2</i> sind insgesamt 0,011nmol C enthalten (s.u.). Um einen ausreichenden Überschuß dCTP in der Reaktion zu haben, wurde die DNA-Menge auf 20ng reduziert.
[α - ^{32}P]-dCTP	50 μCi /50 μl	Diese Menge entspricht der im <i>rediprime-Kit</i> (s.o.) eingesetzten Menge pro Ansatz und wurde übernommen. Bei einer spezifischen Aktivität des Substrats von $>3000\mu\text{Ci/nmol}$ entspricht dies ca. $>0,016\text{nmol}$ dCTP pro Ansatz
dATP dGTP dTTP	jeweils 1nmol/50 μl (20 μM)	Die Konzentration wurde im Vergleich zur Standard-PCR um 1/10 verringert, um keinen zu starken Überschuß in Relation zur eingesetzten dCTP-Menge zu erzeugen.
Primer	jeweils 0,5 μM	Es wurden die spezifischen PCR-Primer der Sonde verwendet. So wurde sichergestellt, daß lange PCR-Produkte (über die gesamte Sondenlänge) entstehen. Die eingesetzte Menge entspricht der Standard-PCR.
<i>Taq</i> -Polymerase	1U/50 μl	Die <i>Taq</i> -Polymerase wurde als Standard-Polymerase eingesetzt.
10x Reaktionspuffer	5 μl /50 μl	s. Standard-PCR

Die Berechnungen für die eingesetzte DNA-Menge beziehen sich auf die Anwendung dieser Methode zur Markierung der genomischen Sonde (Sonde 2) im Rahmen dieser Arbeit (s. S. 82). Sonde 2 hat ein Molekulargewicht von $\text{MW} \approx 233\mu\text{g/nmol}$, d.h. 25ng entsprechen 0,11pmol. In s- und as-Strang der Sonde 2 befinden sich zusammen 100 Cytosine, was 1,1pmol Cytosin/25ng Sonde 2 entspricht.

Für die Durchführung der PCR wurde je ein Heizblock mit 95°C , 47°C und 72°C vorbereitet. Der Markierungs-PCR-Reaktionsansatz wurde für 10min bei 95°C zur Denaturierung der DNA-Matrize erhitzt, anschließend kurz zentrifugiert, um entstandenes Kondensat wieder im Ansatz zu sammeln. Es folgten 5min Inkubation bei 47°C (Primer-Anlagerung) und nach erneuter, kurzer Zentrifugation eine 20 minütige Elongationsphase bei 72°C . Diese wurde nach 10min kurzzeitig zum Herunterzentrifugieren des entstandenen Kondensats unterbrochen. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und über eine Sephadex G-50-Gelfiltrationssäule (*Quick Spin-Columns G-50* von Roche; Anwendung nach Vorschrift) von kleinen Reaktionsbestandteilen (Nukleotide, Primer, Salze) befreit. Aus einem doppelten PCR-Markierungsansatz (100 μl) konnten ca. 85 μl Eluat gewonnen werden. Die weitere Vorgehensweise gleicht der mit *rediprime* (s. voriger Abschnitt).

3.2.2.3 Genbankdurchmusterung mittels radioaktiver Sonde

Erste Durchmusterung

Es wurden Phagenplatten (8 St.) der zu *screenenden* Genbank(-fraktion) mit 10000-50000 Plaques hergestellt. Für die Herstellung von Plaqueabzügen auf Nylonmembranen wurden diese Platten für mindestens 1Std. bei 4°C gekühlt. Nun wurden auf die numerierten Phagenplatten entsprechend beschriftete Nylonmembranen luftblasenfrei aufgelegt und für 5min auf dem Agar belassen. Die Orientierung einer Membran auf der Platte wurde durch Einstiche mit einer Kanüle markiert (mehrere Einstiche, die ein asymmetrisches Muster ergeben). Anschließend wurden die Membranen abgezogen und für 5min auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Whatmanpapier 3MM gelegt. Dabei und bei den nächsten Schritten zeigten die Phagen-DNA-behafteten Seiten der Membranen nach oben. Die Membranen wurden nun auf Whatmanpapier 5min trocknen gelassen und anschließend für 5min auf ein mit Neutralisationslösung getränktes Whatmanpapier gelegt. Nach dem Trocknen der Membranen für 30min folgte die dauerhafte Verknüpfung der DNA mit den Membranen im UV-Ofen (*Stratalinker*) unter Einwirkung von 1,2mJ Strahlungsenergie. Bis zum Beginn der Hybridisierung wurden die Membranen in 2x SSC aufbewahrt.

Um später Signale eindeutig verifizieren zu können, wurde von jeder Phagenplatte ein zweiter Abzug hergestellt. Hierfür wurden die Nylonmembranen 10min auf die Agarplatte gelegt und die Markierungen des ersten Abzugs auf die Membranen übertragen. Die weitere Vorgehensweise entsprach der der Herstellung der ersten Abzüge.

Für die Hybridisierung wurden je 8 Membranen fächerartig übereinandergelegt und flach in eine Hybridisierungsglasröhre gepackt. Die Membranen wurden mit 20ml Prähybridisierungslösung bei 40°C für mindestens 2Std. in einem Hybridisierungsöfen unter Rotation inkubiert. Die Membranen mußten vollständig mit der Lösung benetzt sein. Die radioaktiv markierte Sonde wurde 7min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in frische Prähybridisierungslösung einpipettiert, so daß die entstehende Hybridisierungslösung eine Aktivität von $1,5 \times 10^6$ bis 6×10^6 cpm/ml aufweist. Die Prähybridisierungslösungen aus den Glasröhren wurden durch die radioaktive Hybridisierungslösung ersetzt (15-20ml). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 40°C im Rotationsöfen. Am nächsten Morgen wurde die radioaktive Lösung entfernt (Aufbewahrung bei -20°C), die Membranen in der Glasröhre 2 mal 7min mit Waschlösung gespült (40°C) und anschließend für weitere Waschschrte in einen Edelstahlbehälter überführt. Hier wurde 2 mal für 25min in Waschlösung bei 52°C geschüttelt. Nach Trocknen der Membranen wurde eine Autoradiographie bei -80°C für 24Std. bis 7 Tage angefertigt.

Anhand von identisch lokalisierten Signalen auf beiden Abzügen konnten positive Klone identifiziert und durch die Einstichmarken deren Position auf den Phagenplatten bestimmt werden. Sie wurden mit der weiten Öffnung einer autoklavierten Pasteurpipette ausgestochen, der resultierende Agarblock in ein Eppendorf-Cup überführt und durch schütteln (200rpm, 37°C, 2Std.) in 500µl SM-Puffer extrahiert. Die Phagensuspension wurde durch Zusatz von 20µl Chloroform konserviert und konnte in einen zweiten Genbankscreen eingesetzt werden, der der Vereinzelung der Phagen diene.

Zweite Genbankdurchmusterung mit radioaktiver Sonde

Von der Phagensuspension der ersten Durchmusterung wurden 4 Verdünnungen (Zehnerpotenz-Schritte) in SM-Puffer hergestellt. Von diesen Verdünnungen wurden kleine (92mm) Phagenplatten hergestellt. Die Herstellung der Plattenabzüge auf Nylonmembranen, die Hybridisierung und die Autoradiographie erfolgten entsprechend der ersten Durchmusterung. Die Hybridisierungslösung der ersten Durchmusterung konnte nach Erhitzen für 20min bei 65°C wiederverwendet werden. Anhand der Autoradiographie-Signale wurden positive Plaques lokalisiert und mit der dünnen Spitze der Pasteurpipette ausgestochen. Es sollten deutlich isoliert liegende Plaques sein, um sicherzustellen, daß es sich um klonale Phagenkolonien handelt. War das nicht der Fall, konnte eine dritte Durchmusterung der erhaltenen Phagensuspension nach dem gleichen Verfahren durchgeführt werden. Positive, klonale Phagen wurden nach dem *in vivo excision-Protokoll* in Plasmide überführt.

In vivo excision

Für die *in vivo-excision* wurden *E.coli XL1Blue MRF⁺*-Bakterienzellen mit der λ -Phagensuspension und einem *ExAssist*-Helferphagen koinfiziert. Der Helferphage überführt Teile der λ -DNA in ein rezirkuliertes Phagemid, welches in Helferphagen verpackt im Überstand der Kultur wiederzufinden ist. Mit diesem Überstand wurden *E.coli-XLOLR* (für *Excisionen* der cDNA-Genbank) bzw. *E.coli-SOLR* (für Aufbereitung der genomischen DNA-Bank) infiziert. Beide Bakterienstämme propagieren den *ExAssist*-Helferphagen nicht, d.h. es entstanden Bakterienkolonien, die die Paramecien-DNA als Insert in den Plasmiden *pBK-CMV* (cDNA) bzw. *pBluescript II SK(-)* (genomische DNA) enthielten. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll (Anleitung *ZAP Express EcoR I/Xho I Vector Cloning Kit* (21) für cDNA bzw. *Predigested Lambda ZAP II/EcoR I/CIAP Cloning Kit* (23) für genomische DNA).

3.3 Allgemeine proteinchemische Methoden

BioRad Proteinbestimmung

1-12 μ g Protein wurden mit bidest. Wasser auf 800 μ l aufgefüllt und *gevortext*. Nach Zugabe von 200 μ l *BioRad*-Reagenz wurde wiederum gut *gevortext* und die Proben bei RT 5min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei $\lambda=595$ nm gegen eine Leerprobe gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Kalibriergeraden berechnet. Die Kalibriergerade wurde bei jeder Proteinbestimmung erneut aufgenommen und wurde mit 2, 4, 6, 8, 10 und 12 μ g BSA erstellt. Bei der Durchführung war zu beachten, daß die Proben in gleichmäßigen Zeitabständen nacheinander mit *BioRad*-Reagenz versetzt und in entsprechenden Zeitabständen vermessen wurden.

Proteinfällungen

Ethanol-Fällung

Die Probe wurde mit dem 4x ihres Volumens an Ethanol abs. gemischt, 30min auf Eis inkubiert und das gefällte Protein abzentrifugiert (30min, 15000xg, 4°C). Der Überstand wurde verworfen. Je nach Anwendung wurde das Pellet mit kaltem Ethanol 70% gewaschen und bei RT

oder in der *speed vac* getrocknet. Für die Hasenimmunisierung wurde das Proteinpellet feucht weiterverwendet.

Methanol/Aceton-Fällung

Die Proteinprobe wurde mit dem 4x Volumen einer 1:1-Methanol/Aceton-Mischung versetzt, gemischt und 5min bei RT inkubiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (15min, 15000xg, 37°C). Mit dem Pellet wurde verfahren wie bei der Ethanol-fällung beschrieben.

TCA-Fällung

Die zu fällende Proteinprobe wurde mit 5-10% Trichloressigsäure (TCA) bezogen auf die Endkonzentration versetzt, *gevortext*, 20min auf Eis inkubiert und der Niederschlag pelletiert (15min, 15000xg, 4°C). Der Niederschlag wurde mit eiskaltem Ethanol abs. gewaschen und erneut zentrifugiert. Nun wurde wie bei der Ethanol-fällung geschildert vorgegangen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Ergebnisse von Proteinexpressionen, Proteinreinigungen und Antikörperreinigungen wurden elektrophoretisch über SDS-Polyacrylamidgele kontrolliert.

Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden in Hoefer-Gelgießapparaturen *Mighty Small SE245* in der in *Tabelle 10* beschriebenen Zusammensetzung gegossen. Der Polyacrylamidgehalt im Trenngel richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und sofort mit 100% Isopropanol überschichtet, um eine glatte und blasenfreie Kante zu erzeugen. Nach Auspolymerisation des Trenngels konnte das Isopropanol abgegossen und der überstehende Raum 4x mit Wasser gespült werden. Danach wurde das Sammelgel bei steckendem Probenkamm obenauf gegossen. Die Größe der Gele (nur Trenngel) betrug ca. 8cm x 5,5cm x 0,75mm.

Tabelle 10: Rezeptur für SDS-Polyacrylamid-Gele. Die Menge ist ausreichend für zwei Gele. Die Acrylamid-Lsg. ist eine Mischung von Acrylamid/Bisacrylamid 37,5 : 1 (Fertiglösung 30% von Applichem); TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyendiamin) wirkt als Katalysator, APS (Ammoniumperoxodisulfat) ist der Radikalstarter

Trenngel					Sammelgel	
Inhaltsstoffe	7,5%	10%	12,5%	15%	Inhaltsstoffe	
Trenngelpuffer	3ml	3ml	3ml	3ml	Sammelgelpuffer	1ml
Wasser	6ml	5ml	4ml	3ml	Wasser	2,4ml
Acrylamid-Lsg.	3ml	4ml	5ml	6ml	Acrylamid-Lsg.	0,6ml
TEMED	10µl	10µl	10µl	10µl	TEMED	10µl
APS10%	80µl	80µl	80µl	80µl	APS10%	40µl

Proteinproben wurden in 4x Probenpuffer aufgenommen, wobei der Probenpuffer häufig konzentriert, jedoch maximal 4x verdünnt eingesetzt wurde. Proben mit löslichem Protein wurden 5min bei 80°C erhitzt, Membranproteinproben wurden für mindestens 2Std. bei RT stehen gelassen.

Die Elektrophorese wurde in der Vertikal-Elektrophoreseeinheit Hoefer *Mighty Small* bei einer konstanten Stromstärke von 20(-25)mA und max. 250V durchgeführt (gleichzeitige Elektrophorese von 2 Gelen: 40(-50)mA, 250V).

Als Proteinstandard wurde eine Mischung folgender Markerproteine verwendet:

Phosphorylase b	97,4 kDa	oder: α -Gelatin Monomer	95kDa
Bovine Serumalbumin	66 kDa		
Ovalbumin	45 kDa		
GAPDH	36 kDa		
Carboanhydrase	29 kDa		
Chymotrypsinogen A	25 kDa		
Cytochrom C	12,5 kDa		

Zur Detektion wurden die Gele mindestens 45min in Coomassie-Lösung gefärbt und 30min in Entfärber-Lösung und mehrere Stunden in Wasser entfärbt (die Dokumentation wurde wie bei Agarose-DNA-Gelen durchgeführt (s. S. 32). Sollten die Gele in einen Westernblot eingesetzt werden, blieben sie ungefärbt und wurden für einen Elektrobplot vorbereitet.

Western Blot

Western Blots dienen dem immunchemischen Nachweis von Proteinen.

Die Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung über SDS-PAGE (s.o.) durch einen Elektrotransfer auf eine Membran übertragen. Auf diesem stabilen Träger wurden die immunchemischen Reaktionen durchgeführt.

Elektrobplot

Der Elektrobplot erfolgte nach der *Semi-Dry*-Methode. In Abhängigkeit der verwendeten Antikörper wurden zwei verschiedene Membranmaterialien verwendet. PVDF-Membranen (*porablot PVDF* von Macherey-Nagel) wurden verwendet, wenn der primäre AK anti-RGS(His)₄ im Immunoblot Anwendung fand. Außerdem hat sich herausgestellt, daß PVDF-Membranen einen geringeren Hintergrund erzeugen. Nitrocellulose-Membranen (Optitran BA-S83, protran BA83, beide von Schleicher & Schuell; porablot NCP von Macherey-Nagel) wurden für alle anderen Antikörper benutzt und besitzen den Vorteil, leichter handhabbar zu sein. Die Membranen wurden auf gleiche Größe wie das Polyacrylamid-Trenngel zugeschnitten.

Für den Elektrobplot wurden Nitrocellulose-Membranen zunächst in Wasser vollständig getränkt und anschließend bis zur Verwendung in Transferpuffer liegen gelassen (ca. 10min). PVDF-Membranen mußten mindestens 10min in Methanol inkubiert werden, um eine Benetzung zu ermöglichen. Anschließend wurden sie ca. 5min in Transferpuffer inkubiert. Von den SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel 5-10min in Transferpuffer inkubiert. Auf der mit Transferpuffer befeuchteten Anode wurde folgendes ‚sandwich‘ aufgebaut. 3 Stücke in Transferpuffer getränktes, zugeschnittenes Whatman-3MM-Papier wurden luftblasenfrei aufeinander gestapelt, darauf wurde die nasse Membran gelegt, dann das Gel und abschließend noch einmal 3 getränkte Whatman-3MM-Papiere, welche den Kontakt zur Kathode bildeten. Der Elektrotransfer erfolgte für 3Std. bei 2,8mA/cm² Membran und maximal 20V. Anschließend wurde das Acrylamidgel in Coomassie gefärbt (s.o.), die Membran zur schnellen Erfolgskontrolle des Transfers 10min in Ponceau S-Lösung inkubiert und mit Wasser so weit entfärbt, daß das rote Proteinbandenmuster gegen den Hintergrund erkennbar wurde. Vor Durchführung der immunologischen Reaktionen wurde die Membran weitere 10min in Wasser entfärbt.

Immunoblot

Die hier beschriebene Prozedur wurde für die Immundetektion proteinbeladener Membranen angewendet. Die Beladung der Membranen mit Protein erfolgte durch einen Elektrotransfer (s.o.) oder durch direktes Aufpipettieren und Eintrocknen von Proteinlösungen (Dot Blot).

Zunächst wurden die Membranen in M-TBS mindesten 1Std. (RT, Schüttler), häufig auch über Nacht (4°C) blockiert. Nach 2x 2minütigem Waschen in TBS-T wurde die Membran für 1Std. in eine Verdünnung des primären Antikörpers in M-TBS (1:2000-1:5000) gegeben (RT, langsames Schütteln). Die Primärantikörperlösung wurde durch Waschen (2x kurz, 1x 15min, 2x 5min) von der Membran entfernt und die Membran anschließend mit der Sekundärantikörperverdünnung (1:5000 in M-TBS) inkubiert. Das Waschen der Membran erfolgte nach dem gleichen Schema wie oben. Die Detektion wurde mit dem *ECL Plus Western Blotting Detection Kit* (Amersham Pharmacia) nach Vorschrift durchgeführt. Die auftretende Chemolumineszenz wurde durch Belichtung von *Hyperfilm-ECL* Filmen nachgewiesen. Die Belichtungszeiten variierten von 2sec-5min. (Verwendete Antikörper s. S. 22)

Dot Blot

Bei einem Dot Blot wurde eine bestimmte Menge Antigen-Lösung direkt auf eine Nitrocellulose-Membran pipettiert und eingetrocknet. Die immunchemische Detektion erfolgte wie oben beschrieben (Immunoblot). Der Dot Blot diente der Ermittlung der Empfindlichkeit eines Antikörpers bezüglich seines Antigens. Es wurden entweder Antigenverdünnungsreihen auf die Membran appliziert und mit einer bestimmten Primärantikörperverdünnung behandelt oder 1µg aufpipettiertes Antigen mit verschiedenen Primärantikörperverdünnungen entwickelt (Titerbestimmung).

Protein-tags für den immunchemischen Nachweis und die Affinitätsreinigung

Einige der hergestellten Genprodukte wurden, um deren Nachweis im Immunoblot zu ermöglichen, mit C- oder N-terminalen *tags* versehen. Diese *tags* dienten als Epitop für einen spezifischen primären Antikörper. Überdies konnten die Genprodukte häufig einer Affinitätsreinigung unterzogen werden, welche durch die *tags* vermittelt wird.

myc-tag

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *Hexamyc-tag* als Epitop N- oder C-terminal mit den hergestellten Konstrukten fusioniert. Es handelt sich um eine 6fache Wiederholung eines 13 Aminosäuren umfassenden Abschnitts des menschlichen c-myc-Protoonkogens. Der Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen anti-myc-Antikörper.

Sequenz des verwendeten *Hexamyc-tag*:

MEQKLISEEDLNEMEQLISEEDLNEMEQLISEEDLNEMEQLISEEDLNEMEQLISEEDLNEMESLGLDLMTE
QKLISEEDLNSRPL

Hexahis-tag

Hierbei handelt es sich um ein Peptid-Epitop (His)₆, welches insbesondere in *E.coli*-Proteinexpressionsversuchen Verwendung findet. Neben der Möglichkeit des immunchemischen Nachweises (in der vorliegenden Arbeit wurde der monoklonale Antikörper anti-RGS(His)₄ (Qiagen) verwendet) ermöglicht der *Hexahis-tag* auch die Affinitätsreinigung von

Genprodukten über *Ni-NTA-Agarose* (Qiagen). Er ist Bestandteil des Expressionsplasmids *pQE30* und wird hier N-terminal angehängt. In dieser Arbeit wurde der *Hexahis-tag* auch eukaryotischen Expressionsprodukten vorangestellt.

3.4 Proteinreinigung

3.4.1 Affinitätschromatographische Reinigung mit Ni-NTA-Agarose

Voraussetzung für die Reinigung von Expressionsprodukten über *Ni-NTA-Agarose* ist deren N- oder C-terminal Fusion mit einem *Hexahis-tag* (24). Ni²⁺-Ionen sind chelatartig an die Nitriolotriessigsäure-Arme des Säulenmaterials gebunden. Die Histidin-Reste des *Hexahis-tag* können mit den freien Koordinationsstellen des Metallions interagieren. Die Elution erfolgt entweder durch pH-Erniedrigung (Protonierung der Histidin-Reste) oder durch Erhöhung der Imidazolkonzentration (Konkurrenz um Ni²⁺-Koordinationsstellen).

3.4.1.1 Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Bei der denaturierenden Reinigung werden die Proteine in hochprozentigen Guanidinium- und Harnstoffpuffern unter Denaturierung gelöst. Auch *inclusion-bodies* (hochverdichtete Proteinaggregate) können durch diese Methode aufgelöst werden.

Die pelletierten Zellen einer 20-100ml *E.coli*-Expressionskultur wurden in 3-5ml Puffer A unter Zugabe von 6mM β -Mercaptoethanol und 0,2% Tween 20 aufgenommen (auf- und abpipettieren). Um eine vollständige Zellyse zu erreichen, wurden die Proben 4x 5sec mit der Ultraschallsonde behandelt (Stufe 4-5). Im Anschluß wurden die Zellbruchstücke durch Zentrifugation (6-10min, 14000xg, RT) entfernt, der Überstand abgenommen, mit 40-100 μ l Ni-NTA-Agarose (Menge abhängig von dem zu reinigenden Produkt und der Expressionseffizienz) versetzt und 45-60min bei RT leicht geschüttelt. Für die folgenden Wasch- und Elutionsschritte wurde der Ansatz auf ein *Midiprep*-Säulchen (*Wizard Plus SV Plasmid Purification Kit*) gegeben und die Agarose-Partikel auf der Fritte aufgefangen. Es wurde mit Hilfe einer *Luer-lock*-Spritze nacheinander mit jeweils 1ml Puffer A, Puffer B und 2x Puffer C gewaschen. Die Elution erfolgte sehr langsam mit 200 μ l Elutionspuffer. Die Elutionsfraktion konnte noch ein zweites mal über die Säule gegeben werden, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Eluate wurden bei 4°C aufbewahrt und waren mehrere Monate haltbar.

3.4.1.2 Proteinreinigung unter nativen Bedingungen

Die verwendete **Expressionskultur (*Streptomyces I., RTS500*¹⁷)** wurde auf geeignete Weise in ein Homogenat überführt und von diesem durch Zentrifugation (30-45min, 48000xg¹⁸, 4°C) die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Zu dem Überstand wurde eine angemessene Menge Ni-NTA-Agarose (40-200 μ l) zugegeben und auf Eis 1Std. bei langsamem Schütteln inkubiert.

¹⁷ Zellfreies Expressionssystem, d.h. es liegt bereits als Homogenat vor; für die Aufbereitung ist lediglich der im Anschluß beschriebene Zentrifugationsschritt notwendig.

¹⁸ Es wurden im Reaktionsgefäß keine 48000xg erreicht, da sich die Berechnung der Beschleunigung auf den Radius am Boden der Gefäßeinschübe des jeweiligen Rotors bezieht. Es wurde hier aber mit Eppendorf-Cups gearbeitet, welche nur bis ungefähr in die Mitte reichen. Im Kontronrotor A8.24 beträgt der mittlere Radius 8,2cm. Die erreichte Beschleunigung im Cup war ca. 36700xg.

Für die Wasch- und Elutionsschritte wurde der Ansatz wie oben auf *Midiprep*-Säulchen (*Wizard Plus SV Plasmid Purification Kit*) gegeben und mit je 2ml folgender eiskühlter Puffer gewaschen: Waschpuffer P3, Waschpuffer P4, Waschpuffer P5. Die Elution wurde mit 200µl Elutionspuffer durchgeführt und das erste Eluat noch ein zweites Mal über die Säule gegeben. Während der gesamten Prozedur wurde der Ansatz auf Eis gehalten. Das Eluat wurde üblicherweise sofort in einen Enzymtest eingesetzt.

Die **native Reinigung von Expressionsprodukten aus Sf9-Zellen** wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Jost Weber durchgeführt. Die geernteten Zellen einer 50ml-Kultur wurden in 500-750µl *Sf9*-Lyse-/Binde-Puffer aufgenommen und wie in Abschn. ‚Herstellung von *Sf9*-Zellhomogenaten‘ beschrieben lysiert. Das Homogenat wurde durch Zentrifugation für 30min, 37000xg¹⁹, 4°C von partikulären Bestandteilen befreit und in die Reinigung eingesetzt. 50µl Ni-NTA-Agarose wurden in 1ml Binde-Puffer gewaschen und in 4ml Binde-Puffer resuspendiert. Das *Sf9*-Lysat wurde zugegeben und die Mischung für 1Std. auf Eis langsam geschüttelt. Die Suspension wurde auf ein *Midiprep*-Säulchen (*Wizard Plus SV Plasmid Purification Kit*) gegeben und 2x mit 1ml kaltem Binde-Puffer gewaschen, das Säulchen sehr kurz in einer Tischzentrifuge, aufgesteckt auf ein Eppendorf-Cup, zentrifugiert (Zentrifuge nur kurz starten und sofort wieder ausschalten) um alle Pufferreste zu entfernen, bevor mit 100-120µl Elutions-Puffer eluiert wurde. Das Eluat wurde zwei weitere Male über die Reinigungssäule gegeben. Während des gesamten Vorgangs des Waschens und Eluierens wurde streng auf Eis gearbeitet.

3.4.2 Antikörperreinigung

3.4.2.1 Affinitätsreinigung von Antisera an Protein A-Sepharose

Protein A ist ein Zellwandbestandteil von *Staphylococcus aureus*, welcher mit dem F_c-Fragment verschiedener Antikörper interagiert. Immunglobulin G (IgG) von Kaninchen besitzt eine hohe Affinität zu Protein A (25). Die Reinigung von (Kaninchen-)Antisera über Protein A-Säulen erlaubt lediglich die Abtrennung der IgG-Fraktion von den restlichen Blutserumbestandteilen.

Herstellung der Säule: Mit dem Säulenmaterial *Protein A-Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham Pharmacia), einer gekürzten Pasteurpipette und Glaswolle wurde eine Säule gebastelt. Das Gelbett besaß nach Ablauf des Suspensionspuffers ein Volumen von 1ml. Zur Entfernung des ethanolhaltigen Suspensionspuffers wurde mit dem 20fachen Säulenvolumen Wasser (bidest) und dem 10x Säulenvolumen 100mM Tris/HCl pH 8 gespült. Die Säule lief allein aufgrund der Schwerkraft, es wurde kein Druck benötigt.

Reinigungsprozedur (26): Die Bindekapazität der Protein A-Sepharose für IgG beträgt 35mg pro 1ml Gelbett. Der maximale IgG-Gehalt im Antiserum beträgt 10mg/ml. Entsprechend wurden 3,5ml Antiserum in die Reinigung eingesetzt, welche zur pH-Anpassung mit 1/10 des Volumens an 1M Tris/HCl pH 8,0 versetzt wurden (0,388ml). Die Säule wurde mit 10ml 100mM

¹⁹ Auch hier gilt der in Fußnote 18 beschriebene Effekt, daß im Eppendorf-Cup diese Beschleunigung nicht erreicht wird. (Erreicht werden ca. 23500xg; es wurde ebenfalls mit dem Kontronrotor A8.24 gearbeitet). Außerdem wurde die Beschleunigung generell vermindert, da sich gezeigt hatte, daß sich der Rotor trotz Zentrifugenkühlung erwärmt.

Tris/HCl pH 8,0 äquiliibriert. Anschließend wurde die Antiserum-Lösung aufgetragen und mit 10ml 100mM Tris/HCl pH 8,0 und 10ml 10mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100mM Glycin pH 3,0 in 10x 500 μ l-Schritten. Die Eluate wurden zur Neutralisation in 50 μ l 1M Tris/HCl pH 8,0 aufgefangen. Zur Überprüfung der Elutionsfraktionen auf Reinigungsprodukt (IgG) wurden SDS-PAGEs (Banden bei 55 und 25kDa) und Dot Blots angefertigt.

Säulenregeneration: Die Säule wurde sofort nach Verwendung mit 20ml 100mM Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert und unter diesem Puffer (2-3ml) aufbewahrt (4°C).

3.4.2.2 Antikörperreinigung über spezifisches Affinitätsmaterial

Ein für einen Antikörper spezifisches Affinitätschromatographiematerial kann durch Kopplung des entsprechenden Antigens an ein Säulenmaterial gewonnen werden. *Affi Gel 10* (BioRad) ist eine Agarose-Matrix, an welche über neutrale 10atomige Abstandshalter N-hydroxysuccinimid-Ester gebunden sind. Diese aktivierten Ester koppeln spontan in wässrigen und nicht-wässrigen Lösungen an primäre Amine unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid.

Herstellung des Affinitätsmaterials

Die Kopplung wurde wasserfrei in DMSO durchgeführt. Das Gel wurde auf eine Säule aufgetragen, so daß ein Gelbettvolumen von 700 μ l entstand (nach Ablauf des Suspensionsmittels Isopropanol). Das Gel wurde 5x mit 750 μ l kaltem Isopropanol und 1x mit 750 μ l DMSO gespült (dabei schrumpfte das Volumen des Gelbetts auf ca. 400 μ l). Für die Überführung in ein Gefäß zur Durchführung der Kopplungsreaktion, wurde das Gel in 500 μ l DMSO aufgeschwemmt und umpipettiert. *Affi Gel 10* besitzt eine Kopplungskapazität von 25mg Protein/ml Gel bzw. trägt 15 μ mol aktivierter Ester/1ml Gel. Zu koppelndes Peptid war das Antigen der Antiseren anti-pAC-NT, ein synthetisches 16AS-Peptid von 1,8kDa. 13,5mg = 7,5 μ mol lyophilisiertes Peptid wurden in 1ml DMSO gelöst und zu der *Affi Gel*-Suspension gegeben. Die Reaktanden wurden 4h bei RT unter ständigem Umkippen inkubiert. Der Ansatz wurde bei 300xg 1min zentrifugiert und die Reaktionslösung abpipettiert. Es wurden wieder 1450 μ l DMSO Reaktionsvolumen und 50 μ l 1M Ethanolamin in DMSO zugegeben, um evtl. verbliebene aktive Ester abreagieren zu lassen (1h, RT, ständiges Umkippen). Für die folgenden Waschschrte wurde die Suspension wieder auf die Säule übertragen, das Reaktionsgemisch ließ man ablaufen und spülte 1x mit 1ml DMSO und 2x mit 5ml 10mM Tris/HCl pH 7,5. Um evtl. ausgefallenes Peptid von der Säule zu entfernen, wurde wiederholt mit DMSO (1,5ml) gewaschen und anschließend wieder wässrig mit 10ml 10mM Tris/HCl pH 7,5. Es schloß sich eine Waschprozedur mit allen Puffern der Antikörper-Reinigung an (s.u.). Die Kopplungseffizienz wurde kontrolliert durch den Vergleich des Peptidgehalts in der Reaktionslösung vor und nach Kopplung.

Antikörperreinigung über die spezifische Affinitätssäule

500 μ l des zu reinigenden Antiserums wurden 1:10 mit 10mM Tris/HCl pH 7,5 verdünnt. Nach Äquilibrierung der Säule mit dem gekoppelten Antigen (s.o.) mit 10ml 10mM Tris/HCl pH 7,5 wurde die Antiserum-Verdünnung auf die Säule aufgetragen. Es wurde mit 10ml Äquilibrierungspuffer (10mM Tris/HCl pH 7,5) und 10ml Hochsalzpuffer gewaschen und 8x mit 250 μ l 100mM Glycin pH 2,5 eluiert. Die Eluate wurden zur sofortigen Neutralisation in 25 μ l 1M Tris/HCl pH 7,5 aufgefangen. Die Säule wurde anschließend mit 15ml 10mM Tris/HCl pH 7,5

neutralisiert. Die Elutionsfraktionen wurden gelelektrophoretisch über Acrylamidgel untersucht. Darüber hinaus wurden Dot Blots mit den Fraktionen durchgeführt.

3.5 Proteinexpression in *E.coli*

Die Expression in *E.coli*-Bakterienzellen wurde hauptsächlich für lösliche Konstrukte der Paramecium-AC standardmäßig versucht und stellte, wenn erfolgreich, ein schnelles und effizientes Überexpressionssystem dar. Die Expression integraler Membranproteinen in *E.coli* ist mit wenigen Ausnahmen nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem QIAexpress-System (Qiagen) (24) gearbeitet. Verwendet wurde das Expressionsplasmid *pQE30* und die Bakterienstämme *E.coli M15 [pREP4]* und *E.coli BL21(DE3) [pREP4]*. Das Zusatzplasmid [*pREP4*] wird selektiert durch Kanamycin und codiert für das *lac*-Repressorprotein, welches konstitutiv exprimiert wird. Die dadurch erhöhten *lac*-Repressorproteinlevel in der Zelle sind notwendig, um die hohe Transkriptionsrate des T5-Promotors (*pQE*) zu regulieren.

Für Expressionsüberprüfungen von Konstrukten in *pRSETa* (Verwendung als Fusionsvektor mit *pGM9* für T7-*Streptomyces*-System) wurde der Stamm *E.coli BL21(DE3)* mit Zusatzplasmid [*pLysS*] benutzt. [*pLysS*] codiert für T7-Lysozym, ein natürlicher Inhibitor der T7-Polymerase. Die niedrige Expressionsrate wird benötigt, um geringe Mengen T7-Polymerase in der nicht-induzierten Phase zu neutralisieren. Dies soll eine Hintergrundexpression vor Induktion verhindern.

Vorkultur

Als Vorkultur dienen 5ml LB-Übernachtskulturen, die direkt aus einer Bakteriendauerkultur angeimpft wurden. Für *M15*-Zellen wurden 25µg/ml Kanamycin und 100µg/ml Ampicillin, für *BL21*-Zellen 50µg/ml Kanamycin und 50µg/ml Ampicillin zugesetzt.

Schnelle Expression

Die schnelle Expression fand unter optimalen Wachstumsbedingungen für *E.coli*-Bakterienzellen und mit einer hohen Konzentration des Induktors IPTG statt. Dies ließ eine hohe Expressionsrate erwarten, was aber in der Regel zur Bildung von *inclusion bodies* (hochverdichtete, unlösliche Proteinaggregate) führte. Sie diente deshalb nur zur Expressionskontrolle oder zur Expression von Proteinen, welche unter denaturierenden Bedingung aufgereinigt werden konnten.

Die Vorkultur wurde 1:40 auf die Hauptkultur (20-200ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen (s. Vorkultur)) überimpft und bei 37°C, 270rpm bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ kultiviert. Nach Induktion mit 1mM IPTG wurden die Zellen weitere 3-5Std. inkubiert (37°C, 270rpm). Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation der Kulturen (20min, 3200xg, 4°C). Das überstehende Medium wurde abgegossen und die Zellen bei -80°C gelagert.

Langsame Expression

Dieses Protokoll wurde für die funktionelle Expression angewendet. Die Bakterien wurden unter verschlechterten Kulturbedingung (Temperatur < 37°C, geringere Sauerstoffzufuhr durch

langsamerem Schütteln) gezüchtet, was eine verlangsamte Proteinbiosynthese zur Folge haben sollte. Diese verringerte Expressionsrate sollte eine Steigerung der löslichen Expression mit sich bringen. Eine Erklärung hierfür wäre die verlängerte Zeit für die Proteinfaltung und geringere Fremdproteinspiegel im *E.coli*-Bakterium.

Die Überimpfung der Vorkultur auf die Hauptkultur (20-200ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen) geschah in einer Relation von 1:40. Die Bakterien wurden bei 30°C bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ bei 270rpm inkubiert und dann vor der Induktion auf RT (langsamem Schütteln) abgekühlt. Die Induktion erfolgte mit 30µM IPTG, für das weitere Wachstum wurden die Expressionskulturen 3-5Std. bei RT belassen und mit ca. 100rpm geschüttelt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und bei -80°C eingefroren.

Herstellung von Zellhomogenaten für Adenylatcyclase-Enzymtests

Bei den ersten Expressionsversuchen in *E.coli* (pAC-Frag. e (AS 524-751) und pAC-Frag.e+f (AS 524-865) s. Abschn. 4.4.1) erfolgte die Homogenatherstellung durch Aufnahme der Zellen in 1ml AC-Suspensionspuffer (Tris, Proteaseinhibitoren Benzamidiniumchlorid und EDTA), Ultraschallbehandlung (3x10sec), 30minütiger Inkubation auf Eis mit 0,2mg/ml Lysozym und abschließend einer 30minütigen Inkubation auf Eis mit 0,2mg/ml DNase und 5mM MgCl₂. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (45min, 48000xg, 4°C) abgetrennt.

Diese Methode wurde durch die Lyse durch Flüssigstickstoff-Schocks abgelöst: Das (bei 37°C aufgetaute) Zellpellet von 6-15ml Kultur wurde 3 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C zügig aufgetaut (ohne das Pellet zu warm werden zu lassen). Im Anschluß wurde das Lysat in 500µl *E.coli*-Aufnahmepuffer (50mM Tris/HCl pH 7,5 mit 20% Glycerin) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung (1-2x 5sec Stufe 4 auf Eis) vollständig aufgeschlossen. Bei Bedarf wurden partikuläre Zellbestandteile wie oben beschrieben abzentrifugiert.

3.6 Methoden der zellfreien Expression

3.6.1 Rapid Translation System RTS500

Die Anwendung des *Rapid Translation System RTS500* in Verbindung mit dem *E.coli Circular Template Kit* (Roche) erfolgte nach Herstelleranleitung. Für die Klonierung der löslichen pAC wurde der Plasmidvektor *pIVEX2.4b Nde* verwendet. Das Modellkonstrukt der *AnaCyaB1*²⁰ lag einkloniert in *pIVEX2.4c* vor (Tobias Kanacher). Es wurden 10µg rekombiniertes Expressionsplasmid eingesetzt, die Expressionsläufe wurden bei 30°C, 120rpm, 12Std. durchgeführt, was einem Mittelmaß bezüglich aller Parameter entspricht.

3.6.2 Herstellung von Paramecienlysaten als Zusatz zu zellfreien Expressionsversuchen

Die Entwicklung des Protokolls geschah in Anlehnung an (27) und (28).

²⁰ *AnaCyaB1*: Adenylatcyclase B1 aus *Anabaena spirulina*

3.6.2.1 Herstellung der Lysate

Ernte der Paramecien

Es wurden *Paramecium tetraurelia* 51S in 3l axenischem Kulturmedium gezüchtet (Gertrud Kleefeld) (29) und wie folgt geerntet. Jeweils 100ml Kultur wurden bei 400xg in der Ölzentrifuge für 2min zentrifugiert, das überstehende Medium abgesaugt und die Paramecien in einer geeigneten Menge Waschpuffer aufgenommen, welcher weder de- noch hyperpolarisierend wirkt. In einem Aliquot der vereinigten, in Puffer aufgenommenen Kultur wurden die Tiere gezählt. Bei vorübergehender Aufbewahrung der Zellen in Waschpuffer wurde die Zellsuspension zur Belüftung mit Druckluft durchperlt. Die Paramecien wurden zwei weitere Male zentrifugiert und gewaschen, zum Schluß wurde das Pellet im gleichen Volumen Lyse-Puffer aufgenommen (50% Zellen v/v).

Herstellung des Paramecien-Lysates

Die 50%ige Zellsuspension wurde zügig mit einem vorgekühlten Hand-Homogenisator durch 2maliges Durchdrücken bei 4°C aufgeschlossen (mikroskopische Kontrolle) und anschließend die großen, partikulären Bestandteile (Zellkerne, Mitochondrien, große Zellwandbruchstücke) durch Zentrifugation (20min, 10000xg, 4°C) (30) abgetrennt. Der Überstand wurde möglichst lipidfrei abgenommen und wird im Folgenden als Lysat bezeichnet. Das Lysat wurde zur Entfernung endogener RNA mit 75U Nuklease S7 pro 1ml Lysat (in 50mM Glycin, pH 9,2, 5mM CaCl₂) unter Zugabe von 20µl 100mM CaCl₂ pro 1ml Lysat behandelt. Diese microkoccen Endonuklease verwendet bevorzugt einzelsträngige Substrate, aber auch Doppelstrang-DNA. Der Ansatz wurde 15min bei 20°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10µl 200mM EGTA pro 1ml Lysat gestoppt. Das Lysat wurde nun noch einmal bei 10000xg, 4°C für 20min zentrifugiert und die Hälfte des resultierenden Überstandes in 250µl-Aliquoten bei -80°C als 10000g-Lysat eingefroren. Die andere Hälfte wurde einer Ultrazentrifugation zur Entfernung der Mikrosomen unterzogen (1Std., 100000xg, 4°C) und als 100000g-Lysat bei -80°C gelagert. RNase-Inhibitor (1U/µl rekombinantes RNasin (Promega)) wurde erst unmittelbar vor Einsatz der Lysate in *in vitro*-Expressionsversuchen zugesetzt.

Vor Verwendung der Lysate wurden Tests auf DNase- und Protease-Aktivität und auf Stabilität durchgeführt.

3.6.2.2 Test der Lysate

Stabilitätstest

40µl des 10.000g- und des 100.000g-Lysates wurden bei 30°C (ohne Agitation) mehrere Stunden inkubiert und die Lysate stündlich visuell beurteilt.

Zusätzlich wurde ein SDS-PAGE angefertigt, auf dem die vollständigen Lysate (frisch, nicht inkubiert) und die Lysate nach Inkubation, getrennt in Überstände und Niederschläge (Zentrifugation 10min, 12100xg, RT), aufgetragen wurden.

Test auf DNase-Aktivität

Es wurde auf zwei verschiedene Arten verfahren: a) Beurteilung der Aktivität anhand des Abbaus von exogen zugesetzter DNA und b) anhand des Abbaus endogener Rest-DNA.

Für den Test mit exogener DNA wurden jeweils 10µl beider Lysat-Typen mit ca. 40ng linearisierter DNA versetzt (linearisiertes Vektor-Insert-Konstrukt, ca. 5kb) und 4Std. bei 30°C inkubiert. Als Nullpunktkontrolle diente reine exogene DNA und ein Ansatz (Lysat + exogene DNA), der nicht inkubiert wurde; des weiteren wurden Ansätze mit 2mM EGTA-Zusatz durchgeführt.

Für den Test auf Abbau der endogenen DNA wurde das Lysat 13Std. bei 30°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit 2mM EGTA-Zusatz durchgeführt; nicht-inkubiertes Lysat diente als Nullprobe.

Die Ergebnisse der Tests wurden elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel analysiert.

Test auf Protease-Aktivität

Um feststellen zu können, ob das Lysat noch ungehemmte, proteolytische Aktivität besitzt (zugeetzte Proteaseinhibitoren: *Complete™ Mini* (Lyse-Puffer)), wurde der Abbau eines gereinigten, *hexahis-getaggten* 30,2kDa-Proteins (*AnaCyaB1* (AS 595-859)²¹ von Tobias Kanacher) untersucht. Hierfür wurden 100ng des Proteins mit jeweils 10µl der Lysate 4Std. bei 30°C inkubiert. Als Nullpunktkontrolle dienten nicht-inkubierte Proben der Lysate und des reinen Proteins (100ng); als Negativproben wurden Ansätze gemacht, welche nur die Lysate bzw. nur das Protein (100ng in Lyse-Puffer mit 20µg BSA) beinhalteten und ebenso wie die eigentlichen Proben inkubiert wurden. Um einen eventuellen Abbau des Proteins entdecken zu können, wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und ein Western Blot mit dem SDS-PAGE-Gel durchgeführt, in welchen der Primärantikörper anti-RGS(His)₄ für den spezifischen Nachweis des *hexahis-getaggten* Proteins und seiner *getaggten* Abbauprodukte eingesetzt wurde

3.6.2.3 Paramecienlysat-Zusatz zu der *in vitro*-Expression mit RTS500

In einem 1ml-Expressionsansatz wurden 500µl Flüssigkeit durch Paramecienlysat ersetzt. Da die Gesamtmenge an *E.coli*-Lysat, Energie- und Nährstoff-Mix (Bestandteile des *RTS500 E.coli Circular Template Kit*) im Gesamtansatz gleich bleiben sollte, wurden die 500µl Flüssigkeit eingespart durch Aufnahme der Lyophilisate des ‚Kits‘ in entsprechend geringerem Volumen. Der *Reaction-Mix* wurde hierfür 2fach konzentriert aufgelöst, dadurch verringert sich das Volumen des Gesamtansatzes um 375µl. Das *E.coli*-Lysat wurde in 125µl weniger Puffer aufgenommen als im Herstellerprotokoll angegeben (eingespartes Flüssigkeitsvolumen: 375µl+125µl = 500µl). Im Übrigen wurde der Ansatz nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Parameter des Expressionslaufes wurden beibehalten (30°C, 120rpm, 12Std.).

3.7 Methoden der *Streptomyces lividans*-Zellkultur

Streptomyceten sind eine Familie der Actinomyceten. Actinomyceten sind gram-positive Bakterien, deren Vertreter meist ein pilzartiges Mycel ausbilden. Allen gemeinsam ist ein hoher G/C-Gehalt der DNA.

Streptomyces (die größte Gattung der Streptomyceten mit über 500 Vertretern) sind überwiegend Bodenbakterien und als Antibiotikaproduzenten bekannt. Sie bilden stark verzweigte, kompakte Mycelien aus, wobei man zwischen Substratmycel (vollständig im Nährboden) und

²¹ *AnaCyaB1* (AS 595-859): katalytischer Bereich und C-Terminus der Adenylatcyclase B1 aus *Anabaena spirulina*

Luftmycel unterscheidet. Ein Mangel an essentiellen Nährstoffen initiiert die Sporulation, welche an den Spitzen des Luftmycels stattfindet. Streptomycesbakterien sind streng aerob und können häufig viele Kohlenstoff- und Stickstoffquellen abbauen.

Die Kultur wurde ausschließlich unter einer Sterilbank gehandhabt. Sämtliches Arbeitsgerät und alle Lösungen wurden vor Verwendung sterilisiert.

Die Kultivierung erfolgte in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 28-30°C. In Flüssigkultur war für eine ausreichende Belüftung durch die Verwendung von 2-Schikanenkolben in Kombination mit Spiralfedern oder Glasperlen (Durchmesser: \approx 3mm; ca. 1 Teelöffel auf einen 300ml-Kolben) zu sorgen. Die Kulturen wurden bei 170rpm geschüttelt. Allgemein war eine große Vielfalt von Medien für die unterschiedlichen Vorhaben notwendig.

Auf Agarplatten bildet *S.lividans* nach 3-5 Tagen große, feste Kolonien, welche eine mehligartige aussehende Oberfläche ausbilden, die nach mehreren Tagen Falten wirft und sich nach 1-2 Wochen stellenweise rot färbt. Auf Nährmedien, die zur Sporulation führen, konnte dies an einer Graufärbung der Kolonien von innen her erkannt werden. Aufgrund des Mycelwachstums im Nährboden, mußten zum „Picken“ von Kolonien ganze Agarstückchen mit der Impföse herausgelöst werden. Sollten damit Flüssigkulturen angeimpft werden, wurden die Stücke mit wenig Medium in einem Eppendorf-Cup mit einem passenden Homogenisator zerkleinert und in das Medium gegeben.

In Flüssigkultur wachsen die Bakterien in kugeligen, kompakten Mycelien, die sich beim Stehen lassen der Kulturkolben absetzen (klares Medium als Überstand). Die den Kulturen zugegebenen Glasperlen oder Spiralfedern sorgen für ein ständiges Zerschlagen der entstehenden Mycelkugeln (Bildung vieler, kleinerer Mycele). Um Kulturen zu überimpfen, wurde ein Aliquot (1ml) abgesetzter Kultur durch eine *Micro fine*TM-Insulinspritze (Becton-Dickinson) mit integrierter Kanüle durchgedrückt und dadurch homogenisiert. Das Pipetieren von Mycel aus der Flüssigkultur erforderte abgeschnittene, blaue Pipettenspitzen.

3.7.1 *Streptomyces lividans* 1326 als Expressionssystem²²

Für die Expressionsversuche mit *S.lividans* 1326 wurde das Expressionsplasmid *pUWL201* verwendet. Es handelt sich um einen ‚Shuttlevektor‘, welcher für Klonierungsaufgaben in *E.coli* vermehrt werden kann (Selektionsantibiotikum in *E.coli*: Ampicillin 100 μ g/ml). Die Selektion in *S.lividans* wird durch eine Thiostreptonresistenz (Medium: 10-25 μ g/ml; Weichagar: 250 μ g/ml) bewerkstelligt. *Upstream* der *Multiple Cloning Site* sitzt der *ermE up*-Streptomyceten-Promotor, welcher hohe Expressionslevel erreichen kann (31). Eine Ribosomenbindungsstelle ist nicht auf dem Vektor codiert, diese muß mit dem zu exprimierenden Gen in den Vektor eingesetzt werden (Konsensussequenzen (32)). In der vorliegenden Arbeit wurde die Ribosomenbindungsstelle des Plasmids *pQE30* verwendet. Das in *pUWL201* zu inserierende Konstrukt wurde am 5'-Ende über die *EcoRI*-Schnittstelle (direkt *upstream* der Ribosomenbindungsstelle in *pQE30*) herausgeschnitten.

²²In die Arbeit mit *S.lividans* wurde ich freundlicherweise von Axel Trefzer eingewiesen. Er überließ mir die Bakterienkulturen und den Vektor *pUWL201*.

Protoplastierung von Streptomyces

Allgemein müssen Streptomyces für die Transformation mit Lysozym protoplastiert werden. Die Protoplasten können anschließend in Anwesenheit von PEG 1000 DNA aufnehmen.

Von einer dicht gewachsenen Vorkultur wurde 1ml homogenisiertes Mycel auf 100ml S-Medium mit 0,75% Glycin überimpft. Die Hauptkultur wurde 24-36Std. kultiviert und dann für die Protoplastierung auf Eis abgekühlt. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation für 5min, 6198xg, 4°C, der Überstand wurde abgegossen. Durch Resuspension in 20ml eiskaltem P-Puffer und erneuter Zentrifugation wurde das Zellsediment von Medienresten befreit. Anschließend wurde das Pellet in 15-20ml P-Puffer mit 2mg/ml Lysozym aufgenommen und bei 30°C und leichtem schütteln inkubiert. Nach 20min, dann alle 10min wurde der Verlauf der Protoplastierung mikroskopisch verfolgt (1000x Vergrößerung, Ölimmersion). Sobald im Medium eine ausreichende Dichte von Protoplasten zu finden war, wurde die Protoplastierung durch Zugabe von 20ml eiskaltem P Puffer gestoppt und die Suspension wieder auf Eis gelagert. Um die Protoplasten vom restlichen Mycel abzutrennen, wurde der Ansatz durch sterile Watte filtriert (sterilisierte 60ml-Spritzen mit Wattebausch). Das Filtrat wurde zentrifugiert (10min, 1549xg, 4°C), der Überstand verworfen und die Protoplasten in einem geeigneten Volumen P-Puffer aufgenommen. Sie wurden in 200µl-Aliquoten bei -80°C eingefroren.

Transformation von Streptomyces

200µl Protoplasten-Suspension wurden mit mindestens 5-10µg rekombiniertem Streptomyces-Plasmid gemischt. Zu dem DNA-Protoplasten-Gemisch wurden 500µl eiskalter T-Puffer gegeben, der Ansatz durch 2-3maliges Auf- und Abpipettieren gemischt, auf zwei vorgewärmte R2YE-Platten gegeben und zusammen mit 3ml temperiertem R3-Weichagar darauf verteilt. Die Agarplatten wurden 12-18Std. bei 28°C inkubiert (zu diesem Zeitpunkt sind noch keine Kolonien sichtbar). Es folgte die Überschichtung mit 3ml temperiertem NB-Weichagar mit Zusatz des Selektionsantibiotikums. Nach 3-5Tagen Inkubation bei 28°C waren Klone sichtbar. Da ein Durchwachsen der antibiotikumhaltigen Weichagarschicht vorkommen kann, mußten die Klone gepickt und auf Selektionsantibiotikum-haltigen R2YE-Agarplatten auf ca. 1cm² je Klon ausgestrichen werden. Klone, die anwachsen, enthielten das transformierte Plasmid. Zu exprimierende, positiv selektierte Klone wurden vollständig von der Platte abgekratzt, in einem Eppendorf-Cup mit Homogenisator zusammen mit ca. 100µl Medium zerkleinert und in 100ml Flüssigkulturmedium R2YE (oder ein anderes, zweckmäßiges Medium) mit Selektionsantibiotikum gegeben. Die Kultur wurde bei 30°C, 170rpm 24-30Std. gezüchtet. Aus dieser Kultur konnten Dauerkulturen angelegt und Expressionskulturen angeimpft werden.

Kontrolle der Protoplastenpräparation

Je 200µl Protoplasten wurden einmal mit 1000µl Wasser und einmal mit 1000µl P-Puffer durch Auf- und Abpipettieren gemischt, ausplattiert und unter den gleichen Bedingungen wie die Transformationsansätze inkubiert. Dieser Versuch ließ erkennen, wieviel Mycelreste im Verhältnis zu Protoplasten in den Protoplastenpräparationen vorhanden sind. Während der Inkubation mit Wasser platzen die Protoplasten, während Mycelstücke diese Behandlung aufgrund ihres intakten Mureinsacculus überstehen. Der Zusatz von P-Puffer führt letztendlich nur zu einer Verdünnung der Protoplasten-Suspension.

Kontrolle auf Antibiotikasensibilität / -resistenz

200µl Protoplasten wurden mit 500µl T-Puffer gemischt, gleiche Volumina ausplattiert und unter den gleichen Bedingungen wie die Transformationsansätze inkubiert. Eine Platte wurde mit NB-Weichagar ohne Antibiotika-Zusätze überschichtet, die anderen mit den zu testenden Antibiotika. Diese Kontrolle diente vor allem dazu, sich von der Empfindlichkeit nicht transformierter Protoplasten auf das Selektionsantibiotikum zu überzeugen.

Expression in *Streptomyces lividans* 1326

Von einer dicht gewachsenen Flüssigkultur wurde 1ml abgesetztes Mycel durch eine Insulinspritze homogenisiert und in 100ml Flüssigkulturmedium R2YE mit Selektionsantibiotikum gegeben. Die Kultur wurde 24-36Std. bei 170rpm geschüttelt. Nach 24-36Std. wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (5min, 6198xg, 4°C). Das Zellpellet wurde bei -80°C gelagert.

Herstellung eines *Streptomyces*-Zellhomogenates

Das Zellpellet wurde im 4fachen seines Volumens an 50mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Auf Proteaseinhibitoren wurde verzichtet, da die Proteasen von *S.lividans* bei 0-4°C wenig aktiv sind. Während der Homogenatherstellung und im Anschluß wurde konsequent auf Eis gearbeitet. Die Bakteriensuspension wurde in einem Glashomogenisator passender Größe homogenisiert und anschließend in drei Läufen durch die *French™ Pressure Cell* bei 1000psi aufgeschlossen. Der Zylinder wurde eisgekühlt verwendet. Zur Abtrennung partikulärer Zellbestandteile wurde das Homogenat 45min bei 48000xg²³, 4°C zentrifugiert. Auf der Oberfläche sammelte sich eine schwer entfernbare Lipidschicht. Der Überstand (Lysat) wurde möglichst ohne Lipidverschleppung abgenommen und direkt in Enzymtests oder in eine native Reinigung eingesetzt.

Herstellung von Dauerkulturen

Generell sind Sporensuspensionen die dauerhafteste Aufbewahrungsform für *S.lividans*. Auf ihre Herstellung wurde jedoch verzichtet.

Es wurden Glycerolstocks wie folgt hergestellt. 1ml abgesetzter Zellen aus Flüssigkultur wurden abzentrifugiert (30sec, Tischzentrifuge), das Pellet zum Waschen 2mal in 15% Glycerol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 15% Glycerol bei -80°C eingefroren.

3.7.2 Proteinexpression mit dem T7-*Streptomyces lividans*-System

T7-*Streptomyces lividans* ist ein *S.lividans*-Stamm von Josef Altenbuchner, welcher im Genom die T7-Polymerase trägt. Der Stamm ist bislang unveröffentlicht und wurde mir freundlicherweise für Expressionsarbeiten zur Verfügung (33) gestellt²⁴. Die Induktion der T7-Polymerase steht unter Thiostrepton-Kontrolle. Ein Selektionsdruck für den Erhalt der T7-Polymerase kann

²³ Bezüglich der Beschleunigung bei dieser Zentrifugation vgl. Fußnote 18

²⁴ Volker Pfeiffer wies mich netterweise in die Besonderheiten mit der Arbeit mit diesem Stamm ein und teilte mir viele seiner persönlichen Erfahrungen mit. Er überließ mir das Plasmid *pGM9*.

durch die Antibiotika Streptomycin (10µg/ml) und Spectinomycin (100µg/ml) aufgebaut werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsexperimente wurden beide Antibiotika den Kulturen im ständigen Wechsel zugesetzt. Zum Einsatz kam für diesen Stamm der Streptomyces-Vektor *pGM9*. Dieser Vektor wird nur in *S.lividans* propagiert. Der *Origin*, für den der Vektor codiert, ist temperatursensitiv (*ori ts*), um die Replikation des Plasmids sicherzustellen, wurde bei Kultivierungstemperaturen $\leq 30^{\circ}\text{C}$ gearbeitet. Der Selektionsmarker für diesen Plasmidvektor wird durch eine Kanamycinresistenz dargestellt. Die Selektion erfolgt mit der hohen Konzentration von 750µg/ml. *pGM9* selbst trägt keinen T7-Promotor und keine *Multiple Cloning Site*. Für die Expression wird dieses Plasmid mit einem T7-System-Expressionsvektor aus *E.coli* fusioniert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Expressionsvektor *pRSETa* verwendet. Die Fusion wurde über die *Hind* III-Schnittstellen in beiden Vektoren durchgeführt. Wichtig war die richtige Orientierung der Fusionspartner. Nur Produkte, deren sämtliche Gene in der gleichen Richtung transkribiert werden, konnten für die Expression Verwendung finden. Die Auswahl richtiger Klone erfolgte durch Restriktionsverdau mit *Nde* I, welcher charakteristische Fragmente liefert: bei richtiger Orientierung der Fusionspartner entsteht ein 7kb-Fragment und ein Fragment von 2,2kb + Insertgröße; bei entgegengesetzter Orientierung ist auf dem Agarosegel eine 4,8kb-Bande und eine Bande von 4,3kb + Insertgröße zu erkennen. Durch die Fusion von *pGM9* mit dem *E.coli*-Plasmidvektor entsteht ein *Shuttlevektor*, welcher in *E.coli* vermehrt werden kann. Als Marker für das Fusionsprodukt diente Kanamycin in einer Konzentration von (10-)20µg/ml. Hierdurch wurden ausschließlich Fusionsprodukte und keine religierten Einzelvektoren selektiert, weil *pGM9* allein nicht in *E.coli* repliziert und *pRSETa* keine Kanamycinresistenz zur Verfügung stellt. Überdies wurde *pRSETa* vor Ligation dephosphoryliert. Das Gen von Interesse wurde vor Fusionierung mit dem Streptomycesvektor *pGM9* in *pRSETa* inseriert. Sowohl das Rekombinationsprodukt Insert in *pRSETa* als auch das Fusionsprodukt *pRSETa* mit Insert in *pGM9* konnten durch Expression in *E.coli* BL21(DE3)[*pLysS*] getestet werden.

Durch die gewonnene Replizierbarkeit in *E.coli* von *pGM9* nach Fusion mit *pRSETa*, stand die Vermehrung des Fusionskonstruktes in *E.coli* als Quelle für das Plasmid *pGM9* zur Verfügung. Die aufwendigeren Plasmidpräparationen aus den gram-positiven *S.lividans* konnten so umgangen werden.

Protoplastierung von T7-Streptomyces lividans

Zu Beginn der Arbeiten mit dem T7-*S.lividans*-System stand ein neues Protoplastierungsprotokoll für Streptomyces von Volker Pfeiffer zur Verfügung.

T7-*S.lividans* wurde in 100ml CRM-Medium gezüchtet (30°C, 24-30Std.). Für die Protoplastierung wurde das Mycel abzentrifugiert (10min, 1559xg, RT) und durch Resuspension in 7ml P-Puffer und erneuter Zentrifugation gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 10ml P-Puffer mit 2mg/ml Lysozym resuspendiert und bei 30°C inkubiert. Zur Durchmischung wurde das Gefäß regelmäßig 1-2mal umgekippt. Der Fortschritt der Protoplastierung wurde alle 10min mikroskopisch (1000x Vergrößerung, Ölimmersion) verfolgt. Sobald das Medium zu ca. 30-50% mit Protoplasten angefüllt war (30-60min), wurde die 30°C-Inkubation abgebrochen, eventuelle Klumpen durch 3maliges Aufziehen der Suspension mit einer 20ml Glaspipette (auslaufen lassen ohne ausblasen) aufgelöst und fraktionell zentrifugiert. Zunächst wurde für 7min bei 757xg, RT zentrifugiert. Hierbei sedimentiert das Mycel. Der Protoplasten-haltige Überstand wurde abdekantiert und vorsichtig mit 5ml P-Puffer gemischt (umkippen). Die Proto-

plasten wurden bei 1380xg (10min, RT) pelletiert, der Überstand verworfen (war er noch trüb, wurde mikroskopisch auf das Vorhandensein weiterer Protoplasten kontrolliert und eventuell wiederholt zentrifugiert) und das Pellet 1x mit 7,5ml P Puffer gewaschen (Zentrifugation: 1380xg, 10min, RT). Die Protoplasten wurden je nach Größe des Pellets in 0,1-1ml P-Puffer vorsichtig resuspendiert (auf- und abpipettieren) und zu 100µl-Aliquoten bei -80°C gelagert.

Transformation von T7-Streptomyces lividans

Die Transformation erfolgte im Wesentlichen wie bei *S.lividans* 1326. 100-200µl Protoplastensuspension wurde mit 1-10µg DNA gemischt, 500µl T-Puffer zugegeben und nach 1-2maligem Auf- und Abpipettieren auf vier R5-Agarplatten ausgestrichen. Der Transformationsansatz wurde nicht in R3-Weichagar eingebettet. Nach 18Std. Inkubation bei 30°C wurde mit 3ml temperiertem NB-Weichagar mit Selektionsantibiotikum (500µg/ml Kanamycin) überschichtet und für weitere 3-5 Tage bei 30°C wachsen gelassen. Um sicherzustellen, daß die angewachsenen Kolonien nicht durch die Kanamycin-Weichagarschicht durchgewachsen sind, wurden auch hier die Klone gepickt und auf Kanamycin-haltigen (750µg/ml) R5-Agarplatten wieder ausgestrichen (je Klon ca. 1cm²). Anwachsene Klone enthalten das transformierte Expressionsplasmid. Sie werden vollständig von der Platte gepickt und nach Homogenisation in 100ml CRM-Medium mit einem der beiden T7-Polymerase-Markerantibiotika Streptomycin oder Spectinomycin und 750µg/ml Kanamycin überführt. Nach 24-30Std. Wachstum bei 30°C, 170rpm konnten aus dieser Kultur Dauerkulturen hergestellt und Expressionskulturen angeimpft werden.

Expression in T7-Streptomyces lividans

1ml abgesetzten Mycels wurde durch eine Insulinspritze (*Micro fine*TM mit integrierter Kanüle, Becton-Dickinson) homogenisiert und auf 100ml R5-Flüssigkulturmedium mit 25-50µg/ml Thiostrepton als Induktor der Proteinexpression überimpft und bei 30°C, 170rpm inkubiert. Nach ca. 24-30Std. wurden die Zellen geerntet (10min, 1559xg, 4°C) und das Pellet bei -80°C gelagert.

Herstellung von Zellhomogenaten

Die Herstellung der Zellhomogenate erfolgte wie mit *S.lividans* 1326 (s S. 55).

Herstellung von Dauerkulturen

Glycerolstocks wurden wie schon für *S.lividans* 1326 (s. S. 55) beschrieben hergestellt. Zum Teil wurden die Kulturen auch ohne Glycerolzusatz direkt in ihrem jeweiligen Medium eingefroren. Überdies wurden Dauerkulturen von Agarplatten-Kolonien angelegt. Hierfür wurden die Kolonien von der Platte gelöst, mit P-Puffer im Eppendorf-Cup homogenisiert und in dieser Form eingefroren.

3.8 Methoden der *HEK293*-Zellkultur

Kultivierung von HEK293-Zellen

Es handelt sich bei dieser Zellkultur um humane Embryonalnierenzellen, welche mit der DNA des humanen Adenovirus transformiert wurden (34). *HEK293*-Zellen wurden als Monolayer auf 100mm Gewebekulturschalen bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und mindestens 80% Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Es wurde mit einem Begasungsbrutschrank (CO₂-Regelung) (UniEquip) gearbeitet. Es wurden 10ml Gentamycin- und FCS-haltiges MEM-Medium (Gibco) je Platte verwendet. Die Passage der Zellen wurde bei 80% Konfluenz durchgeführt. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen durch Spülen mit 10ml frischem Medium von der Platte gelöst. 0,5-2,5ml der Zellsuspension wurden auf eine frische Gewebeschale überführt und mit Medium auf 10ml aufgefüllt.

Stabile Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode

Diese Methode (35) wurde in unserem Labor für den Expressionsvektor *pIRES1neo* optimiert und etabliert. Die zu transfizierende DNA muß eine hohe Qualität besitzen und keimfrei sein. Die Qualität der Midipräparations-DNA (*Wizard Plus SV Plasmid Purification Kit* (Promega)) hatte sich als ausreichend herausgestellt. 24Std. vor Transfektion wurde eine 80% konfluente Platte 1:20 passagiert, d.h. 0,5ml abgelöster Zellsuspension (10ml) wurden auf eine neue Gewebeschale ausgesät. 1Std. vor Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und 10ml frisches Medium langsam auf die Kultur gegeben, ohne die Zellen abzulösen. 20min vor Transfektion wurde 10µg rekombiniertes Expressionsplasmid mit sterilem bidest. Wasser auf 450µl aufgefüllt und mit 50µl 2,5M CaCl₂ vermischt. Nach Zugabe von 500µl 2xHEBS wurde sofort 5sec *gevortext* und der Ansatz 20min bei RT inkubiert. Es bildet sich ein sehr feiner Calciumphosphat-DNA-Niederschlag. Diese Kristallsuspension wurde tropfenweise gleichmäßig über die *HEK293*-Gewebekultur verteilt. Die Größe des Präzipitats wurde mikroskopisch kontrolliert (Größe von *E.coli*-Zellen). Die Zellen wurden 12-16Std. unter Kulturbedingungen inkubiert, dann wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, der im jeweils einstündigen Abstand noch 2mal wiederholt wurde. Nach dem dritten Mediumwechsel sollte sich das gesamte Präzipitat aufgelöst haben (mikroskopische Kontrolle). 3 Tage nach Transfektion wurde mit der Selektion auf stabil transformierte Zellen begonnen, indem alle Zellen der Gewebeschale (sollte konfluent sein) auf eine frische Schale passagiert wurden und dem Medium das „Selektions-Antibiotikum“ G418 in einer Konzentration von 700µg/ml (bezogen auf die biologische Aktivität) zugesetzt wurde. Nach weiteren 3 Tagen (6 Tage nach Transfektion) wurden die Zellen wiederum vollständig passagiert und die Konzentration des Selektions-Antibiotikums beibehalten. Im Laufe der folgenden 3 Tage beginnt das Absterben der nicht-transformierten Zellen, so daß am 9. und 13. Tag nach Transfektion nur ein Mediumwechsel durchgeführt wurde (weiterhin Zusatz von G418). In der Folgezeit wurden die Zellen dann bei Erreichen der Konfluenz des *Monolayers* passagiert. Der Selektionsdruck wurde permanent aufrecht erhalten. Frühestens 17 Tage nach Transfektion (14 Tage nach Beginn der Selektion) war also die erste Zellernte möglich.

Herstellung von HEK293-Zellhomogenaten

Von den zur Ernte bestimmten Kulturplatten (ca. 80% konfluent) wurde das Medium abgesaugt und langsam 5ml eiskaltes PBS auf die Kultur gegeben ohne die Zellen abzulösen. Nach kurzem, vorsichtigem Schwenken wurde der Puffer wieder abgesaugt. Dieser Vorgang diente der Entfernung von Medienrückständen. Beim zweiten Waschvorgang, ebenfalls mit 5ml eiskaltem PBS, wurden die Zellen abgelöst, in ein Zentrifugationsgefäß überführt und die Kultur durch Zentrifugation (3min, 500xg, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 200µl AC-Suspensionspuffer resuspendiert. Die Zellyse wurde durch zweimaliges Schockgefrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C herbeigeführt. Vor Einsatz des Homogenats in Enzymtests oder Proteinbestimmungen wurde es durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Anlegen von HEK293-Dauerkulturen

Eine konfluente HEK293-Platte wurde mit 10ml frischem Medium in Suspension gebracht, die Zellen bei 500xg, 3min, RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in 0,5ml MEM-Medium mit 40% FCS resuspendiert, mit der gleichen Menge MEM-Medium, das 20% DMSO enthält, gemischt und sofort bei -80°C eingefroren. Nach 3-7 Tagen werden die Kulturen zur dauerhaften Einlagerung in Flüssigstickstoff überführt (während der Überführung durfte keine vorübergehende Erwärmung der Zellen stattfinden). Die transfizierten Zelllinien sind so wenigstens ein Jahr haltbar.

Zum Wiederanwachsen der Dauerkulturen wurden diese bei Handwärme angetaut (kein Schütteln), in eine 250ml Kulturflasche überführt und zügig mit 14ml Kulturmedium versetzt. Sie wurden unter Kulturbedingungen 12-16Std. kultiviert, dann erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 3-4 Tagen sollte ein 50-80% konfluenter Monolayer entstanden, und die Zellen auf Gewebeschalen passagierbar sein.

3.9 Methoden der Sf9-Insekten-Zellkultur

Bei der Zellkultur Sf9 handelt es sich um eine Ovarzelllinie des Schmetterlings *Spodoptera frugiperda*. Die Transfektion dieser Zellkultur wurde mit dem BAC-TO-BAC™ *Baculovirus Expression System* (Gibco BRL Life Technologies) durchgeführt. Die Methoden orientierten sich an den Herstellerprotokollen BAC-TO-BAC™ *Baculovirus Expression System* (36) und *Guide to Baculovirus Expression Vector Systems and Insect Cell Culture Techniques* (beides Gibco) (37) und *Growth and Maintenance of Insect Cell Lines* (Invitrogen) (38) und Protokollen, die von Peter Engel hier im Labor etabliert wurden (39).

Es wurde ausschließlich mit sterilen Lösungen und Medien, autoklavierten Pipettenspitzen und Gefäßen gearbeitet. Mit Ausnahme der Erlenmeyerkolben, die für die Suspensionskulturen Verwendung fanden, handelte es sich um Ein-Weg-Plastikware. Die Erlenmeyerkolben blieben exklusiv der Zellkultur vorbehalten und wurden mit dem kulturverträglichen Detergens 7X™ PF (ICN) gereinigt. Alle Arbeiten wurden unter einer *Laminar Flow*-Sterilbank durchgeführt.

3.9.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen können sowohl adhärent (Monolayer-Kultur) als auch in Suspension kultiviert werden. Beide Kulturen wurden bei 27°C ohne CO₂-Begasung und ohne erhöhte Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Unter diesen Bedingungen sind Verdoppelungszeiten von 24Std. typisch.

Monolayer-Kultur

Für die Monolayer-Kultur wurden die Zellen adhärierend am Boden einer 50ml-Kulturflasche unter 5ml *Monolayer-Kulturmedium* gezüchtet. Bei Erreichen von 100% Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig durch Überspülen mit frischem *Monolayer-Kulturmedium* abgelöst. 15-20% der Zellsuspension wurde mit frischem Medium aufgefüllt auf 5ml auf eine neue Kulturflasche überbracht. Die Wachstumsdauer bis zur vollständigen Konfluenz beträgt ungefähr eine Woche.

Diese Art der Kultivierung ist sehr schonend für die Zellen, die Ausbeute in der Zellmenge ist jedoch gering. Monolayer-Kulturen wurden für die *Lipo-Transfektion* der Bacmid-DNA verwendet.

Suspensionskultur

Sf9-Suspensionskulturen wurden in 100ml-Kolben (Kulturvolumen 10-25ml), 250ml-Kolben (Kulturvolumen 25-80ml), 1000ml-Kolben (Kulturvolumen 100-250ml) und 2000ml (Kulturvolumen 250ml-500ml) bei 90rpm mit *Suspensionskultur-Medium* gezüchtet. Der Medium-Zusatz *Pluronic F-68* verringert die mechanische Belastung der Zellen durch die auftretenden Reibungskräfte.

Wichtiger Parameter der Kultur ist die Zelldichte. Zur Bestimmung wurden die Kulturen in einer Neubauer-Zählkammer (0,1mm Tiefe, 0,0025mm²) ausgezählt.

Die Kulturen wurden regelmäßig alle 2 Tage (Wochenende 3 Tage) ausgezählt und passagiert. Hierfür wurde ein Aliquot der Kultur in einen frischen Kolben mit *Suspensions-Medium* überführt und dabei auf eine Zelldichte von 0,8-1Mio Zellen/ml verdünnt. In 2-3 Tagen wuchsen die Suspensionskulturen typischerweise auf eine Dichte von 2-3,5Mio Zellen/ml heran.

Um Sf9-Zellen in Suspension zu kultivieren, mußten diese aus einer *Monolayer-Kultur* in Suspension überführt werden. Hierzu wurde von 5 vollständig konfluenten *Monolayern* (50ml-Kulturflaschen) (in der Regel frisch in Kultur genommene Flüssigstickstoff-Dauerkulturen) das Medium abgesaugt, die Zellen durch Überspülen mit *Suspensions-Medium* abgelöst, vollständig in einen Kulturkolben mit *Suspensions-Medium* überführt und auf eine Zelldichte von 0,8-1Mio Zellen/ml gebracht. Die Passage der Zellen fand regelmäßig nach 2 Tagen (über das Wochenende nach 3 Tagen) wie oben beschrieben statt.

Der Vorteil der Suspensionskultur liegt in der Größe der Kulturen. Es können Zellmengen (große Kulturvolumina) infiziert und geerntet werden. Suspensionskulturen wurden für die transiente Infektion mit rekombinanten Baculoviren und der daraus folgenden Expression der Genprodukte eingesetzt.

Inkulturnahme von Sf9-Dauerkulturen

Kulturen mit niedrigen Passage-Zahlen lagen als Dauerkulturen in 1:1-Gemischen von *Monolayer-Kulturmedium* und *Einfrier-Medium* eingelagert in flüssigem Stickstoff vor.

Um eine gefrorene Dauerkultur zu rekultivieren, wurde das Kryogefäß schnell unter Handwärme fast aufgetaut und sofort in eine 25ml-Kulturflasche mit 4ml *Monolayer-Kulturmedium* überführt. Man ließ die Zellen 30-45min adhären, dann wurde das Medium gewechselt, um das DMSO-haltige *Einfrier-Medium* zu entfernen. Die Kultivierung erfolgte wie üblich, nach Erreichen von 100% Konfluenz wurden die Zellen durch Überspülen mit frischem Medium abgelöst und auf 5 frische Kulturflaschen verteilt. Die weitere Zucht als *Monolayer* oder in Suspension erfolgte wie in den vorigen Abschnitten beschrieben.

3.9.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren

***In vivo*-Transposition in *E.coli* DH10 Bac-Zellen**

Das Genom von Baculoviren ist zu groß, um als Klonierungsvektor verwendet werden zu können. Eine effiziente, moderne Methode zur Erzeugung rekombinanter Baculoviren beruht auf einer *in vivo*-Transposition einer Expressionskassette von einem Donorplasmid (*pFastBac1*) in ein Bacmid. Das Bacmid ist ein Baculovirus *Shuttlevektor*, welcher das gesamte Genom eines Baculovirus enthält und in *E.coli* DH10 Bac-Bakterienzellen repliziert wird. Es trägt eine Kanamycinresistenz als Selektionsmarker, das low-copy *mini-F replicon* und ein Fragment des *lacZ*-Gens, dessen Genprodukt mit der chromosomal kodierten *lacZ*-Deletion komplementieren kann. Integriert in das *lacZ*-Fragment auf dem Bacmid liegt der kurze DNA-Abschnitt *mini-attTn7*, die Empfängersequenz (*attachment site*) für das Transposon Tn7.

Das zu exprimierende Gen wird in das Donorplasmid *pFastBac1* inseriert. Für die vorliegende Arbeit wurde ein modifizierter *pFastBac1* verwendet, welcher N-terminal für einen *hexahis-tag* codiert (s. S. 145). Die Expressionskassette des *pFastBac1* trägt den starken Polyhedrin-Promotor des Baculovirus *AcNPV* (*Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus*), eine *Multiple Cloning Site* und ein *SV40 poly(A)* Signal. Des Weiteren umfassen die Transposongrenzen *Tn7R* und *Tn7L* den Resistenzmarker *Gm^r*.

Die Transposition des *mini-Tn7*-Elements aus *pFastBac1* in das Bacmid findet bei Transformation des rekombinierten Donorplasmids in *E.coli* DH10 Bac-Zellen statt. Diese tragen zusätzlich ein Helferplasmid, welches die notwendigen Funktionen für die Transposition beisteuert.

Ca. 1µg rekombinierter *pFastBac1* (Minipräparations-DNA) wurde auf angetaute, kompetente *E.coli*-DH10 Bac-Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 1minütiger 42°C-Schock und 10min abkühlen auf Eis. Zum Transformationsansatz wurde 1ml SOC-Medium zugesetzt und die Zellen 4-5Std. bei 37°C, 220rpm anwachsen gelassen. 300-500µl dieses Ansatzes wurde auf LB-Agarplatten mit Kanamycin-, Gentamycin- und Tetracyclin-Zusatz ausgestrichen und 48-60Std. bei 37°C inkubiert. Es entstehen große Kolonien, wovon gegen das Licht betrachtet reinweiß erscheinende Kolonien positive Klone darstellen.

Bacmid-Präparation

Positive Klone wurden gepickt und in 5ml LB-Medium (mit 50µg/ml Kanamycin, 7µg/ml Gentamycin, 10µg/ml Tetracyclin) über Nacht (37°C, 270rpm) heranwachsen gelassen. Die Bac-

mid-Präparation erfolgte mit 3ml Kultur je Klon und wurde mit dem Plasmid-Präparationskit *Nucleobond AX* (Macherey-Nagel) speziell für die Isolierung großer DNA-Moleküle nach dem Protokoll *Purification of low copy plasmids, cosmids, P1 constructs, BAC's and PAC's* durchgeführt. Zum Schluß wurde die Bacmid-DNA in 30µl TE-Puffer aufgenommen. Während der gesamten Prozedur wurde streng darauf geachtet, die Bacmid-DNA nicht zu scheren (nicht Schütteln oder Vortexen, langsames Pipettieren). Aus dem gleichen Grund wurden die Bacmide nicht eingefroren. Um längere Lagerung zu vermeiden, wurden Bacmide noch am Tag der Präparation weiterverwendet (Lipo-Transfektion von *Sf9*-Zellen). 15µl Bacmid-Eluat wurde elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel kontrolliert. Der Erfolg der Rekombination der Bacmide wurde mittels PCR überprüft (s. S 35).

Lipo-Transfektion von *Sf9*-Zellen

Die Herstellung rekombinanter, infektiöser Baculoviren geschah durch Transfektion von *Sf9*-Zellen mit den Bacmiden mit Hilfe des Reagenzes *CellFECTIN™* (Gibco BRL Life Technologies). *CellFECTIN™* ist eine Mischung aus einem kationischen und einem neutralen Lipid, welches mit DNA spontan Lipid-DNA-Komplexe bildet. Nach Aufnahme der Bacmid-DNA beginnen die Zellen die Informationen des enthaltenen Virusgenoms umzusetzen und produzieren Viruspartikel, welche nach Zellyse freigesetzt werden.

Für die Transfektion wurden ausschließlich FCS- und Gentamycin-freie Medien (*TC100*-Insektenzellmedium) verwendet.

Von einer konfluenten Monolayerkultur wurde das Medium abgesaugt, die adhärenen Zellen 2mal mit reinem *TC100*-Medium gewaschen und anschließend durch Überspülen mit frischem Medium darin suspendiert und ausgezählt. 1Mio Zellen wurden auf eine 35mm-Gewebekulturschale ausgesät und das Medium auf 2ml aufgefüllt. Wichtig war hier die gleichmäßige Verteilung der Zellen über die gesamte Platte. Die Platte wurde mindestens 45min zur Adhäsion der Zellen im Brutschrank inkubiert. 14µl Bacmid-Präparation wurden mit 86µl *TC100*-Medium gemischt und zu einer Mischung aus 10µl *CellFECTIN™* und 90µl *TC100*-Medium gegeben. Der Ansatz wurde durch langsames 2maliges Auf- und Abpipettieren gemischt, 45min bei RT inkubiert und mit 800µl *TC100*-Medium auf 1ml Transfektionsansatz verdünnt. Von der vorbereiteten 35mm-Gewebekulturschale wurde das Medium abgesaugt und der 1ml Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Nach 5Std. Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektions-Medium-Gemisch abgesaugt und durch 2ml vollständiges Medium (FCS- und Gentamycin-haltiges *TC100*-Medium) ersetzt. Nach 72Std. wurde der Medienüberstand mit der Pipette abgenommen und bei 4°C gelagert. Er enthält die rekombinierten Baculoviren verpackt in infektiösen Viruspartikeln. Eventuell mitgeschleppte Zellen wurden durch Zentrifugation (4min, 250xg, 4°C) entfernt. Dieser sogenannte Primärvirus wurde durch Infektion von größeren *Sf9*-Suspensionskulturen in die Virusamplifikation eingesetzt. Auf das Titern des Primärvirusstocks und auch der amplifizierten Viren durch *Plaqueassays* wurde verzichtet.

Infektion von *Sf9*-Zellen mit Baculoviren

Virusamplifikation zur Herstellung von Sekundärvirusstocks

15ml einer frisch passagierten *Sf9*-Suspensionskultur (0,8Mio Zellen/ml) wurde mit 300µl Primärvirus versetzt. Aufgrund des Verzichts auf *Plaqueassays* war der Primärvirustiter unbekannt, und es mußte mit 300µl Primärvirus auf 15ml Kultur auf eine mittlere Infektionsrate (Er-

fahrungen von Laborkollegen) zurückgegriffen werden. Die Alternative wäre eine Infektionsreihe mit unterschiedlichen Primärvirusmengen gewesen. Nach 48Std. wurden die Kulturen unter sterilen Bedingungen in Falcontubes überführt und bei 150xg, RT für 4min zentrifugiert. Der Viren-haltige Medienüberstand wurde mit einer Pipette abgenommen und bei 4°C gelagert. Die sedimentierten Zellen konnten nach Homogenisation einem Enzymtest zugeführt werden.

Baculovirus-Infektion von Sf9-Zellen

Da auch der Titer des Sekundärvirusstocks unbekannt war, wurde mit Infektionsreihen gearbeitet, d.h. es wurden mehrere Kulturkolben mit verschiedenen Sekundärvirusmengen infiziert und die optimale Infektionsrate anhand der Morphologie, der Zellzahlen, der Expressionsrate und der Enzymaktivität nach jeweils 72Std. Inkubation ermittelt. Für Vorexperimente wurden 15ml-Suspensionskulturen mit Sekundärvirusstock $1:10^5$ (0,15µl), $1:10^4$ (1,5µl), $1:10^3$ (15µl) und $1:100$ (150µl) infiziert. Für spätere Tests wurden größere Kulturvolumina mit entsprechenden Volumina Sekundärvirus infiziert. Nach 72Std. wurden die Zellen gezählt, die Morphologie festgestellt und durch Zentrifugation geerntet (4min, 150xg, RT). Die Zellen wurden für Enzymtests und Western Blots verwendet. Hierfür wurden Zellhomogenate wie folgt hergestellt.

Herstellung von Sf9-Zellhomogenaten

Um einen Abbau des Genproduktes zu vermeiden, wurde auf Eis gearbeitet. Das 150xg-Zellpellet wurde zum Waschen in 2-5ml kaltem PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert (4min, 150xg, RT) und der überstehende Puffer abgesaugt. Je nach Volumen des Niederschlags wurde das Pellet in 200-1000µl Sf9-AC-Suspensionspuffer oder bei folgender Proteinreinigung in Sf9-Lyse-/Bindepuffer aufgenommen und durch eine 2malige Prozedur von Einfrieren in flüssigem Stickstoff und schnellem Auftauen bei 32°C (ohne stärkere Erwärmung der Zellsuspension) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden anschließend 3x durch eine 26er Kanüle, aufgesteckt auf eine Insulinspritze, eingezogen und wieder ausgestoßen und durch die auftretende Scherung homogenisiert. Das Zellhomogenat wurde durch eine Zentrifugation (30min, 48000xg, später 30800xg, 4°C)²⁵ von partikulären Zellbestandteilen befreit. Der Überstand wurde direkt in Enzymtests eingesetzt oder einer Proteinreinigung unterzogen.

3.10 Adenylatcyclase-Enzymtest

Zur Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität von Zellhomogenaten oder gereinigten Proteinen wurden diese mit radioaktiv markiertem Substrat α -³²P-ATP umgesetzt und die Menge an entstandenem radioaktivem Produkt ³²P-cAMP gemessen. Substrat, Produkt und Substratabbauprodukte konnten chromatographisch über zwei Säulen (1,2g Dowex-50WX40-400; 1g Al₂O₃ 90 aktiv, neutral) getrennt werden. ³H-cAMP diente als interner Standard für die Wiederfindungsrate, was insbesondere bei dem Test von Homogenaten wegen der auftretenden Phosphodiesterase-Aktivität wichtig war. Als regenerierendes System wurde Kreatinkinase/Kreatinphosphat zugesetzt. Bei einem Standardtest wurden 75µM ATP (inklusive 16-30kBq [α -³²P]-ATP), 2mM MnCl₂ und/oder 10mM MgCl₂²⁶ und 2mM cAMP (inklusive \approx 100Bq [2,8-³H]-

²⁵ Bezüglich der Zentrifugation siehe die Fußnoten 18 und 19.

²⁶ Wenn nicht anders angegeben wurde der Test mit 2mM Mn²⁺ und 10mM Mg²⁺ durchgeführt.

cAMP) eingesetzt (außerdem im Reaktionsgemisch enthalten (Endkonzentrationen im Test): 22% Glycerol, 50mM Tris/HCl, pH 7,5 oder 8,0, 50mM KCl, 11,5µg/100µl Kreatinkinase, 3mM Kreatinphosphat).

Ein 100µl Testansatz war aus drei Komponenten zusammengesetzt:

Enzymprobe:	Zellhomogenat oder gereinigtes Protein (eventuelle Testzusätze wurden zugemischt), mit Wasser verdünnt auf 40µl
AC-Cocktail:	50µl mit allen Reaktionsbestandteilen (2x konzentriert)
Substrat-Lsg.:	10µl 750µM ATP (inclusive 16-30kBq [α - ^{32}P]-ATP).

Jeder Testansatz wurde doppelt ausgeführt. Als Nullwert diente ein Testansatz, dem anstelle einer Enzymprobe nur Wasser zugesetzt wurde. Die Enzymprobe wurde auf Eis in 1,5ml Eppendorf-Cups vorgelegt, mit 50µl AC-Cocktail versetzt und die Enzymreaktion durch Zugabe der Substratlösung und sofortiges Mischen gestartet. Die Proben wurden mit 15sec Abstand gestartet. Nach 10min, 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 150µl Stop-Puffer abgebrochen, die Proben wieder auf Eis gestellt und mit 750µl Wasser verdünnt. Die Proben wurden auf Dowex-Säulen gegeben, nach dem Einsickern mit 3ml Wasser gewaschen und mit 5ml Wasser auf die Aluminiumoxid-Säulen eluiert. Die Elution von den Alox-Säulen in die Szintillationsgefäße erfolgte mit 4ml 0,1M Tris/HCl pH 7,5. Zum Eluat wurden 4ml Szintillator gegeben, gut gemischt und die Proben im *Liquid Scintillation Counter* auf zwei Kanälen (^3H -Kanal, ^{32}P -Kanal) ausgezählt. Die Enzymaktivität A wurde nach folgender Formel berechnet²⁷:

$$A \left[\frac{\text{pmol}[\text{cAMP}]}{\text{mg}[\text{Protein}] \times \text{min}} \right] = \frac{\text{Substrat} [\mu\text{M}] \times 100}{\text{Zeit} [\text{min}]} \times \frac{1000}{\text{Proteinmenge} [\mu\text{g}]} \\ \times \frac{\text{cpm} [^{32}\text{P}]_{\text{Probe}} - \text{cpm} [^{32}\text{P}]_{\text{Leerwert}}}{\text{cpm} [^{32}\text{P}]_{\text{total}}} \times \frac{\text{cpm} [^3\text{H}]_{\text{total}}}{\text{cpm} [^3\text{H}]_{\text{Probe}} - 3\% [^{32}\text{P}]_{\text{Probe}}}$$

Die eingesetzten Mengen radioaktiv markierten cAMPs und ATPs wurden als sogenannte ^3H - und ^{32}P -totals direkt in der entsprechenden Menge Elutionspuffer (4ml 0,1M Tris/HCl pH 7,5) und Szintillator wie oben beschrieben ausgezählt (der ^{32}P -total wurde als 1:10-Verdünnung vermessen). Als Negativkontrolle wurde in der Regel eine Probe aus einer „Leervektor-Expression“ der jeweiligen Zellkultur verwendet.

3.11 Immunisierung von Kaninchen

Für die Gewinnung spezifischer Antikörper für die Paramecium-AC wurden zwei Kaninchen mit einem Fragment des cytosolischen, C-terminalen Enzymabschnitts immunisiert. Es handelt sich um den katalytischen Bereich, das sogenannte Fragment e (AS 524-751), welches hier als Antigen bezeichnet wird (s. S. 152).

²⁷Die Subtraktion von 3% der ^{32}P -Counts vom entsprechenden ^3H -Wert erfolgte aufgrund der Beeinflussung des ^3H -Kanals durch die Einstrahlung von ^{32}P

Expression und Reinigung des Antigens

Der katalytische Bereich (Frag. e) wurde sowohl für Versuche zur funktionellen Expression als auch für die Verwendung als Antigen in den Expressionsvektor *pQE30* einkloniert (s. Abschn. 4.4.1) und in der Zelllinie *E.coli M15 [pREP4]* exprimiert. Für die Gewinnung von Antigen wurde das Protokoll für schnelle Expression angewendet und das Produkt unter denaturierenden Bedingungen über Ni-NTA-Agarose gereinigt.

Immunisierung der Kaninchen

Die Tiere wurden mit jeweils 500µg Antigen immunisiert. Hierfür wurde das Antigen wie folgt aufbereitet.

550µg Antigen (10% Aufschlag für Verluste bei der Aufbereitung z.B. durch Adsorption an Kunststoffoberflächen), gelöst in E-Puffer der denaturierenden Reinigung, wurde mittels Ethanol-fällung am Tag der Immunisierung frisch gefällt und das feuchte Pellet in 300µl PBS im Ultraschallbad für ca. 30-60min resuspendiert. Die verwendeten Lösungen und Geräte waren steril.

Zur Verstärkung der Immunantwort wurde dem Antigen 300µg eines Lipopeptid-Adjuvans (EHAZ microcollections) beigesezt, welches aus einem Gemisch von Pam₃Cys-SK₄ und Pam₃Cys-TH besteht. Dies sind synthetische Lipopeptide, welche auf der Struktur bakterieller Lipopeptide basieren (40). Das Adjuvans wurde zu 1mg/ml in sterilem PBS im Ultraschallbad resuspendiert. Die Lagerung der Suspension für spätere Verwendungen erfolgte bei -20°C.

Vor der Injektion wurde die Immunisierungssuspension aus 500µg Antigen in 300µl PBS mit 300µg Lipopeptid-Adjuvans in 300µl PBS hergestellt und 15-30min im Ultraschallbad behandelt. Unmittelbar vor der Immunisierung der Kaninchen wurde die Mischung noch einmal durch 3maliges Auf- und Abziehen durch eine Kanüle homogenisiert. Die Immunisierungslösung wurde den Kaninchen subkutan rechts und links der Wirbelsäule injiziert. Nach jeweils 4 Wochen wurden die Kaninchen mit der gleichen Immunisierungslösung ein- bzw. zwei mal ‚geboostert‘. Nach weiteren 4 Wochen wurden die Kaninchen ausgeblutet, das Blut aufgefangen und aufgearbeitet. Um den Verlauf der Immunreaktion verfolgen zu können, wurde vor jeder Immunisierung eine Blutprobe (ca. 0,5ml) abgenommen. Die (Prä-)Immunsereen wurden folgendermaßen bezeichnet: Kaninchen 1: Anti-pAC-1.x, Kaninchen 2: Anti-pAC-2.x; x gibt die Numerierung der Seren an.

Serum-Herstellung

Das aufgefangene Blut wurde 3Std. bei RT stehen gelassen, anschließend in 50ml Zentrifugenröhrchen bei 4000xg, RT, 15min zentrifugiert und das Serum (klarer bis rötlich-klarer Überstand) vom Blutkuchen abgenommen. Es wurde in Aliquoten bei -20°C gelagert.

Die Antiseren wurden ungereinigt und gereinigt verwendet. Die Reinigung erfolgte an Protein A Sepharose (s. S. 47).

3.12 Computerunterstützte Proteinanalysen

Tabelle 11: Proteinanalysen und Datenbankvergleiche, welche als *online*-Dienste bei verschiedenen Instituten zugänglich sind.

Programm	Institut	Bemerkung
NCBI <i>blastp</i>	National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	Zugrundeliegende Datenbanken: „All non-redundant GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF“
<i>Pfam-search</i>	Sanger Center (www.sanger.ac.uk/software/pfam); Washington University in St.Louis (pfam.wustl.edu/hmmsearch/shtml); Embl Heidelberg (www.smart.embl-heidelberg.de); European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk)	Datenbank multipler Sequenz-Alignments, die viele Proteindomänen abdecken <i>Protein family database of alignments and HMMs</i> (hidden Markov Models)
<i>TopPred2</i>	Stockholm University (Theoretical Chemistry Protein Prediction Servers); Pasteur Institute (bioweb.Pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html)	Vorhersage möglicher trans-membranspannender Bereiche (<i>Topology Prediction of membrane proteins</i>)
<i>Smith/Waterman-Suche</i>	European Bioinformatics Institute (www2.ebi.ac.uk/bic_sw)	Proteindatenbankvergleich

4 Ergebnisse

4.1 Homologieklonierung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, das Gen der in diesem Labor bis 1992 bearbeiteten Adenylatcyclase aus *Paramecium* zu finden. Dies sollte durch heterologe Expressionsexperimente die Möglichkeit bieten, neue Erkenntnisse über die Regulation dieses Enzyms zu sammeln. Aus den proteinchemischen Daten war ein 96kDa großes, integrales Membranprotein zu erwarten, welches eine intrinsische K^+ -Leitfähigkeit besitzt (12).

4.1.1 Strategievarianten und PCR-Experimente

Die Strategie war, durch PCR-Experimente mit Primern, die homolog zu konservierten AC-Motiven entwickelt wurden, ein Fragment des AC-Gens zu finden, welches als Ausgangssequenz für Genbankdurchmusterungen verwendet werden konnte.

Da die Entwicklung der Primer von Aminosäuresequenzen ausging, wurden degenerierte Primer entwickelt. Der Degenerationsgrad wurde möglichst gering gehalten und überstieg mit 2 Ausnahmen eine 32-36fache Degeneration nicht. In diesem Sinne wurde auch mehrfach die Base Inosin verwendet. Bei der Primerentwicklung wurde den Besonderheiten der *Paramecium*-Codonusage Rechnung getragen. Zum einen besitzt *Paramecium* ein sehr A/T-reiches Genom (71-74%) (41). Im ParaGC-Gen liegt der A/T-Gehalt bei 67,3% (kodierende Bereiche der cDNA). Um Erkenntnisse über die Bevorzugung bestimmter Codons zu erlangen, wurde bei Bedarf das ParaGC-Gen statistisch ausgewertet (s. *Abbildung 3*). Des Weiteren mußte der Ciliatencode angewendet werden, der in den Codons TAA und TAG (41), welche in *Paramecium* für Glutamin kodieren, vom universellen Code abweicht (Stop-Codons). Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschn. 2.3.2 aufgelistet.

Genomische DNA aus *Paramecium* besitzt wenige, kurze Introns von 20-33bp Länge, die von den Nukleotiden GT... ..AG flankiert werden und A/T-reicher sind als codierende Genombereiche (42). Diese Tatsache ließ die Verwendung genomischer DNA als Matrize in den PCRn zu, da deren Erkennung als mögliche Introns keine Schwierigkeiten bereiten sollte. In 300-400bp großen gDNA-Fragmenten waren ca. 0-3 Introns zu erwarten. Auf die aufwendigere Gewinnung von cDNA konnte so verzichtet werden. Gefundene, vermeintliche AC-Teilsequenzen wurden vor Durchführung von Genbankscreens durch PCR an cDNA (vorhandene Genbank) verifiziert und auf Introns untersucht.

Das PCR-Programm war auf die Verwendung degenerierter Primer abgestimmt und sollte Fehlpaarungen bei der Primeranlagerung ermöglichen und unterstützen. (Vorzyklen mit Temperatur-Rampe zur Primeranlagerung, z.T. erhöhte Mg^{2+} -Konzentrationen) (s S. 34).

Codonusage:														
gca	Ala(A)	31	#	cag	Gln(Q)	10	#	cuu	Leu(L)	29	#	ucu	Ser(S)	34
gcc	Ala(A)	19	#	uaa	Gln(Q)	70	#	uua	Leu(L)	91	#	---	Ser(S)	171
gcg	Ala(A)	6	#	uag	Gln(Q)	31	#	uug	Leu(L)	102	#	uga	Ter(.)	1
gcu	Ala(A)	26	#	---	Gln(Q)	171	#	---	Leu(L)	288	#	---	Ter(.)	1
---	Ala(A)	82	#	gaa	Glu(E)	93	#	aaa	Lys(K)	98	#	aca	Thr(T)	24
aga	Arg(R)	67	#	gag	Glu(E)	41	#	aag	Lys(K)	72	#	acc	Thr(T)	11
agg	Arg(R)	16	#	---	Glu(E)	134	#	---	Lys(K)	170	#	acg	Thr(T)	7
cga	Arg(R)	8	#	gga	Gly(G)	45	#	aug	Met(M)	54	#	acu	Thr(T)	51
cgc	Arg(R)	3	#	ggc	Gly(G)	11	#	---	Met(M)	54	#	---	Thr(T)	93
cgg	Arg(R)	2	#	ggg	Gly(G)	15	#	uuc	Phe(F)	66	#	ugg	Trp(W)	12
cgu	Arg(R)	5	#	ggu	Gly(G)	25	#	uuu	Phe(F)	83	#	---	Trp(W)	12
---	Arg(R)	101	#	---	Gly(G)	96	#	---	Phe(F)	149	#	uac	Tyr(Y)	42
aac	Asn(N)	36	#	cac	His(H)	13	#	cca	Pro(P)	23	#	uau	Tyr(Y)	85
aau	Asn(N)	116	#	cau	His(H)	46	#	ccc	Pro(P)	9	#	---	Tyr(Y)	127
---	Asn(N)	152	#	---	His(H)	59	#	ccg	Pro(P)	3	#	gua	Val(V)	30
gac	Asp(D)	23	#	aua	Ile(I)	60	#	ccu	Pro(P)	22	#	guc	Val(V)	34
gau	Asp(D)	97	#	auc	Ile(I)	67	#	---	Pro(P)	57	#	gug	Val(V)	42
---	Asp(D)	120	#	auu	Ile(I)	93	#	agc	Ser(S)	14	#	guu	Val(V)	38
ugc	Cys(C)	16	#	---	Ile(I)	220	#	agu	Ser(S)	47	#	---	Val(V)	144
ugu	Cys(C)	17	#	cua	Leu(L)	21	#	uca	Ser(S)	42	#	nnn	???(X)	0
---	Cys(C)	33	#	cuc	Leu(L)	25	#	ucc	Ser(S)	21	#	TOTAL		2434
caa	Gln(Q)	60	#	cug	Leu(L)	20	#	ucg	Ser(S)	13	#			
Total number of bases translated is 7302														
% A+T = 67.45		[4925]												
% C+G = 32.55		[2377]												

Abbildung 3: DNA-Statistik der ParaGC cDNA. Es wurde ausschließlich der kodierende Bereich ausgewertet. Erstellt wurde die Statistik mit *EditSeq* (DNA-Star).

Strategievarianten

In den Primern spiegeln sich die verschiedenen Strategievarianten wieder. Sie wurden anhand der Klassifizierung bekannter Adenylatcyclasen und deren Konsensussequenzen entwickelt.

Aufgrund von Sequenz- und Strukturähnlichkeiten werden 4 Klassen von Adenylatcyclasen unterschieden. Siehe hierzu Abschn. 5.1.1. Die ausgefallene Topologie der Paramecium-Guanylatcyclase wies darauf hin, daß die AC möglicherweise ebenfalls eine neue Form darstellt. Sie konnte allen bisher bekannten AC-Klassen angehören. Die Klassen der ACn mit nur einem Vertreter (*Aer.hy.AC2*, *Pre.ru.AC*) waren aus dem Klonierungsverfahren ausgenommen, da Konservierungen in der Primärstruktur nicht bekannt waren. Ebenso wurde kein Versuch unternommen, eine Klasse I-AC zu fischen. Die Klonierungsstrategien wurden in Zusammenarbeit mit Jürgen Linder erdacht und konzentrierten sich auf ACn der Klassen III. Nachdem diese Ansätze zunächst erfolglos blieben, wurde ein Versuch unternommen eine Klasse II-AC zu finden. Insbesondere bei der Suche nach Klasse III-ACn war aufgrund der klasseninternen Divergenzen (vgl. Abschn. 5.1.1) auch in konservierten Proteinbereichen die Eingrenzung des

möglichen nächstverwandten Nachbarn wichtig. Letztendlich war ein Ansatz erfolgreich, der Klasse III-ACn einiger bakterieller Vertreter und niederer Eukaryoten als Vorbild verwendete. Während der gesamten Suche nach einem AC-Fragment wurden ca. 227 PCR-Produkte sequenziert, woraus ca. 80 verschiedene Sequenzen resultierten. In den folgenden zwei Tabellen sind die PCR-Produkte aufgezählt, die im Datenbankvergleich signifikante Ähnlichkeit zu einem bekannten Protein zeigten oder Isoformen der ParaGC darstellen. Die Ansätze der verschiedenen Strategievarianten werden im Anschluß an die Tabellen chronologisch aufgeführt.

Tabelle 12: Ergebnisse der verschiedenen Strategievarianten der AC-Suche (non-GC-Isoformen): in dieser Tabelle wurden alle Sequenzen zusammengefaßt, welche im Datenbankvergleich (*blastx*) signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen zeigten. Darüber hinaus wurden zwei Sequenzen aufgenommen, die bei der nachfolgenden Genbankdurchmusterung und bei der Bestimmung des Startcodons gefunden wurden. In den Genbankvergleich wurden die Nukleotidsequenzen der PCR-Fragmente ohne Primersequenzen eingesetzt. Es wurde ein *blastx-search* durchgeführt, d.h. die Proteinsequenzen aus den Übersetzungen der Nukleinsäuresequenz in allen 6 Leserahmen wurden mit einer Proteindatenbank verglichen. Die *blast-searches* wurden beim National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) durchgeführt. Die zugrundeliegenden Proteindatenbanken waren: „All non-redundant GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF“. Für die genauen *blast-search*-Ergebnisse und Alignments siehe Abschn. 7.1.

Ansatz	Primerpaar	Bezeichnung Klon, (Accession-Nr.)	Ähnlichkeit zu	Bemerkung
1	CIIIAC1-s CIIIAC1-as	hy-1_r43a18006 (AJ487275)	Verwandtschaft zu GTP-bindenden <i>ras</i> -Proteinen und <i>ras</i> -ähnlichen Proteinen	Der Ähnlichkeitsvermittelnde Genabschnitt umfaßt nur 104bp. Im <i>Pfam</i> -search mit dem korrespondierenden Peptid: kein positives Ergebnis.
		hy-2_r43a30007 (AJ487276)	Starke Ähnlichkeit zu V-Typ-ATPasen (H ⁺ -ATPasen, vakuolär)	
4	CIIAC1a-s CIIAC1a-as	hy-3_11a245004 (AJ487277)	Geringe Ähnlichkeit zu einem Hexose-Transporter aus <i>Pla.fa.</i> ²⁸	s/as-Primer-Produkt
	CIIAC1a-s CIIAC1b-as	hy-4_11b250001 (AJ487278)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu Signal Recognition Partikels 54kDa-Untereinheit (SRP54) unterschiedlicher Organismen	as/as-Primer-Produkt
		hy-5_11b250002 (AJ487279)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu verschiedenen Proteinkinasen unterschiedlicher Spezies. (Isoform zu Ca ²⁺ -abhängige Prot.kinase b, <i>P.tet.</i>)	s/s-Primer-Produkt Hohe Signifikanz zu <i>Pla.fa.</i>

²⁸ *Pla.fa.*: *Plasmodium falciparum*

		hy-6_11b250005 (AJ487280)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu verschiedenen Oxidoreduktasen und verschiedenen hypothetischen Proteinen.	s/s- Primer-Produkt
		hy-7_11b235002 (AJ487281)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu verschiedenen Proteinkinasen unterschiedlicher Spezies.	s/s- Primer-Produkt
	CIIAC1b-s CIIAC1a-as	hy-8_13a250005 (AJ487282)	Signifikante Ähnlichkeit zu einem Genprodukt von <i>Dro.me.</i>	s/s- Primer-Produkt
	CIIAC1b-s CIIAC1b-as	hy-9_13b236005 (AJ487283)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu Sperma-assoziiertem Antigen 6, zu PF16 und zu mutmaßlichen Axonema Zentralapparat-Proteinen	as/as- Primer-Produkt
	CIIAC1c-s CIIAC1b-as	hy-10_15b145025 (AJ487284)	Signifikante Ähnlichkeiten zu konservierten hypothetischen Proteinen; hauptsächlich bakterieller Art	s/s- Primer-Produkt
	CIIAC1c-s CIIAC1d-as	hy-11_16b150013 (AJ487285)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu verschiedenen Proteinkinasen unterschiedlicher Spezies.	(Höchste Signifikanz zu <i>Pla.fa.</i>) as/as- Primer-Produkt
	CIIAC1d-s CIIAC1a-as	hy-12_17a150017 (AJ487286)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu TATA-binding protein-interacting-protein 49 (TIP49) und zu RuvB (DNA-Helicase); Pontin52;	s/as- Primer-Produkt RuvB besitzt ATPase-Aktivität
5	CIIIbAC1-s ?-as	hy-13_20235003 (AJ487287)	Signifikante Ähnlichkeit zu Proteinkinasen verschiedener Spezies; insbesondere zu Phosphorylase-Kinasen	(Höchste Signifikanz zu <i>Pla.fa.</i>) s/s- Primer-Produkt
		hy-14_20240016 (AJ487288)	(Hoch)signifikante Ähnlichkeit zu humanem adult brain protein 239, zu humanen ORFs und zu Genprodukten von <i>Cae.el.</i>	s/s- Primer-Produkt
		hy-15_20240017 (AJ487289)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu einem humanen hypothetischen Protein und einem Genprodukt aus <i>Cae.el.</i>	s/as- Primer-Produkt
	CIIIbAC1-s CIIIbAC1-as	hy-16_12169804 (AJ487290)	(Hoch)signifikante Ähnlichkeiten zu unterschiedlichen Proteinen, u.a. TIP elongation aberrant protein, Rab9 Effektor p40, host cell Faktoren, Phosphoprotein Phosphatase	as/as- Primer-Produkt
	genomischer Genbankscreen	hy-17_if-1-1a (AJ487291)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu Histon H4	genomische DNA
	pACAnfg-s1 pACAnfg-as1	0419990 (<i>upstr.-message</i>) (AJ487292)	Hochsignifikante Ähnlichkeit zu myb-like DNA-binding Proteinen	cDNA-PCR-Fragment

Tabelle 13: GC-Isoformen: in dieser Tabelle sind sämtliche bei der AC-Suche gefundenen Isoformen der ParaGC aufgeführt, sowohl bekannte, als auch neue. „Echte Isoformen“ (s. Abschn. 5.1.1.1) wurden als solche gekennzeichnet.

Ansatz	Primerpaar	Bezeichnung Klon, (Accession-Nr)	Isoform-Nr.	Bemerkung	Echte Isoform	
2	s2 CIIIAC1-as	6328004 (AJ487292)	GC-Isof. a C _{2a-like} -Dom.	Block IV-Motiv GDTVNTT	G-0	
3	CIIIAC2-s CIIIAC2-as	7136005	Para-GC C _{1a-like} -Dom.	besitzt ebenfalls Intron3 der ParaGC ²⁹		
		7236001 (AJ487300)	GC-Isof. b C _{1a-like} -Dom.		G-7	
		7236002 (AJ487298)	GC-Isof. c C _{1a-like} -Dom.		G-5	
		7236005 (AJ487296)	GC-Isof. d C _{1a-like} -Dom.		G-3	
		7236006 (AJ487272)	GC-Isof. e C _{1a-like} -Dom.	wahrscheinliches Intron: bp 190-211	G-9	
		7236011 (AJ487297)	GC-Isof. f C _{1a-like} -Dom.		G-4	
	CIIIAC2-s CIIIAC3-as	9104	Para-GC C _{1a-like} -Dom.			
		9107 (AJ487294)	GC-Isof. g C _{1a-like} -Dom.	Proteinebene: 2 AS-Austausche zu ParaGC in 89 AS ³⁰ ; DNA-Ebene: 32 Basen-Aust. in 266bp	G-1	
		9106b	GC-Isof. e C _{1a-like} -Dom.	Intron		
		9103b (AJ487273)	GC-Isof. h C _{1a-like} -Dom.	Intron: bp190-217; entspricht gleiche Stelle des Gens wie bei Klon 7236006, aber unterschiedliche Isoformen!	G-10a	
		9111	GC-Isof. d C _{1a-like} -Dom.			
		9308 (AJ487295)	GC-Isof. j C _{1a-like} -Dom.		G-2	
		9101 (AJ487299)	GC-Isof. k C _{1a-like} -Dom.		G-6	
		9103a (AJ487301)	GC-Isof. l C _{1a-like} -Dom.		G-8	
	CIIIAC3-s CIIIAC2-as	10102	Para-GC C _{1a-like} -Dom.	ParaGC-Intron3 (s.o.)		
		10101	GC-Isof. b C _{1a-like} -Dom.	(s. 7236001)		
		10106	GC-Isof. c C _{1a-like} -Dom.	(s. 7236002)		

²⁹ Die ParaGC-Sequenz wurde veröffentlicht bei Linder (13) (CAB44361)

³⁰ Der Konsensus zwischen Paramecium-GC und diesem Klon ist ohne die korrespondierenden Primerbereiche 89 Aminosäuren lang. Auch die Längenangabe des DNA-Konsensus ist ohne Primer zu verstehen.

	10129	GC-Isolf. <i>d</i> C _{1a-like} -Dom.	(s. 9111) verlängert die Seq. dieser Isolf. bis Block IV	
	10313 (AJ487274)	GC-Isolf. <i>h</i> C _{1a-like} -Dom.	(s. 9103b) verlängert die Seq. dieser Isolf. bis Block IV	G-10b
CIIIAC2-s CIIIAC3b-as	19111	GC-Isolf. <i>l</i> C _{1a-like} -Dom.	(s. 9103a)	
	19105	GC-Isolf. <i>l'</i> C _{1a-like} -Dom.	Im Vergleich zu Seq. 9103a (bestätigt durch 19111) bestehen 2 Basenaustausche, die zu 2 AS-Austauschen führen	
	19115	GC-Isolf. <i>m</i> C _{1a-like} -Dom.	Nahe Verwandt zu 9103a: 7-9 Basenaustausche in 259bp, 6-8 AS-Austausche in 85 AS ³¹	
	19110	GC-Isolf. <i>k</i> C _{1a-like} -Dom.	(s. 9101)	
	19108	GC-Isolf. <i>d'</i> C _{1a-like} -Dom.	Im Vergleich zu Seq. 9111 (bes- tätigt durch 10129) bestehen 2 Basenaustausche, wovon einer zu einem AS-Austausch führt.	

Ansatz 1 war der erste von 4 Ansätzen, die sich mit der Suche nach Klasse III-AC_n beschäftigten. Diese Klasse umfaßt Cyclasen phylogenetisch weit entfernter Arten (Prokaryoten, niedere und hohe Eukaryoten) (s. Abschn. 5.1.1), welche gemeinsame Konsensussequenzen in ihren Cyclase-katalytischen Domänen besitzen. Es gibt vier konservierte Aminosäuremotive (Konsensusblöcke I-IV), die an der Katalyse beteiligt sind (vgl. Abschn. 7.2.1 *Klasse III-Cyclase Alignment*). Cyclasen der Klasse III funktionieren als Dimere. Mit Ausnahme der löslichen GC_n und der (natürlich verknüpften) C₁- und C₂-Schleifen der 2x 6TM-AC_n, welche ihre katalytische Aktivität als Heterodimere entfalten, geht man davon aus, daß Klasse III-AC_n Homodimere bilden.

Ansatz 1 verfolgte die Idee, die gesuchte AC sei eine homodimere Klasse III-AC, homolog einiger prokaryotischer AC_n dieser Klasse. Diese Idee entwickelte sich aus der Hypothese zur evolutionären Entstehung von mammalia-AC_n, die in Hinblick auf die ParaGC-Topologie aufgestellt wurden (1): Die Tatsache, daß die ParaGC die Topologie von mammalia AC_n mit verdrehten cytosolischen AC-Domänen besitzt, läßt vermuten, es habe eine AC mit einem Membrananker und einer katalytischen Domäne als Vorläufer existiert, wie sie in einigen Prokaryoten noch vorkommt. Durch Genverdopplung und anschließende Mutationen in den AC-Domänen konnten zwei Monomeren entstehen, die als Heterodimer Cyclase-katalytisch aktiv wurden. Die folgende Fusionierung zu einem Molekül erfolgte in unterschiedlicher Reihenfolge, so daß 2x 6TM-Cyclasen mit unterschiedlicher Anordnung der cytosolischen Schleifen entstanden. Die Änderung der Substratspezifität zu einer GC konnte durch wenige Punktmutationen geschehen, da nur 3 Aminosäureaustausche diesen Spezifitätswechsel vermitteln (17, 18). Der Gedanke war, daß in Paramecium möglicherweise eine AC des hypothetische Vorläufertyps vorkommt. Die Entwicklung der Primer wurde unter den homodimeren AC_n stark an der *Bre.li.*-

³¹ Die Angaben der DNA-Fragment- bzw. Peptidlänge verstehen sich ohne Primerbereiche.

AC ausgerichtet, da diese zu Beginn des konservierten Blocks IV die Aminosäure-Sequenz DIYGP (AS 334-338) besitzt. In der *Bre.li.*-AC sollte das D eine der Substratspezifität vermittelnden Aminosäuren sein, in der ParaGC befindet sich die identische Sequenz in der mutmaßlich nicht-katalytischen Tasche. Nahe verwandt bezüglich dieses Motivs sind die Hefe-ACn. Für diesen Ansatz wurden die Primer CIIIAC1-s und CIIIAC1-as mit den korrespondierenden Aminosäuresequenzen VKTIG(D/E) (Block II) und GPTVN(V/M)A (Block IV) entworfen. Ausgehend von bekannten ACn, wurde ein Produkt von 190-450bp (inklusive 3 Introns) erwartet. Erst unter PCR-Bedingungen mit erhöhten Mg^{2+} -Konzentrationen (2,5mM und 3,5mM) und nach Nachamplifikation der PCR-Ansätze, durch Verwendung einer kleinen Menge des ersten PCR-Ansatzes als Matrize in einer neuen PCR, konnten Produkte in erwarteter Größe erhalten werden. 3 Produktbänden wurden kloniert und hiervon insgesamt 32 Klone sequenziert. Es wurden 9 verschiedene Sequenzen gefunden, unter welchen sich eine Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zu einer V-Typ-ATPase und eine Sequenz mit Ähnlichkeiten zu *Ras-like* Proteinen befand (s. *Tabelle 12*).

In **Ansatz 2** wurde ebenfalls nach einer Klasse III-AC gesucht. Die hohe Ähnlichkeit der ParaGC zu den mammalia ACn sowohl in topologischer Hinsicht, als auch auf Aminosäureebene in den konservierten Bereichen und deren Kontext, warf die Frage auf, ob möglicherweise eine AC des Säuger-Typs in Paramecium vorkommt, aus welcher die GC durch wenige Mutationen hervorgegangen ist. Es wurden Primer entwickelt, die der ParaGC homolog waren und ermöglichen sollten, neben GC-Sequenzen auch eine sehr nahe stehende AC-Sequenz zu fischen. Für die PCRn wurden die zwei sense-Primer s1 (EKIKTVG) und s2 (KTYMAA) (beide homolog zu Block II) jeweils in Kombination mit dem antisense-Primer CIIIAC1-as (GPTVN(V/M)A) (Block IV) eingesetzt. Die sense-Primer s1 und s2 waren nicht degeneriert und wurden von Jürgen Linder (13) übernommen. Ihre Sequenzen entsprachen der $C_{2a-like}$ -Schleife der ParaGC und sind den entsprechenden mammalia AC Motiven sehr ähnlich. Zu erwarten war, wie bei Ansatz 1, ein Produkt von rund 190-450bp. Die PCR mit dem s1-Primer führte erst durch eine sogenannte *nested*-PCR zu verwertbaren Produktbänden. Hierfür wurde ein Aliquot der ersten PCR als Matrize in eine neue PCR mit dem ‚*downstream*‘ des s1-Primers liegenden s2-Primer und dem oben genannten antisense-Primer durchgeführt. Aus diesem Ansatz wurde eine Produktbande kloniert und sequenziert (5 Klone), jedoch wurde kein AC-Fragment oder eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen gefunden. Aus der PCR mit dem s2-Primer gingen drei Produktbänden hervor, die kloniert wurden. Zur Sequenzierung gelangten 6 Klone, worunter sich eine neue Isoform zur ParaGC mit der Block IV-Konsensussequenz GDTVNTT in der $C_{2a-like}$ -Schleife befand (s. *Tabelle 13*). Der verwendete antisense-Primer sollte zu diesem Konsensusmotiv komplementär sein, hatte jedoch einige Basen *downstream* gebunden.

In **Ansatz 3** wurde mit der Suche nach Klasse III-ACn fortgefahren. Es wurden verschiedene Primerpaare verwendet, die wiederum sehr nahe an der ParaGC-Sequenz angelehnt waren und auf verschiedene Klasse III-ACn paßten. Der Ansatz umfaßte vier PCR-Ansätze.

In der ersten PCR wurde das Primerpaar CIIIAC2-s/CIIIAC2-as eingesetzt. Der sense-Primer kodiert für das Motiv DIAGFT des Konsensus-Blocks I. Die Aminosäuresequenz DIAGFT (Block I) wurde entsprechend der ParaGC gewählt und stimmt mit der der *Dic.di.CyaG* überein. Sowohl zu mammalia ACn- C_{1a} (Konsensus DIVGFT) als auch zu den ACn *Rhi.me.Cya1* (DIYDFT) und *Sti.au.CyaA* (DIRDFT) bestehen Ähnlichkeiten. Die Sequenz des antisense-Primers war DIYGP(D/E) (Block IV). Sie entspricht ebenfalls der ParaGC-Sequenz und besitzt Ähnlichkeiten zum entsprechenden Motiv der ACn von *Bre.li.* (DIYGPT) und *Sch.po.*

(DYYGPV). Kloniert wurde ein prominentes PCR-Produkt im gesuchten Größenbereich (300-550bp). Aus 23 sequenzierten Klonen gingen 5 Teilgene verschiedener ParaGC-Isoformen hervor und ein Ausschnitt der ParaGC-Sequenz selbst. Siehe *Tabelle 13*.

Die zweite PCR dieses Ansatzes wurde durchgeführt mit dem oben erwähnten sense-Primer CIIIAC2-s (DIAGFT) und dem antisense-Primer CIIIAC3-as. Die Sequenz des letzteren Primers kodiert für R(I/M)GVHTG, ein Motiv des Konsensusblocks III (ebenfalls mammalia C_{1a}-Schleife). Verwandte Sequenzmotive kommen u.a. vor bei ParaGC (identisch), Säuger-ACn (Konsensus: RVGIHSG), Hefe-ACn (Konsensus: RMGVHWG), *Try.br.AC* (RVGIHTG), *Sti.au.CyaA* (GVGVHTG) und *Rhi.me.Cya1* (RFGIHTG). Die PCRn brachten im erwarteten Größenbereich von 250-400bp u.a. eine dominante Bande hervor, die kloniert wurde. Die Sequenzanalyse (24 Klone) führte zu 8 Sequenzen mit Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen: die Sequenz der ParaGC selbst und 7 GC-Isoformen, einige davon wurden bereits in der ersten PCR dieses Ansatzes gefunden (s. *Tabelle 13*).

In der dritten PCR wurden die Primer CIIIAC3-s und CIIIAC2-as (DIYGP(D/E)) kombiniert. Letzterer ist bereits bei der zweiten PCR dieses Ansatzes beschrieben. Der sense-Primer entstand durch Rückschluß von der Aminosäuresequenz TIGDCY aus Konsensusregion II. Ähnliche Aminosäuremuster findet man zum Beispiel in den ACn von *Bre.li.* und der Säuger. Die PCR ergab (u.a.) im gesuchten Bereich von 170-400bp eine starke, nicht vollständig trennbare Doppelbande, die kloniert wurde. Sequenziert wurden 18 Klone, welche anhand unterschiedlichen Laufverhaltens nach dem Kontrollverdau ausgewählt wurden. Sie konnten in 8 unterschiedliche Sequenzen eingeteilt werden. Es wurden erneut GCn amplifiziert: sowohl die eigentliche ParaGC, als auch 4 Isoformen, die bereits aus den vorhergehenden PCRn bekannt waren (vgl. *Tabelle 13*).

Bei der vierten PCR dieses Ansatzes wurden die Primer CIIIAC2-s (DIAGFT) und CIIIAC3b-as kombiniert. Zu DIAGFT ähnliche Motive unter den Klasse III-ACn wurden bereits für die erste PCR des Ansatzes hinlänglich beschrieben. Die korrespondierende Aminosäuresequenz des antisense-Primers lautet RVGIHT. Sie ist eine Variation des CIIIAC3-as Primers und besitzt im Vergleich zu diesem erhöhte Ähnlichkeiten zu Säuger-ACn, *Dic.di.CyaG*, *Rhi.me.Cya1* und *Try.br.AC* (identisch). Ein DNA-Fragment zwischen den Konsensusblöcken I und III sollte 250-400bp lang sein. In diese (sowie in die letzte, zum Erfolg führende) PCR-Reaktion wurde eine neue Charge frisch isolierter genomischer DNA (Anita Schultz) eingesetzt. Das gelelektrophoretische Produktbandenmuster unterschied sich nicht von dem der vorherigen Präparation. Eine prominente Bande wurde kloniert und sequenziert (16 Klone). Unter den Produkten befanden sich 4 GC-Sequenzen, wovon 2 identisch zu Isoformen aus vorhergehenden PCR-Reaktionen waren.

Teilweise parallel zu Ansatz 3 wurde **Ansatz 4** durchgeführt. Mit dieser Strategievariante wurde der Versuch unternommen, eine AC der Klasse II zu finden. Ihre (volle) Aktivität setzt die Anwesenheit eukaryotischer Aktivatoren voraus, es war also nicht auszuschließen, daß diese Gene ebenso in Eukaryoten vorkommen. Für die Entwicklung von Primern für den Homologieklonierungsversuch kamen nur 2 Sequenzabschnitte in Frage, die zwischen den drei bekannten Vertretern (*Bac.an. (EF)*, *Bor.pe. (CyaA)*, *Pseu.ae. (ExoY)*)³² hochkonserviert sind.

³² *Bac.an.*: *Bacillus anthracis*; *Bor.pe.*: *Bordetella pertussis*; *Pseu.ae.*: *Pseudomonas aeruginosa*

Bacan:	TNLIKSCVATKGLNVHCKSSDWGVPVAGYIPFDQLSKKHGQQLA-VEKG-NLENKKSITE:	393
Borpe:	TSLIAEAGVATKGLGVHAKSSDWGLQAGYIPVNPNLKLFGRAPVILARADNDVNSSLA-H:	106
Pseae:	TTLLEEFCFPTKGFVSKGKSSNWGPQAGFICVDQHLKREDRDTAEIRKL-NLAVAKGMDG:	129
	KSS ^N _D WG	
Bacan:	HEGEIGKIPKLDHILRI-EELKENGIIKKGKKEIDNGKKYYLLESNNQVYEFRI SDENNE:	452
Borpe:	G-HTAVDITLSKERL-DYLRQAGLVTGMADGV--VASNHAGYEQF-----EFRVKETS DG:	157
Pseae:	GAYTQTDLRISRQRLAELVRNFGLV---ADGVGPVR-LLTAQGPSGKR-YEFEARQEADG:	184
Bacan:	---VQYKTKEGKITVLGKFNWRNI ^E V---MAKNVEGV ^L KPLTADYDLFALAP--:	499
Borpe:	RYAVQYRRKGG-DDF-----EAVKVI ^G -NAAGI--PLTADIDMFAIMP--:	196
Pseae:	L---YRISR-----LGRS-----EAVQV ^L AS ^P ACGL--AMTADYDLFLVAP--:	220
	TADYDLF I	

Abbildung 4: Alignment der Klasse II Adenylatcyclasen (für die Homologieklonierung relevanter Ausschnitt) *Bac.an.* (*EF*) (A07289), *Bor.pe.* (*CyaA*) (A07292), *Pse.ae.* (*ExoY*) (F061745)

Die sense-Primer kodierten für KSS(D/N)WG. Für diese Sequenz wurden 4 verschiedene Oligonukleotide entwickelt, die berücksichtigten, daß Serin durch 6 verschiedene Codons kodiert wird: TCN und AG(T/C). In den vier Primern wurden für die zwei Serine des Aminosäuremotivs die degenerierten Codons TC(AT) und AG(T/C) in all ihren möglichen Kombinationen eingesetzt ($2^2 = 4$ alternative Primersequenzen). Sie wurden mit CIIAC1a-, CIIAC1b-, CIIAC1c-, CIIAC1d-s bezeichnet. Die antisense-Primer wurden korrespondierend zu den Motiven TADYDLF und TADIDLF entwickelt. Hieraus resultierten je Motiv 2 alternative Oligonukleotidsequenzen, die sich im Grad der Degeneration unterschieden (TADYDLF: CIIAC1a-, CIIAC1b-; TADIDLF: CIIAC1c-, CIIAC1d-as). In den PCRn dieses Ansatzes wurden alle 4 sense-Primer mit allen 4 antisense-Primern kombiniert, d.h. es wurden 16 PCRn durchgeführt. Die Länge des zu erwartenden DNA-Fragments konnte wegen der geringen Anzahl bekannter ACn dieser Klasse nur grob abgeschätzt werden. Zwischen den Primer-homologen Motiven besitzt die *Bac.an.* AC 142AS, die *Bor.pe.* AC 127AS und die *Pse.ae.* AC 126AS; für das PCR-Produkt aus genomischer DNA (Introns!) aus *Paramecium* ist folglich eine Länge von ca. 350-500bp zu erwarten. Aus den 16 PCRn wurden 25 Produktbänder im Größenbereich von 200-600bp kloniert. 80 Klone wurden einer Sequenzanalyse zugeführt (durch *Doppelinserts* resultierten 82 Sequenzen).

Letztlich konnten 28 verschiedene Produkte ermittelt werden. Bemerkenswert war der hohe Anteil von PCR-Produkten, die durch Anlagerung nur eines der beiden Primer sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende entstanden. Diese Sequenzen werden im Folgenden als sense/sense- bzw. antisense/antisense-Primer-Produkte bezeichnet. Unter 11 regulären sense/antisense-Primer-Produkten befand sich eine Sequenz mit hochsignifikanter Ähnlichkeiten zu TATA-binding protein-interacting protein (TBP-interacting protein = TIP) bzw. dem bakteriellen Ortholog RuvB (eine DNA-Helicase) und eine Sequenz mit Ähnlichkeiten zu Monosaccharid-Transportern. Unter den 5 sense/sense-Primer-Produkten ließen sich zwei voneinander unabhängige Sequenzen durch einen *blastx-search* als mutmaßliche Proteinkinasen ermitteln. Ein Produkt besitzt signifikante Ähnlichkeit zu einem Genprodukt aus *Dro.me.*. Von den beiden verbleibenden PCR-Produkten besitzt eines hohe Ähnlichkeiten zu verschiedenen Oxidoreduktasen, das andere zu hauptsächlich bakteriellen, konservierten, hypothetischen Proteinen. Es

konnten 8 verschiedene antisense/antisense-Primer-Produkte identifiziert werden. Hierunter wurde eine Sequenz mit einer sehr hohen Ähnlichkeit zu verschiedenen Proteinkinasen gefunden; eine Sequenz mit ebenfalls sehr hoher Ähnlichkeit zu Signal Recognition Partikels, 54kDa Untereinheit; eine weitere Sequenz zeigte hochsignifikante Verwandtschaft zu Sperma-assoziiertem Antigen 6, PF16, mutmaßlichen Axonema Zentralapparat Proteinen. Eine Aufstellung der Produkte mit Ähnlichkeiten zu Datenbankproteinen ist in *Tabelle 12* zu finden.

Ansatz 5 lag die neue Erkenntnis zugrunde, daß der Protozoe *Plasmodium falciparum* vermutlich eine Guanylatcyclase vom Typ der ParaGC besitzt (1). Im Malaria-Genomprojekt wurde ein entsprechender ORF gefunden. Die GC zeigt ebenfalls den mammalia AC-typischen Aufbau mit 2x 6TM und zwei daran aufgehängten cytosolischen Schleifen, welche die katalytischen Domänen tragen. Wie bereits bei der ParaGC sind auch hier die Schleifen im Vergleich zu Säuger-ACn invertiert. Darüber hinaus ist die N-terminale, P-Typ-ATPase-ähnliche Domäne im ORF vorhanden. Der Schluß lag nahe, daß auch die Adenylyl cyclasen der beiden Protozoen nahe verwandt sind. Eine Datenbanksuche (Jürgen Linder) im Malaria-Genomprojekt mit verschiedenen AC-Sequenzen führte zu kurzen Klasse III-AC Konsensussequenzen, die eine starke Ähnlichkeit zu bakteriellen, homodimeren ACn aufwiesen (vgl. Abschn. 7.2.1 *Klasse III-Cyclase Alignment*, 7.2.2 *Alignment der Klasse III-ACn vom cyanobakteriellen Typ*). Diese Erkenntnisse ermöglichten die Eingrenzung der mutmaßlich nächstverwandten Nachbarn der gesuchten Paramecium-AC auf die bakteriellen ACn *Sti.au.CyaA*, *Sti.au.CyaB*, *Rhi.me.Cya1* und die AC CyaG des niederen Eukaryoten *Dic.di.*

PlafaAC	:	DIRNFT					VNIASR
RhimeAC	:	DIYDFT:	9	--//----			VNVASR: 129
StiauCyaA	:	DIRDFT:	239	--//----			VNLASR: 360
StiauCyaB	:	DIRNFT:	176	--//----			VNVASR: 304
DicdiCyaG	:	DIAGFT:	406	--//----			VNVASR: 524
					Block I		Block IV

Abbildung 5: Konsensus-Sequenzen zwischen den mutmaßlichen *Pla.fa.* AC-Fragmenten und homodimeren Klasse III-ACn. *PlafaAC*: *Plasmodium falciparum* mutmaßliche AC-Fragmente; *RhimeCya1*: *Rhizobium meliloti* Cya1; *StiauCyaA/CyaB*: *Stigmatella aurantiaca* CyaA/CyaB; *DicdiCyaG*: *Dictyostelium discoideum* CyaG

Die erste PCR dieses Ansatzes wurde mit den Primern CIIIbAC1-s (DIR(N/D)FT) und CIIIbAC1-as (VN(I/M/V)AS(R/S)) durchgeführt. Während der Sequenzierung stellte sich heraus, daß die antisense-Primerlieferung ein falsches Oligonukleotid enthielt. Der Versuch wird hier trotzdem aufgenommen, da die Produkte signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufweisen. Als Matrize diente die frische Präparation genomischer DNA (vgl. vierte PCR, Ansatz 3). Es wurden 2 Produktbanden im erwarteten Größenbereich kloniert und der Sequenzanalyse unterzogen, wobei sich die Fehlerhaftigkeit des antisense-Primers herausstellte. Neben sense/antisense-Primer-Produkt mit Ähnlichkeit zu hypothetischen Proteinen von *Homo sapiens* und *Caenorhabditis elegans*, tauchten sense/sense-Primer-Produkte auf, darunter ein Klon mit Ähnlichkeit zu verschiedenen Proteinkinasen. Ein weiteres Produkt besaß signifikante Verwandtschaft zu dem humanen adult brain protein 239 und ORFs/Genprodukten von *Homo sapiens* und *Cae.el.* Die Produkte dieses PCR-Experiments sind ebenfalls in *Tabelle 12* aufgeführt.

Die PCR wurde mit einer neuen Lieferung des as-Primers wiederholt. Aus diesem Ansatz wurden 2 Produktbanden für die Klonierung gewonnen. Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden für die Sequenzierung mit einer sterilen Spitze von der Agarplatte gepickt, in 1x Reaktionspuffer der *taq*-Polymerase gespült und 15min bei 95°C erhitzt. Durch eine Standard-PCR mit u- und r-Primer wurden die *Inserts* der Klone amplifiziert und als Matrize für die folgende Sequenzierreaktion verwendet. Diese Klone standen also nicht in Form von Plasmid-Präparationen zur Verfügung. Die Sequenzen von 9 Klonen konnte 5 verschiedenen Produkten zugeordnet werden, darunter ein Klon, der die gesuchte Teilsequenz einer AC darstellt (s.u.). Nebenprodukt dieses Ansatzes war eine Sequenz, die Verwandtschaften zu einer sehr heterogenen Gruppe von Proteinen besitzt, u.a. host cell-Faktoren (HCG), Phosphoprotein-Phosphatasen, Rab9 Effektor p40, TIP elongation aberrant protein und einige hypothetische Proteine. Es wurden weitere 8 Klone dieser PCR sequenziert, aber es konnte kein zweiter Klon mit einem AC-Teilgen gefunden werden.

	Block II	
<u>PCR-AC-genKlon</u>	GSANKNIGDAFLLV	: 49
BreliCya	GRLVKTLGDEVLYV	: 292
StrcoeCyaA	GRLVKTLGDEVLYA	: 245
RhimeCya1	GTLIQFHGDSVFAM	: 53
StiauCyaA	GTLDKFLGDALMVY	: 283
StiauCyaB	GTLDKFLGDGLMAV	: 220
AnaspCyaB1	GTLDKFLGDALMAV	: 655
AnaspCyaB2	GTLDKYIIGDAIMAV	: 655
YeastCyaA	GYEVKTEGDAFMVA	: 1721
TrepaAC	GVVDKFLGDAIMAI	: 447
DicdiCyaG	IEKIKTLGDAYMAT	: 450
paraGC-C _{2a-like}	VQKIETVGTKYMAA	: 314

↑

Abbildung 6: Sequenzmotive verschiedener Klasse III homodimerer ACn im Konsensblock II. Das konservierte Lysin (Pfeil) ist eine der Substratspezifitäts-vermittelnden Aminosäuren. GCn besitzen an der entsprechenden Position ein Glutamtat (E) (vgl. paraGC-C_{2a-like}). (BreliCya: *Brevibacterium liquefaciens* AC; StrcoeCyaA: *Streptomyces coelicolor* CyaA; RhimeCya1: *Rhizobium meliloti* AC1; StiauCyaA/CyaB: *Stigmatella aurantiaca* CyaA/CyaB; AnaspCyaB1/CyaB2: *Anabaena spirulina* CyaB1/CyaB2; YeastCyaA: *Saccharomyces cerevisiae* CyaA; TrepaAC: *Treponema pallidum* AC; DicdiCyaG: *Dictyostelium discoideum* CyaG; paraGC-C_{2a-like}: ParaGC)

Im *blastx*-Datenbankvergleich zeigte die AC-Teilsequenz keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen, auch nicht zu ACn oder GCn. Die Sequenz konnte anhand des Block II-Konsensusmotivs als mögliche AC-Sequenz eingestuft werden (s. *Abbildung 6*). Ein Motiv des Konsensusblock III konnte nicht zugeordnet werden. Wie sich später herausstellte lag der Grund hierfür in einem nicht-erwartungsgemäßen Anlagerungsverhalten des antisense-Primers, der zwischen Block II und III *out of frame* gebunden hatte. Diese erste AC-Sequenz wird fortan PCR-AC-genKlon genannt.

Um die Sequenz zu bestätigen, wurde eine PCR mit einer cDNA-Genbank (amplifizierte Fraktion 1/1) als Matrize angesetzt. Es wurden die spezifischen Primer ACpS1 und ACpAS1 eingesetzt, deren Sequenz so gewählt wurde, daß sie exakt innerhalb der PCR-Primer-Sequenzen CIIIbAC1-s/CIIIbAC1-as auf PCR-AC-genKlon zu binden kamen. Zum Vergleich wurde eine

PCR mit genomischer DNA als Matrize angesetzt. Es entstand sowohl ein genomisches, als auch ein cDNA-PCR-Produkt, d.h. das Gen der gefundenen AC-Teilsequenz wird transkribiert. Es handelt sich also mit aller Wahrscheinlichkeit um einen Proteinkodierenden genomischen DNA-Abschnitt. Die geringfügige Differenz in der Lauflänge der beiden PCR-Produkte (ca.20-30bp) deutete auf das Vorhandensein eines Introns hin. Durch die Klonierung und Sequenzierung des cDNA-PCR-Produktes wurde diese Annahme bestätigt (s. *Abbildung 7*). Die cDNA-Sequenz wurde im folgenden Genbankscreen als Sonde eingesetzt und wird im Weiteren als Sonde 1 bezeichnet.

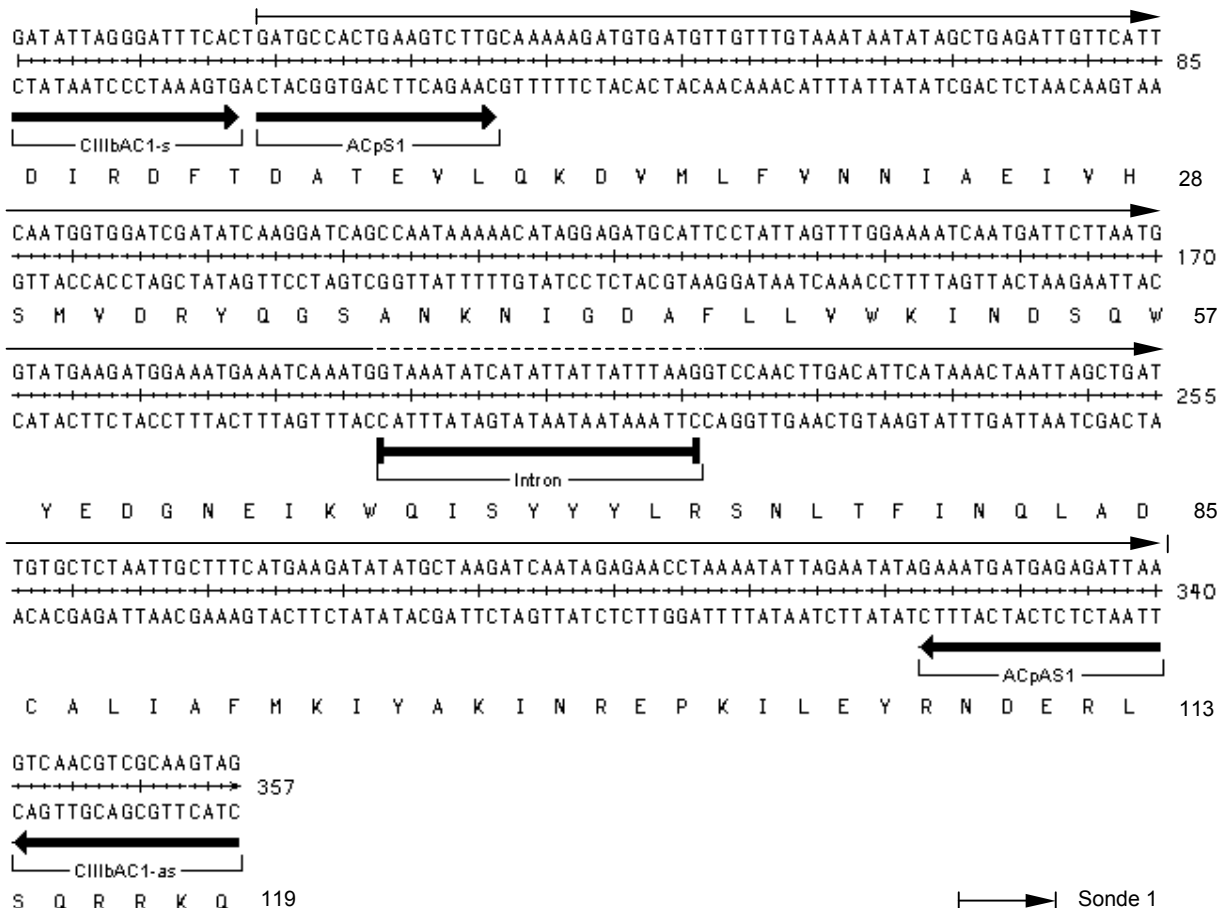


Abbildung 7: Sequenz des PCR-AC-genKlon. Die Sequenz der Sonde 1 liegt innerhalb der CIIIb-AC1-s / CIIIbAC1-as-Grenzen und ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Das Intron konnte durch die Sequenzierung des cDNA-PCR-Produktes detektiert werden. Leseraster +1 ist der einzig durchgehende ORF.

4.1.2 Genbank-Durchmusterung

Um das Gesamtgen der AC zu finden, konnte nun die gefundene AC-Teilsequenz (Sonde 1) für einen Genbankscreen mit einer vorhandenen cDNA-Bank aus *Paramecium tet. 51S* (Beschreibung der cDNA-Bank s. S. 28) verwendet werden. Von der cDNA-Primärbank Fraktion1 war aus dem PCR-Versuch mit dem spezifischen Primerpaar ACpS-1/ACpAS-1 (Amplifikation der Sonde 1, s.o.) bekannt, daß sie das gesuchte Gen beinhaltet. Der nächste Schritt bestand darin, die bereits vorliegenden, amplifizierten Subfraktionen 1-9 der Primärbank Fraktion1 e-

benfalls mittels PCR-Durchmusterung mit den genannten Primern auf das Vorhandensein des gesuchten Gens zu untersuchen. Die Subfraktionen 2-9 ergaben das gesuchte PCR-Produkt. Von der positiven Subfraktion 8 lagen bereits 20 Amplifikate (Subsubfraktionen) à 10000pfu vor. An diesen Subsubfraktionen wurde eine letzte PCR-Durchmusterung durchgeführt, welche die Subsubfraktionen 1, 6 und 9 als positiv auswies. Subsubfraktion 6 zeigte das stärkste PCR-Signal und wurde deshalb für den folgenden Genbankscreen mit radioaktiver Sonde verwendet. Das Sonde 1-Amplifikat diente als Matrize für die radioaktive Markierung. Es war in *pBluescript II SK(-)*, *EcoR I/Hind III*-Verdaut worden, so daß in die Markierungsreaktion das 312bp-Fragment eines *EcoR I/Hind III*-Verdau eingesetzt werden konnte. Die Reaktion wurde mit dem *rediprime-Kit* von Amersham Pharmacia durchgeführt. Um ausreichende Mengen zu erhalten, wurden zwei Reaktionen mit je ca. 30ng DNA und 130×10^6 cpm [α^{32} P]-dCTP angesetzt, die anschließend vereinigt wurden. Insgesamt wurden ca. 85µl Sonde 1 (Eluat der Größenfraktionierung) mit einer Aktivität von 670000cpm/µl gewonnen, welche nach Denaturierung auf 2x 20ml Hybridisierungslösung verteilt wurden (resultierende Aktivität der Hybridisierungslösung: $1,3 \times 10^6$ cpm/ml). Von 8 Phagenplatten à 10000pfu der Subsubfraktion 8 wurden Abzüge auf Nylonmembranen hergestellt, je Platte ein A- und ein B-Abzug. Die Autoradiographie der hybridisierten Membranen ergab 10 auf beiden Abzügen identische Signale. Die zugehörigen Phagenpopulationen auf den Agarplatten wurden ausgestochen und extrahiert. Die PCR-Durchmusterung der erhaltenen Phagensuspensionen mit den spezifischen „Sonde 1-Primern“ ACpS1/ACpAS1 wies alle 10 Extrakte als positiv aus. Zur klonalen Vereinzelung der Phagenpopulation wurde mit Phagensuspension 5 ein zweiter *Screen* durchgeführt. Hierfür wurden Phagenplatten mit sinkenden Mengen der Phagensuspension hergestellt:

Platte 0:	100µl	einer	1:100 -Verdünnung der Phagensuspension 5
Platte 1:	100µl	einer	1:1000 -Verdünnung der Phagensuspension 5
Platte 2:	20µl	einer	1:1000 -Verdünnung der Phagensuspension 5
Platte 3:	5µl	einer	1:1000 -Verdünnung der Phagensuspension 5
Platte 4:	1µl	einer	1:1000 -Verdünnung der Phagensuspension 5

Platte 0 fand keine Verwendung im *Screen*, da die Plaques der Phagenkolonien nicht isoliert lagen. Die hybridisierten Abzüge der Platten 1-4 ergaben in der Autoradiographie (12Std.) zwei Signale, die als copyKlon 2 (von Platte 2) und copyKlon 3 (von Platte 3) bezeichnet wurden. Die korrespondierenden Phagenkolonien wurden ausgestochen, extrahiert, einer *in vivo-excision* unterzogen und anschließend von beiden Seiten ansequenziert (T3- und T7-Sequenzierprimer). Soweit dies anhand der jeweils ersten ca. 500bp des 5'- und des 3'-Endes beurteilt werden konnte, waren copyKlon 2 und 3 identisch. Alle weiteren Schritte wurden mit copyKlon 3 durchgeführt, der von nun an als cKlon bezeichnet wird. Zur Freisetzung des cDNA-Inserts aus dem Vektor *pBK-CMV* wurde mit *EcoR I/Xho I* verdaut³³. Es entstanden 4 Fragmente (1,3kb, 0,8kb, 0,4kb und 0,3kb). Bei Verdau nur mit *EcoR I* fiel das 0,3kb-Fragment weg, was zeigt daß dieser cKlon-Abschnitt das 3'-Ende bildet. Dies war durch die T7-Sequenzierung (3'-Ende) des cKlons bestätigt worden: es befinden sich dort die entsprechende *EcoR I*- und *Xho I*-Schnittstelle. Die *EcoR I*-Fragmente wurden für die vollständige Sequenzierung des cKlons in *pBluescript II SK(-)* (*EcoR I*, *dephos.*) subkloniert. Sequenzüberschnei-

³³ Bei der cDNA-Bank-Herstellung waren am 5'-Ende *EcoR I*-Adapter, am 3'-Ende *Xho I*-Schnittstellen an jedem cDNA-Molekül eingeführt worden (vgl. 2.5.4).

dungen mit den T3- und T7-Sequenzierungen des cKlons ermöglichten, die Sequenzen der *EcoR* I-Fragmente in die korrekte Reihenfolge zu bringen, wie aus der folgenden Karte (*Abbildung 8*) ersichtlich ist.

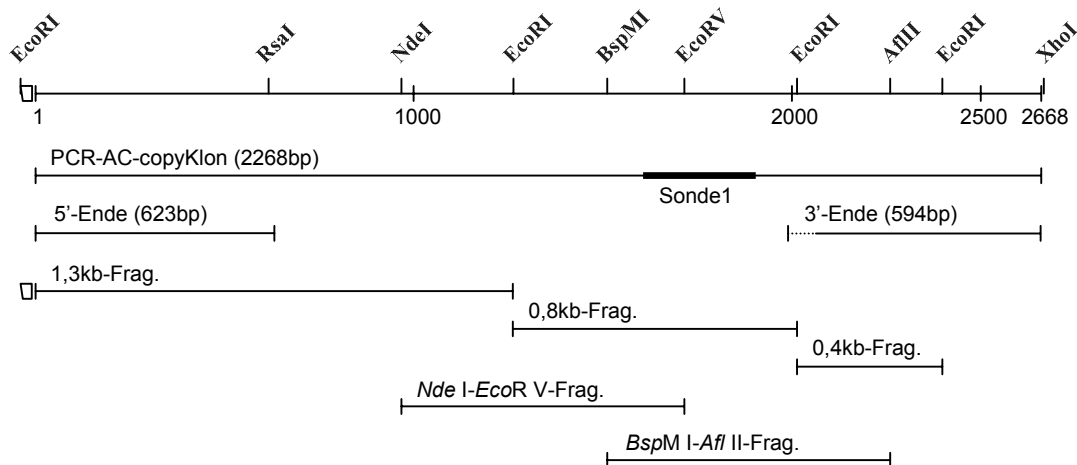


Abbildung 8: Karte des cKlons mit Lage der *EcoR* I-Fragmente, der 5'-Sequenz (T3-Sequenzierung), der 3'-Sequenz (T7-Sequenzierung), des *Nde* I-*EcoR* V-, des *Bsp* M I-*Afl* II-Fragments und der Sonde 1. Die Nummerierung bezieht sich auf den cKlon (s.u.). Lage der Schnittstellen: *EcoR* I: -13bp, 1262bp, 2013bp, 2397bp; *Rsa* I: 615bp (und weitere); *Nde* I: 968bp; *Bsp* M I: 1512bp; *EcoR* V: 1716bp; *Afl* II: 2260bp; *Xho* I: 1bp *downstream* des Poly-A-Schweif. Das 1,3kb-*EcoR* I-Fragment wurde an der *Rsa* I-Schnittstelle unterteilt und die subklonierten Fragmente sequenziert.

Der Zusammengehörigkeitsnachweis von Nahtstellen zwischen *EcoR* I-Fragmenten, an denen keine (1,3kb-Frag. ↔ 0,8kb-Frag.) oder nur geringe (0,4kb-Frag. ↔ 3'-Ende) Sequenzüberlappungen existierten, wurde durch die Sequenzierung des *Nde* I/*EcoR* V- und des *Bsp* M I/*Afl* II-Fragments erbracht. Damit war die Sequenz des cKlons vollständig und wurde durch mehrfache Sequenzierung abgesichert.

Es wurde eine 2668bp lange cDNA gefunden. Die Numerierung des cKlons beginnt mit +1 an der ersten Base der cDNA nach der *EcoR* I-Adaptersequenz der cDNA-Bank-Herstellung (Basen der Adaptersequenz (AATTCGGCACGAG) -13 bis -1). Am 3'-Ende besitzt der cKlon einen 17bp langen Poly-A-Schweif (bp 2652-2668).

Die korrespondierende Aminosäuresequenz der Sonde 1 mit den AC-Konsensusmotiven befindet sich in Leseraster +3 des cKlons. In diesem Leseraster herrscht ein durchgehender ORF von Base 3 bis 2591. Bei bp2592-2594 befindet sich 57bp *upstream* des Poly-A-Schweifs ein Stopcodon. Im 5'-Bereich des cKlons ist ein mögliches ATG-Startcodon im erwähnten Leseraster erst bei bp255-257 vorhanden. Ein solch langer 5'-UTR ist unwahrscheinlich und ließ vermuten, daß das eigentliche Startcodon *upstream* liegt und der cKlon am 5'-Ende noch nicht vollständig war. Diese Vermutung deckte sich mit Erfahrungen, daß mRNAs von *Paramecium* nur kurze 5'-nicht-translatierte Bereiche besitzen. Bei der cDNA-Herstellung für die verwendete Genbank mit dem *ZAP cDNA Synthesis Kit* (Stratagene) war zunächst eine Erststrangsynthese mit einem Poly-T-Primer zu einem cDNA/mRNA-Doppelstranghybrid durchgeführt worden. Für die Synthese des zweiten cDNA-Stranges war dem Hybrid RNase für den Abbau des mRNA-Stranges zugesetzt worden. Entstehende mRNA-Bruchstücke dienten der DNA-

Polymerase I als Primer für die Zweitstrangsynthese. In diesem Schritt und im anschließenden *Polishing* war das kurze 5'-Ende möglicherweise bis hinter das Startcodon verkürzt worden. Zur Vervollständigung des Gens, wurde ein zweiter Genbankscreen notwendig.

4.1.3 Etablierung des Gesamtgens

Um die Sequenz um den fehlenden Bereich *upstream* des 5'-Endes und um das Startcodon erweitern zu können, wurde erneut ein Genbankscreen durchgeführt.

4.1.3.1 Durchmusterung einer genomischen DNA-Bank

Die verwendete DNA-Bank war genomischen Ursprungs, wodurch die Problematik der Verkürzung des 5'-UTR bei der cDNA-Herstellung umgangen werden konnte.

Anhand des 5'-Bereichs des cKlons wurden spezifische Primer für die Herstellung einer Sonde entworfen. Das Primerpaar ACp-s2/ACp-as2 umfaßte den Sequenzabschnitt von bp 2-310 des cKlons. Amplifiziert wurde die Sondensequenz (im Weiteren bezeichnet als Sonde 2) durch eine Standard-PCR mit genomischer *template*-DNA. Laufhöhenunterschiede im Vergleich zu einem Produkt aus einer entsprechenden cDNA-Amplifikation¹¹⁰

wiesen auf das Vorhandensein eines Introns hin. Die Klonierung und Sequenzierung des genomischen Sonde 2-PCR-Produkts brachte 2 Introns zwischen bp 97 und 98 und zwischen bp 257 und 258 des cKlons zum Vorschein. Problematisch hätte eine *EcoR* I-Schnittstelle im ersten Intron werden können, da die Genbank aus *EcoR* I-fragmentierter genomischer DNA kloniert wurde. Es stellte sich aber heraus, daß ausreichende Mengen unvollständig verdauter DNA-Fragmente vorhanden waren.

Vorbereitend wurde zunächst eine PCR-Durchmusterung der Primärbank und der vorliegenden Subfraktionen mit den spezifischen Primern ACp-s2/ACp-as2 durchgeführt. Die genomische Primärbank ergab ein positives Signal. Von dieser Bank standen 20 Subfraktionen mit je 50000pfu zur Verfügung, deren Durchmusterung 19 Subfraktionen als positiv auswies (Subfraktion 8: negativ). Von der positiv durchmusterter Subfraktion 4 existierten 20 amplifizierte Subsubfraktionen, die nach der gleichen Methode untersucht wurden. Die Subsubfraktionen 1, 4, 7, 9 und 12 zeigten das gewünschte PCR-Signal. Für die folgende Durchmusterung mittels radioaktiver Sonde wurde Subsubfraktion 4 ausgewählt, da hier das quantitativ stärkste Signal auftrat. Die Titerbestimmung dieser Subsubfraktion ergab $26,8 \times 10^6$ pfu/ml.

Wie beim vorangegangenen cDNA-Genbankscreen wurden zwei aufeinander folgende Durchmusterungen durchgeführt, die zweite um aus der gefundenen Phagenpopulation des ersten Screens Einzelklone zu isolieren. Für den ersten Screen wurden von Subsubfraktion 4 acht große Phagenplatten à 27000pfu gegossen, und davon 2x 8 Plaqueabzüge hergestellt. Sonde 2 wurde für deren Hybridisierung nach dem Protokoll des *rediprime DNA labeling system* (Amersham Pharmacia) radioaktiv markiert. Als Matrize diente ein PCR-Amplifikat der in *pBluescript II SK(-)* einklonierten Sondensequenz. Es wurden zwei Reaktionsansätze mit jeweils ca. 30ng Sonde 2-DNA durchgeführt, welche vereinigt nach Größenfraktionierung 80µl Eluat mit einer Aktivität von $120000 \text{ cpm}/\mu\text{l} = 9,6 \times 10^6 \text{ cpm}/80\mu\text{l}$ ergaben. Bei einer angestrebten Aktivität von $1,5 - 6 \times 10^6 \text{ cpm}/\text{ml}$ reichte dies für 15ml Hybridisierungs-Lösung aus; ein Volumen, das für die Hybridisierung von 8 Membranen (A-Abzüge) (eine Glasröhre) hinreichend ist. Für die Herstellung der Hybridisierungs-Lösung für die B-Abzüge wurde die Markierungsreak-

tion wiederum als Doppelansatz nach dem gleichen Protokoll wiederholt. Es wurden 80µl Eluat mit einer Aktivität von 300000cpm/µl gewonnen, die zu 20ml Hybridisierungs-Lösung gegeben wurden. Nach 13Std. (A-Abzüge) bzw. 20Std. (B-Abzüge) Autoradiographie waren bei den A-Abzügen auf Membran 7 zwei schwache Signale zu erkennen. Die Stellen wurden auf der Agarplatte lokalisiert, ausgestochen und der Agarblock extrahiert. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle ein Agarblock an einer beliebigen Stelle der gleichen Agarplatte ausgestochen und extrahiert. In der PCR-Durchmusterung (Sonde 2-Primer) der erhaltenen Phagensuspensionen wurden jedoch keine Produkte erhalten, was den negativen Befund der B-Abzüge bestätigte. Es wurde erneut eine Autoradiographie für 95Std. (A-Abzüge) und 86Std. (B-Abzüge) durchgeführt. Die zeitlich verlängerte Autoradiographie ergab 11 schwache, auf beiden Abzügen identische Signale. Die korrespondierenden Bereiche auf den Agarplatten wurden ausgestochen und die Phagenextrakte einer PCR-Durchmusterung unterzogen. Es stellte sich folgendes Ergebnis ein:

Agarplatten-Nr.	Platte 2		Platte 4				Platte 6			Pl. 7	Platte 8	
Phagenextrakt	2-1	2-2	4-0	4-1	4-2	4-3	6-1	6-2	6-3	7-1	8-1	8-2
PCR-Ergebnis	+	+	-	++	+	+	+	-	+	+	+	+

}
Negativ-
kontr.

Von Platte 4 wurde eine Negativkontrolle für die PCR-Durchmusterung erzeugt, indem ein Agarblock an einer beliebigen Stelle ausgestochen wurde. Phagenextrakt 4-1 wurde für den zweiten *Screen* ausgewählt. Es wurden 4 kleine Phagenplatten mit steigenden Mengen einer 1:2000-Verdünnung der Phagensuspension hergestellt:

- Platte 1: 1µl 1:2000-Verdünnung des Phagenextrakt 4-1
- Platte 2: 5µl 1:2000-Verdünnung des Phagenextrakt 4-1
- Platte 3: 20µl 1:2000-Verdünnung des Phagenextrakt 4-1
- Platte 4: 100µl 1:2000-Verdünnung des Phagenextrakt 4-1

Von jeder Platte wurde ein A- und ein B-Abzug hergestellt, die nach dem üblichen Prozedere hybridisiert wurden. Die Hybridisierungs-Lösung des vorangegangenen *Screens* konnte wegen des zu großen zeitlichen Abstands nicht wiederverwendet werden. Aufgrund der unzureichenden Effektivität des radioaktiven *labelings* von Sonde 2 mit dem *rediprime-Kit* wurde für die erneute Markierung von Sonde 2 ein alternatives Protokoll entwickelt, welches im Grunde einen manuell ausgeführten, einzelnen PCR-Zyklus darstellt. Die geringe Ausbeute aus der Markierungsreaktion mit dem *rediprime-Kit* konnte verschiedene Gründe haben. Zum einen war der *Kit* bereits mehrere Jahre alt und damit die Polymerase oder andere Bestandteile des Reaktions-Lyophilisats möglicherweise defekt. Zum anderen besaß die zu markierende Sonde 2-DNA-Sequenz einen A/T-Gehalt von 68,6%, eine Basenzusammensetzung für welche die 9mer-Randomprimer des *Kits* möglicherweise mangels komplementärer Bereiche ungeeignet sind. Generell gilt, daß sich die Sonde 2-Sequenz durch den hohen A/T-Gehalt nur schlecht mit [α ³²P]-dCTP markieren läßt. Die manuelle Durchführung der PCR-Markierungsreaktion unter Einsatz der spezifischen Primer (ACp-s2/ACp-as2) versprach eine ausreichende Steigerung der Markierungseffizienz (Vorgehensweise s. S 40). Es wurde ein 100µl-Ansatz durchgeführt. Nach Gelfiltration konnten 80µl Eluat erhalten werden, deren Aktivität von 1,57x10⁶cpm/µl rund eine 10er-Potenz höher lag als bei den Sonde 2-Markierungen mit *rediprime*.

Die hybridisierten Membranen wurden für 15Std. autoradiographiert, wobei die Membranen der Platte 4 ausgenommen wurden, da hier keine isoliert liegenden Einzelklone vorhanden waren. Es wurden viele Signale erhalten, jedoch konnten sie auf den Platten 2 und 3 keinen isoliert liegenden Plaques zugeordnet werden. Von Platte 1 wurden folgende Plaques ausgestochen und die Phagenextrakte mittels PCR mit den Primern ACp-s2/ACp-as2 auf das Vorkommen der Sonde 2-Sequenz untersucht:

Tabelle 14: Klone des zweiten genomischen Genbankscreens von Phagenplatte 1

Klon	Bemerkung	PCR
1-1a	Eindeutig dem Signal zuzuordnender isolierter Plaque; bei Überführung des A-garblocks konnte Sterilität nicht gewährleistet werden, weshalb der Rand des Plaques nachgestochen wurde (1-1b).	++
1-1b	Gleicher Plaque wie 1-1a; Überreste nachgestochen.	(+) ³⁴
1-2	Einzelplaque; das ausgefranste Signal konnte aber nicht zweifelsfrei diesem Plaque zugeordnet werden.	(+) ³⁵
1-3	Wurde am Rande eines Zwillingssplaques ausgestochen (Einzelklon?); das ausgefranste Signal konnte nicht zweifelsfrei zugeordnet werden.	++

Später wurden von Platte 2 folgende Phagenplaques ausgestochen:

Tabelle 15: Klone des zweiten genomischen Genbankscreens von Phagenplatte 2

Klon	Bemerkung	PCR
2-1	Das Autoradiographiesignal konnte einem Zwillingssplaque zugeordnet werden; es wurde am Rand versucht, einen Einzelklon zu stechen.	+
2-2	Zweiter Plaque des bei 2-1 beschriebenen Zwillingssplaques; es wurde am Rand ausgestochen; einem der beiden Klone ist das erhaltene Signal zuzuordnen.	+

Zunächst wurde Phagenextrakt 1-1a einer *in vivo-excision* unterzogen und sequenziert. Die Sequenz war nicht die gesuchte Verlängerung des cKlons, sondern besaß hochsignifikante Ähnlichkeit zu Histon H4, wie sich im Datenbankvergleich herausstellte (Klon If-1-1a; s. *Tabelle 12*, Ergebnisse des *blastx-searches* s. Kapitel 7.1). Daraufhin wurden die Phagenextrakte 1-3, 2-1 und 2-2 der *in vivo-excision* zugeführt. Die ersten Sequenzierungen zeigten, daß es sich bei allen um die gleichen Sequenzen handelte, deren 3'-Enden wie gesucht mit dem 3'-Ende des 1,3kb-*EcoR* I-Fragments des cKlons identisch war. Es stellte sich heraus, daß Phagensuspension 2-2 zwei verschiedene Phagenklone enthielt, nach der *in vivo-excision* standen jedoch Reinklone zur Verfügung, wobei ein Typ offenbar ein Doppel-Insert enthielt. Dieser Typ wurde verworfen. Als Referenzklon für die weiteren Arbeiten wurde der korrekte Klon 2-2 verwendet. Er wird fortan als gKlon bezeichnet. Durch einen *EcoR* I-Verdau wurde er in ein 1,2kb-Fragment und ein 800bp-Fragment unterteilt, wobei das 800bp-Fragment *upstream* der Intron1-internen *EcoR* I-Schnittstelle lag und die Verlängerung des cKlons darstellte, während das 1,2kb-Fragment *downstream* dieser Schnittstelle lag und mit Ausnahme von Intron-Sequenzabschnitte identisch zum cKlon war (s. *Abbildung 9*).

³⁴ Es entstand ein sehr schwaches Produkt, welches nicht als positives Signal gewertet wurde.

³⁵ Es entstand ein sehr schwaches Produkt, welches nicht als positives Signal gewertet wurde.

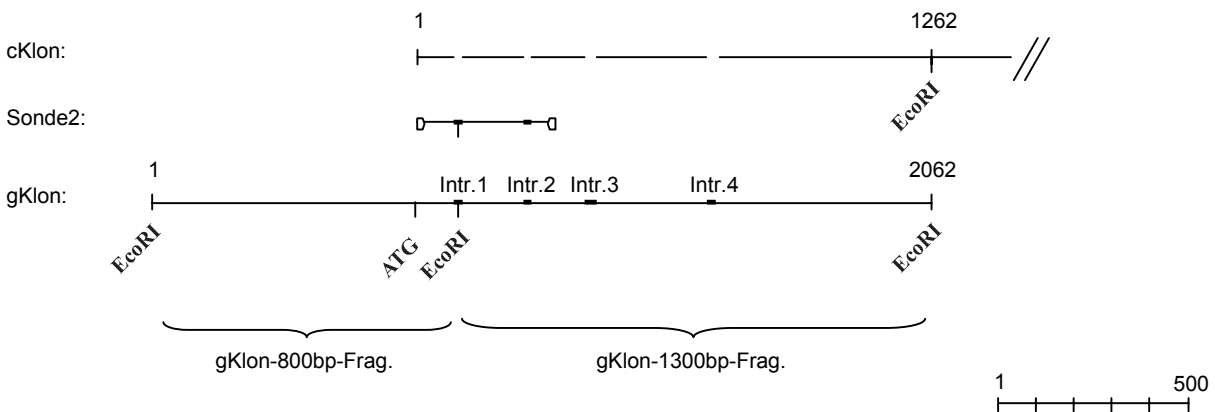


Abbildung 9: Karte zur Verdeutlichung der Lage des gKlons zum cKlon. Die Introns 1-4 sind als dicke Balken im gKlon eingezeichnet. Genaue Lage der eingezeichneten Elemente: Beginn cKlon-Seq. auf gKlon: bp701; *EcoR* I-Schnittstellen: gKlon: bp1/cKlon: --, gKlon: bp813/cKlon: --, gKlon: bp2062/cKlon: bp1262; Intron1: gKlon: bp798-820/cKlon: zw. bp97/98; Intron2: gKlon: bp981-1002/cKlon: zw. bp257/258; Intron3: gKlon: bp1143-1173/cKlon: zw. bp397/398; Intron4: gKlon: bp1464-1487/cKlon: zw. bp687/688; Sonde 2: gKlon: bp703-1055/cKlon: bp3-310; angenommenes Startcodon (ATG): gKlon: bp697-699/cKlon: -4 - -2.

4.1.3.2 Bestimmung des Startcodons

Für die Bestimmung des Startcodons des mutmaßlichen AC-Gens, war das 800bp-*EcoR* I-gKlon-Fragment als Verlängerung des cKlons ausschlaggebend. Dieses ist im folgenden abgedruckt (*Abbildung 10*), um die Argumentation bezüglich der Festlegung des Startcodons zu verdeutlichen.

An Position bp 701 des gKlons beginnt die bekannte Sequenz des cKlons. Der ORF des cKlons, welcher die AC-Konsensusmotive beinhaltet, liegt am 5'-Ende des 800bp-*EcoR* I-gKlon-Fragments in Leseraster +1. An Position bp 697-699 im gKlon, also 4bp upstream des cKlon-5'-Endes ist in diesem Leseraster ein Startcodon zu finden. Zwischen dem *upstream* an gKlon-Position bp 505-507 liegenden Stopcodon und dem genannten Startcodon befindet sich kein weiteres, alternatives ATG *in frame*. Daraufhin wurde die Hypothese aufgestellt, das genannte Startcodon (bp 697-699) sei das Startcodon der AC. Die DNA-Zusammensetzung *upstream* des vermutlichen Startcodons untermauerte diese Annahme. Der Sequenzabschnitt bis 71bp *upstream* des ATG (bp 626-696) besitzt mit 91,5% A/T-Gehalt einen A/T-Reichtum, wie er in kodierenden Genomabschnitten nicht vorkommt. Weitere 53bp *upstream* (bp 573-625) findet sich eine DNA-Region mit einem für *Paramecium* sehr hohen G/C-Gehalt von 54,7%, was wiederum für einen nicht-kodierenden Bereich spricht. Der nochmals *upstream* liegende Abschnitt zwischen bp 523 und dem G/C-reichen Bereich ab bp 573 ist wiederum überdurchschnittlich A/T-reich (88,3%). Diese Region wechselnder A/T- und G/C-reicher Abschnitte ist vermutlich als 5'-UTR des AC-Gens oder als 3'-UTR des *upstream* liegenden Strukturgens anzusehen. Die *upstream-message* endet möglicherweise an dem Stopcodon bp 505-507 des Leserasters +1 oder dem Codon bp 528-530 des Leserasters +3.

AATTCAATATATAAATTAAGAATCTTATAATATAAAATATAAAATTATAAAATGGATGAGGGGATCTATATTAATAGGTG
 N S I Y K L R I L Q Y K I Q I I K W M R G S I L N R .
 I Q Y I N Q E S Y N I K Y K L Q N G . G D L Y Q I G
 Q F N I Q I K N L I I Q N I N Y K M D E G I Y I K Q Y

ATTGTAACGATTGTTTTGAAATTTCTGATTAGTAATGAATAATTACGCTAATTAGGATATTAGCATCGAATGTA AAAAG
 L Q T I C L K F L I S N E I I T L I R I L A S N Y K
 D C K R F Y . N F . L Y M K Q L R Q L G Y Q H R M Q K
 I Y N D L F E I S D Q Q . N N Y A N Q D I S I E C K R

ATGAGTCCATAGAGCACTTGTATAATTCCATTATCCAGCATCAATCGAAAGATGAATAGGA **pACAnfg-s1** **GGAAATATGATGAAAGGGAG**
 D E S I E H L Y N S I I Q H Q S K D E Q E E Y D E R E
 M S P Q S T C I I P L S S I N R K M N R R N M M K G S
 . Y H R A L Y Q F H Y P A S I E R . I G G I . . K G

TCTTCAAAGAGGAAACTCAACGATCCCAAGTAGTATTATTGATGTTTTGAGGATGTTATTAGATTTTTCTACTCTGAGGA
 S S K R K L N D P K Q Y Y . C F E D V I R F S Y S E D
 L Q R G N S T I P S S I I D Y L R M L L D F P T L R
 V F K E E T Q R S Q Y V L L M F . G C Y Q I F L L . G

CAAACGGATCTTAGAATTGGTCTAATAAGTGGGTCCAAATTTAATAGCATTGTAAAAATATTTCCAGGGAAGACAATGA
 K R I L E L Y Q Q V G P N F N S I Y K Y F P G K T M
 T N G S Q N W S N K W Y Q I L I A L Q N I F Q G R Q .
 Q T D L R I G L I S G S K F Q Q H C K I F S R E D N E

ATATGATAAAGAATAGATNCTACAAAAAGTTAAGGTACATGAAGGAAGACGATTTGAATGAGAAGGAGAAGGTGAGAGGG
 N M I K N R ? Y K K L R Y M K E D D L N E K E K Y R G
 I . Q R I D ? T K S Q G T . R K T I . M R R R R . E G
 Y D K E Q ? L Q K Y K Y H E G R R F E . E G E G E R

GTTCGGAACAGAGAAAGGCAAACACTGAGAA **pACAnfg-as1 / pACAnfg-s2** **ACCAAAATCTAACATTTT** TGATATATATGTAATTACATATATTTAATTTAA
 Y R K Q R K A N . E P K S N I F D I Y V I T Y I Q F N
 F G N R E R Q T E N Q N L T F L I Y M Q L H I F N L
 G S E T E K G K L R T K I Q H F . Y I C N Y I Y L I Q

CTCTTTAAATTTGGGGCGGGGGATTAGAGGGAAGGAGGAGATTTGTGAAAGGGATCTTGGTAATGAATAAATTAGTTAAT
 S L N L G R G I R G K E G D C E R D L G N E Q I S Q
 T L Q I W G G G L E G R R E I Y K G I L Y M N K L Y N
 L F K F G A G D Q R E G G R L . K G S W Q . I N Q L I

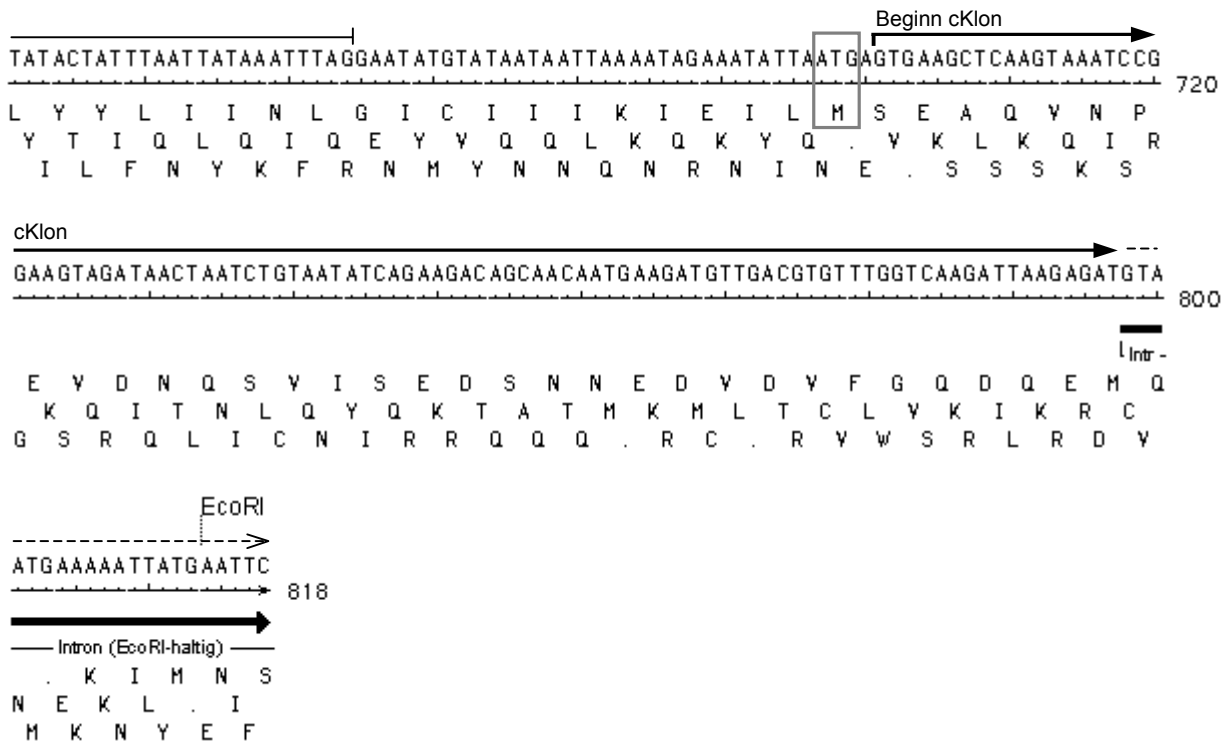


Abbildung 10: Karte des 800bp-*EcoR* I-Fragments des gKlons. Sequenzabschnitte, die die Bedingungen für Introns erfüllen, wurden mit einem Querbalken oberhalb der Nukleinsäuresequenz eingezeichnet: gestrichelte Balken stehen für Introns, die auf die Lage eines alternativen Startcodons keinen Einfluß besitzen; mögliche Introns, die eine Rolle bei der Bestimmung des Startcodons spielten, sind mit einer dünnen Linie gekennzeichnet und wurden als mgl.Intr.1 bis mgl.Intr.6 bezeichnet (genaue Lage s. *Tabelle 16*, *Tabelle 17*); der dicke Balken zeigt die Lage des Introns, welches durch die PCR-Klonierung der *upstream message* identifiziert wurde (bp 270-302). Bei Base 701 beginnt die bekannte Sequenz des cKlons; 4 Basen *upstream* liegt das vermutete Startcodon (grau eingerahmt). Die Stopcodons, welche für die *upstream message* vermutet wurden, sind ebenfalls grau eingerahmt.

Alternative Möglichkeiten zu dem angenommenen Startcodon konnten nur noch durch *upstream* liegende Introns eröffnet werden, die von einem alternativen ORF auf das AC-Leseraster +1 führen. Introns in Paramecium sind, wie bereits an anderer Stelle erwähnt, sehr charakteristisch: sie besitzen eine Länge von 20-33bp, beginnen mit dem Dinukleotid GT und enden auf AG. Es wurden alle Sequenzabschnitte *upstream* des vermuteten Startcodons herausgesucht, die diesen Charakteristika gehorchen, und darauf überprüft, ob sie zu alternativen Startcodons führen. Die möglichen Introns sind in der Karte *Abbildung 10* als „mgl.Intr.“ eingezeichnet und durchnummeriert. Keines der Introns eröffnet eine Alternative, auch die Kombination mehrerer Introns nicht (s. *Tabelle 17*).

Tabelle 16: Mögliche Introns *upstream* des vermuteten Startcodons, die bei der Festlegung des endgültigen Startcodons zu berücksichtigen waren.

Bezeichnung des Introns	Lage auf dem gKlon	Länge
mögliches Intron 1	bp 635-664	30bp
mögliches Intron 2	bp 605-635	31bp
mögliches Intron 3	bp 481-508	28bp
mögliches Intron 4	bp 435-465	31bp
mögliches Intron 5	bp 435-462	28bp
mögliches Intron 6	bp 429-462	34bp ³⁶

Tabelle 17: Leserasterwechsel, welche bei *Splicing* der oben aufgeführten, vermeintlichen Introns auftreten (resultierendes Leseraster (LR): +1)

Intron-Nr.	Auswirkung des <i>Splicings</i>
mgl.Intr.1	<i>Splicing</i> dieses Introns ergibt keinen Wechsel des Leserahmens (LR +1 nach LR +1); bereits erwähntes Stopcodon <i>upstream</i> (bp 505-507)
mgl.Intr.2	Deletion führt von LR +3 nach LR +1; <i>upstream</i> befindet sich kein alternatives Startcodon in LR +3; Stopcodon bei bp 528-530
mgl.Intr.3	Entfernung dieses Introns beseitigt das Stopcodon bp 505-507 und ergibt einen LR-Wechsel von +3 nach +1; in LR +3 befindet sich kurz oberhalb der Stop bp 459-461; dazwischen kein mögliches Startcodon
mgl.Intr.3 + mgl.Intr.4	mgl.Intr.4 beinhaltet das bei Intr.3 erwähnte Stopcodon; bei Entfernung beider Introns erfolgen die LR-Wechsel von +2 nach +3 nach +1; in LR +2 befindet sich wenig <i>upstream</i> ein Stopcodon (bp 404-406) ohne vorheriges Start-ATG
mgl.Intr.3 + mgl.Intr.5	mgl.Intr.5 beseitigt das bei mgl.Intr.3 erwähnte Stopcodon; Entfernung beider Introns führt zu LR-Wechsel von +2 nach +3 nach +1; wenig <i>upstream</i> in LR +2 befindet sich das Stopcodon bp 404-406
mgl.Intr.3 + mgl.Intr.6	wie Kombination mgl.Intr.3 mit mgl.Intr.4 bzw. mgl.Intr.5

Eine Untermauerung der Richtigkeit des vermuteten Startcodons wurde durch den PCR-Nachweis des Transkripts (cDNA) der *upstream-message* erbracht. Der antisense-Primer (pAC-Anfg-as1) wurde so gewählt, daß er unmittelbar *downstream* des Stopcodons (gKlon: bp 505-507) der vermutlichen *upstream-message* zu binden kam. Der sense-Primer (pACAnfg-s1) wurde ca. 300bp *upstream* auf einen Sequenzabschnitt gelegt, der nicht Bestandteil eines möglichen Introns sein konnte (bp 222-239) (vgl. *Abbildung 10*). Das erhaltene 273bp-PCR-Produkt ist identisch zu der Sequenz des gKlons (bp 222-517) und deckte ein Intron im gKlon von bp270-302 auf. Einzig Leseraster +2 zeigte einen durchgehenden ORF, der auf dem vermuteten Stopcodon endete. Es wurde davon ausgegangen, daß es sich bei dieser Sequenz um das auf dem Genom *upstream* des potentiellen AC-Gens liegende Strukturgen handelt. In einer Datenbanksuche zeigte die korrespondierende Proteinsequenz eine hohe Ähnlichkeit zu myb-like DNA-binding Proteinen (s. *Tabelle 12*), die durch eine *Smith/Waterman*-Suche bestätigt wurde. Die Tatsache, das Transkript des *upstream*-Strukturgens gefunden zu haben, dessen Stopcodon auf genomischer Ebene im gleichen Leseraster wie die vermutete AC liegt, bestätigte ein weiteres Mal das angenommene Startcodon.

³⁶ Dieses mögliche Intron ist mit 34bp länger als bisher bekannte Introns (20-33bp)

Ergebnisse

-12	+1	atgaGTGAAGCTCAAGTAAATCCGGAAGTAGATAACTAATCTGTAATATCAGAAGACAG	59
		GGCGCCGCCACCATGAGCGAGGCCAGGTTAACCCCGAAGTCGATAACCAGTCCGTGATCTCCGAGGACTC	59
		M S E A Q V N P E V D N Q S V I S E D S	20
		CAACAATGAAGATGTTGACGTGTTTGGTCAAGATTAAGAGATTGATAAGTTTCTCTCTTAACGAGTATTT	130
		CAACAACGAGGACGTGGACGTGTTTCGGCCAGGACCAAGAGATCGACAAGTTCCCCCTGCTCACCTCCATCC	130
		N N E D V D V F G Q D Q E I D K F P L L T S I	43
		TGGATAGTAGTTGGTCTCAAATATTAGTAAATCTCTTAACATATATGCTCTATTTGGCGATGATATTAGA	201
		TGGACTCCTCCTGGTCCCAAATCCTGGTGAACCTGCTCACCATCTACGCCCTGTTTCGGCGACGATATCCGC	201
		L D S S W S Q I L V N L L T I Y A L F G D D I R	67
		ATTATTGCCTTTGATAAGAGGGCTGATGATGGATTTGATGTGATCACCATAATATGCATGATAAATATTTTC	272
		ATCATCGCCTTCGACAAGCGGGCCGACGACGGCTTCGACGTGATCACCATCATCTGCATGATCATCTTCTC	272
		I I A F D K R A D D G F D V I T I I C M I I F S	91
		AATAGAAATCATCATTGCCAGTTTGGTTAGAAGTACTGACTATTTAATTCATTCTTTTTTTGGCTTGATATAA	343
		CATCGAAATCATCATCGCCTCCCTGGTCCGACCGACTACTTCAACTCCTTCTTCTTCTGGCTGGACATCA	343
		I E I I I A S L V R T D Y F N S F F F W L D I	114
		TATCAACAGTTTCTTAGATTTTGGATATAACCTCGTTCAATATTGCAGTTGGTTTATAAGTTCTGTGGCT	414
		TCTCCACCGTGTCCCAAATCCTGGACATCACTAGTTTCAACATCGCCGTCCGGCTGCAGGGCTCCGTGGCC	414
		I S T V S Q I L D I T S F N I A V G L Q G S V A	138
		GCAAAATCCGCCTCTTAATTGTCCCAAGCAAATAAAGCATCTAAAACAAGTTCGAAAGCAATTCGAGTGGT	485
		GCGAAGTCCGCCTCCCAACTGTCCCAAGCCAACAAGGCCTCCAAGACCTCCTCCAAGCCATCCGCGTGGT	485
		A K S A S Q L S Q A N K A S K T S S K A I R V V	162
		TCGACTTGTTAGATTAATTAGAATAGTTAAGTTGTATAAGGCTGCAAGCTATTCATAAGAATAAGCCTTTA	556
		GCGCCTGGTGCCTGATCCGCATCGTGAAGCTGTACAAGGCCGCTCCTACTCCCAAGAGCAAGCTTTCA	556
		R L V R L I R I V K L Y K A A S Y S Q E Q A F	185
		AAAGACAGCCCATCCGAACTTAGACTACGAAAAAAGCAAAGCAACAATTTATCCCTCGGTGTACGAAAAAT	627
		AGCGCCAGCCCATCCGCACCCAGACCACCAAGAAGTCCAAGGCCACCATCTACCCCTCCGTGTACGAGAAC	627
		K R Q P I R T Q T T K K S K A T I Y P S V Y E N	209
		ATTAACAATGGGCCAGTTGAAACAGGAGAATCTAAATAAAAAGGAGAATAATACTGAATAAAGGGAAGGAGA	698
		ATCAACAACGGCCCCGTGGAACAAGAGAACCTGAACAAGAAGGAGAACAACACCGAGCAGCGGAGGGCGA	698
		I N N G P V E Q E N L N K K E N N T E Q R E G E	233
		AGATAATGCGAATAGTTAAGAAAAATCGAGAAAAATAAAATATGGTTGCAAAATAACAATAAATTGACAATT	769
		GGACAACGCCAACTCCCAAGAGAACCAGGAGAACATGGTTCGCAAGCAGCAGCAATTCGATAACT	769
		D N A N S Q E N R E N Q N M V A K Q Q Q I D N	256
		CTATTCCAAAGGTCTAATAAATTCGTAGACAATCCATGAAAGAGCCATCGTAAGTCAAAGCCAAAGAAAAA	840
		CCATCCCCAAAGTCCAGCAGATCCGCCGCAATCCATGAAGGAGCCCTCGCAAGTGAAGGCCAAGGAGAAG	840
		S I P K V Q Q I R R Q S M K E P S Q V K A K E K	280
		AAAGAATCCAGAGTGAGCAAAAGGTTGTCCGATTCCACAACGAAGAAAGTCATCATCTTGTCTATTTATT	911
		AAGGAGTCCCGCGTGTCCAAGCGCCTGTCCGACTCCACCACCAAGAAGTTCATCATCTTGGTGTCTCTGCT	911
		K E S R V S K R L S D S T T K K V I I L V I L L	304
		ACTCTTAATAATGCCTTTATTTAGTTCTGATTACTATTTTGAACCATCCTATAGTTTTCAGCATATGCAGCTG	982
		CCTGCTCATCATGCCCTGTTCTCCTCCGACTACTACTTTGAACCCTCCTACTCCCTGGCCTACGCCGCCG	982
		L L I M P L F S S D Y Y F E P S Y S L A Y A A	327
		AGTATGTAAGAGTAGTGGCTGAGATTCCAAATACAAAATAACTGAGATCAATTAGACAATATATTTTCGTG	1053
		AATACGTACGCGTGGTGGCCGAGATCCCCAACACCAAGCTGACCGAGATCAACCAGACCATCTACTTTCGTC	1053
		E Y V R V V A E I P N T K L T E I N Q T I Y F V	351
		ATTGATTAGCATAAATCATTTGACACGCCAGTAGGATACATTACCAACCCATTTACTGAGATAGAGAATTA	1124
		ATCGACCAGCACAAGTCTTTCGACACCCCGTCCGGTACATCACCAACCCCTTACCAGATCGAGAATA	1124
		I D Q H K S F D T P V G Y I T N P F T E I E N Y	375

TGAAACCCCTTCATATTAGTATTTAAGAGAAAGTTCGAAAAGCTATTATTTTGAATTAGTAGATCCTGTAT	1195
CGAGACCCCTCCTACCAATACCTGCGCGAGTCCCTCCAAGTCTACTACTTCGAGCTCGTGGACCCCGTGC	1195
E T P S Y Q Y L R E S S K S Y Y F E L V D P V	398
TGGTGGGTTTGAATAACATTGGTGATCCTGTCACTCTTTTTGTCTCAGATAATTCTGATGTTGAGTCTAAG	1266
TGGTCGGCCTGGAGTACATCGGGCAGCCCGTCATCCTGTTTCGTGTCCGACAACCTCCGACGTGGAATCCAAG	1266
L V G L E Y I G D P V I L F V S D N S D V E S K	422
AATTCAATCATCAATATTGTTAATACTTTATTTGTGAGTGCCGTATTGTTATTTGGAGCAATTGCCTTTTC	1337
AACTCCATCATCAACATCGTGAACACCCTGTTTCGTCTCCGCCGTGCTGCTGTTCCGGGGCCATCGCCTTCTC	1337
N S I I N I V N T L F V S A V L L F G A I A F S	446
TAATGATGCTAATAATGTTGCCTTGAAACCAATAGATAGGATGATAGTGAAAGTCAATTTAATAGCTAAGA	1408
CAACGACGCCAACAACGTGGCCCTGAAGCCAATTGACCGCATGATCGTGAAGGTGAACCTGATCGCCAAGA	1408
N D A N N V A L K P I D R M I V K V N L I A K	469
ATCCCTAATTGGCCAAGGAGATGAAATTAGAATCTGATGGAACCTCAAAGGAAACCACCTTAGATAGAAAAAT	1479
ACCCCAACTGGCGAAGGAGATGAAGCTGGAGTCCGACGGCAGCAGAAGGAGACCACCCAAATCGAGAAC	1479
N P Q L A K E M K L E S D G T Q K E T T Q I E N	493
GCTATCATCAAAAATAGGGGCCTTGTGGCATTGGGATTTGGTGATGCAGGTTCTGCTATTATAGGAACTAA	1550
GCCATCATCAAGATCGGCGCACTGCTGGCCCTCGGCTTCGGCGACGCCGGCTCCGCCATCATCGGCACCAA	1550
A I I K I G A L L A L G F G D A G S A I I G T N	517
TATGGCATCATCAGGAGATGTGGATCCTATGTTACCAGGTAAACGTAAATGGGCAATTTATGGATTTTGTG	1621
CATGGCCTCCTCCGGCGACGTGACCCCATGCTGCCCGCAAACGCAAATGGGCCATCTACGGCTTCTGCG	1621
M A S S G D V D P M L P G K R K W A I Y G F C	540
ATATTCGTAATTTCACTGATGCCACTGAAGTCTTGCAAAAAGATGTGATGTTGTTTGTAAATAATATAGCT	1692
ACATCCGCAACTTCACCGACGCCACGGAAGTCTGCAGAAGGACGTGATGCTGTTTCGTCAACAACATCGCC	1692
D I R N F T D A T E V L Q K D V M L F V N N I A	564
GAGATTGTTCAATCAATGGTGGATCGATATCAAGGATCAGCCAATAAAAAACATAGGAGATGCATTCCTATT	1763
GAGATCGTGCACCTCCATGGTTCGATCGCTACCAAGGCTCCGCCAACAAGAACATCGGCGACGCTTCTGCT	1763
E I V H S M V D R Y Q G S A N K N I G D A F L L	588
AGTTTGGAAAATCAATGATTCTTAATGGTATGAAGATGGAAATGAAATCAAATGGTCCAACCTTGACATTCA	1834
CGTGTGGAAGATCAACGACAGCCAGTGGTACGAGGACGGCAACGAGATCAAGTGGTCCAACCTGACCTTCA	1834
V W K I N D S Q W Y E D G N E I K W S N L T F	611
TAAACTAATTAGCTGATTGTGCTCTAATTGCTTTTCATGAAGATATATGCTAAGATCAATAGAGAACCCTAAA	1905
TCAACCAGCTAGCCGACTGCGCCCTGATCGCCTTCATGAAGATCTACGCCAAGATCAACCGGAGCCCAAG	1905
I N Q L A D C A L I A F M K I Y A K I N R E P K	635
ATATTAGAATATAGAAAATGATGAGAGATTAAGTCAACGTTTGGCAGGATATAAAGTAAAGATGGGATTCGG	1976
ATCCTGGAATACCGCAACGACGAGCGCCTGTCCCAACGCCTCCCGGCTACAAAGTCAAGATGGGCTTCGG	1976
I L E Y R N D E R L S Q R L P G Y K V K M G F G	659
ATTGCATATAGGATGGGGCATAGAAGGTGCCATTGGATCAGAATTCAAAATTGATGCCTCTTATCTGAGTC	2047
CCTGCACATCGGCTGGGGCATCGAGGGGGCCATCGGCTCCGAGTTCAGATCGACGCGTCTACCTGTCCC	2047
L H I G W G I E G A I G S E F K I D A S Y L S	682
CAAATGTTAATATGGCTTCTCGTTTAGAAGCTGCTACTAAACAATATGGTGTGGCTGTCTTAATCTCAAGC	2118
CCAACGTGAACATGGCCTCCCGCCTGGAAGCCGCCACGAAGCAGTACGGCGTGGCCGTGCTGATCAGCAGC	2118
P N V N M A S R L E A A T K Q Y G V A V L I S S	706
GAATTGCACCAATATTTCTCCAATGAAGTCAAGAAATACACCAGATAGATTGATAAAGTCACTGTTAAGGG	2189
GAGCTGCACCAGTACTTCTCCAACGAGGTCAAGAAGTACACCCGCCAGATCGACAAAGTCAACCGTGAAGGG	2189
E L H Q Y F S N E V K K Y T R Q I D K V T V K G	730
AAGTGTCAAACCTATTGGGTTGTTCACTGTGGAGATGGAGGCTGATGATCTGCCTCCTAGCAAATAGGATT	2260
CTCCGTGAAGCCCATCGGCCTGTTACCGTGGAGATGGAGGCCGACGACCTGCCGCCTTCGAAACAGGACT	2260
S V K P I G L F T V E M E A D D L P P S K Q D	753

ATCCTTAAGAAGAGAAGTAATAAGTGATGTATGAGAAAAAGCAAATCTTTCTTTAATAACTAGAATCTGGG	2331
ACCCGCAAGAGGAGAAGCAGCAAGTCATGTACGAGAAGAAGCAGATCTTCCTGCAACAACCTGGAGTCCGGC	2331
Y P Q E E K Q Q V M Y E K K Q I F L Q Q L E S G	777
GATTTCAATGCAGAATTGTATATAAAAAAGAAACAAGGATCTTGGACTTATAACGAAGAATGTTAATCAAGA	2402
GACTTCAACGCCGAGCTGTACATCAAGCGCAACAAGGACCTGGGCCTGATCACCAAGAACGTGAACCAGGA	2402
D F N A E L Y I K R N K D L G L I T K N V N Q E	801
ATTCTTGCATCAATTTGGCTAAGGGTTTTAAGGTTATCTCTTGGGAAATTGGAAAGAGGCCACATGTTGT	2473
GTTCCTGCACCAGTTTGGCCAAGGCTTCCAGGGCTACCTGCTGGGCAACTGGAAGGAGGCCACATGCTGT	2473
F L H Q F G Q G F Q G Y L L G N W K E A H M L	824
TTGAAAAAGCGAAGTAAATCAGACCTAATGATGGTCCCATAAGTACTCTATTTAATGTAATGGGGGAAACA	2544
TCGAGAAGGCCAAGCAGATCCGCCCAACGACGGCCCCATCTCCACCCTGTTCAACGTCATGGGCGAGACC	2544
F E K A K Q I R P N D G P I S T L F N V M G E T	848
AATTTCAAAGCTCCTTCAGATTGGAAAGGCTATAGAGAGTTAACGAAAAATGAATATTTTAAGTCTATAA	2615
AACTTCAAGGCCCGAGCGACTGGAAGGGCTACCGCGAGCTGACCGAGAAGTGAgcggcgc	2606
N F K A P S D W K G Y R E L T E K .	865
TGTTCCGGCATTTCTTTTGTTCGAAATTATATATTATAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAC	2673

Abbildung 11: Sequenz der Paramecium-AC:

DNA-Sequenzen: Original Paramecium Sequenz: bp 3-2673 gesamter cKlon, bp 1-4 aus gKlon entnommen; Sequenz des synthetischen Gens (pACsyn; s. Kapitel 4.3): bp -12 bis -7: *Ehe* I-Schnittstelle, bp -9 bis -1: *Kozac*-Sequenz, pAC-Sequenz beginnt bei bp +1 bis 2598, bp 2599-2606: *Not* I-Schnittstelle, fett gedruckte Basen: in pACsyn-II-Frag. d veränderte Basen (s. Abschn. 4.3.4). Proteinsequenz: Übersetzung der DNA-Sequenz. TM1-6, Pore-Loop, AC-Domäne und TPRL sind entsprechend unterstrichen.

4.2 Topologievorschlag für das gefundene Adenylatcyclasegen

Das Ergebnis der Homologieklonierung und der anschließenden Genbankdurchmusterungen war ein 2668bp langer cDNA-Klon (cKlon) und ein 2062bp langer genomischer Klon (gKlon). Der cKlon besitzt einen die AC-Konsensusmotive beinhaltenden ORF von bp 3 bis zu Stopcodon bp 2592. Die Sequenz des cKlons war am 5'-Ende nicht vollständig und konnte durch den genomischen Klon (gKlon) ergänzt werden. Das Startcodon konnte 4bp *upstream* des 5'-Endes des cKlons (gKlon: bp 696-698) festgelegt werden. Das resultierende Gesamtgen der mutmaßlichen Paramecium-AC ist folglich ein 2598bp langes Gen, das für ein 97,9kDa Protein von 865AS kodiert (Sequenz s. S. 88f). Sowohl das Gen, als auch das Protein wird von nun an als Paramecium-AC (pAC) bezeichnet. Werden in den folgenden Kapiteln Numerierungsangaben gemacht, beziehen sich diese auf das pAC-Gen/-Protein, wenn nicht ausdrücklich auf einen anderen Klon oder Konstrukt bezug genommen wird.

Um die Topologie des Proteins und die Verwandtschaft zu bekannten Proteinen und Protein-domänen zu ermitteln, wurden mit der Proteinsequenz bzw. einzelnen Domänen des Proteins verschiedene Datenbanksuchen und Proteinanalysen durchgeführt, die in *Tabelle 11* zusammengestellt sind.

blastp-Datenbanksuche

Erste Anhaltspunkte bezüglich der Verwandtschaft zu bekannten Proteinen konnten durch einen Datenbankvergleich nach dem NCBI *blastp*-Algorithmus erhalten werden. Das Ergebnis belegte, daß das klonierte Gen im N-terminalen Bereich für eine Adenylatcyclase codiert. Der Vergleich ist aktuell (Jan. 2002) wiederholt durchgeführt worden. Im Folgenden ist ein Ausschnitt des Ergebnisses abgedruckt.

Die höchsten Ähnlichkeiten zu dem pAC-Protein zeigen Klasse III-ACn des cyanobakteriellen Typs (s. Abschn. 5.1.1). 1999 bereits in der Literatur beschrieben waren die bakteriellen ACn CyaB1, CyaB2, CyaA von *Ana.sp.* (*Nos.sp.*) (43), *Ana.cy.CyaA* (44, 45), *Tre.pa.AC* (46), CyaA und CyaB von *Sti.au.*(47), *Spi.pl.AC1* (48, 49) und *Rhi.me.Cya1* (50). Die Alignments des *blastp*-Ergebnisses erstrecken sich über den pAC-Bereich von AS 523-538 bis AS 705-748. Im Alignment der pAC mit den verwandten homodimeren ACn von Pro- und niederen Eukaryoten (Abschn. 7.2.2) wird deutlich, daß der ähnliche Bereich wenige AS vor den Klasse III-AC Konsensusmotiven I-IV beginnt und einige AS *downstream* endet. Das Ende der AC-katalytischen Domäne wurde auf das Ende des konservierten Bereichs der pAC mit den cyanobakteriellen ACn bei E741 festgelegt. Für die Festlegung des Beginns der AC-Domäne wurde auf spätere experimentelle Ergebnisse mit der CyaB1 von *Ana.sp.* zurückgegriffen. Arbeiten mit dieser AC (im Weiteren bezeichnet als *AnaCyaB1*; Gesamtlänge AS 1-859) von Jürgen Linder und Tobias Kanacher besaßen aufgrund der hohen Ähnlichkeit zur pAC modellhaften Charakter für Experimente mit der pAC.

Jürgen Linder (51) führte am Enzym AnaCyaB1 Verkürzungen ein, die die N-terminale Regulator-domäne entfernten und unterschiedlich lange AS-Abschnitte vor dem AC-Konsensusblock I stehen ließen (vgl. hierzu Abschn. 4.4.1). Von den getesteten Homogenaten zeigte das Konstrukt ab AS 595 (GERKEVTVLFSDIR...) (9AS upstream des hochkonservierten F 604 des Konsensusblocks I) die höchste Aktivität, wobei auf eine Analyse der Expressionsrate und der Löslichkeit verzichtet wurde.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der katalytischen Bereiche der *AnaCyaB1* und pAC wurde der Beginn des katalytischen Bereichs der pAC auf 530-GKRKWAIYGFCDIR... festgelegt.

Ergebnisse

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value	Spezies/AC ³⁷
gi 17229758 ref NP_486306.1 	(NC_003272) adenylate Cyclase ...	84	6e-15	<i>AnaspCyaB1*</i>
gi 1169150 sp P43524 CYAA_ANACY	ADENYLATE CYCLASE (ATP PYRO...	83	1e-14	<i>AnacyCyaA *</i>
gi 15639476 ref NP_218926.1 	(NC_000919) adenylate cyclase ...	73	1e-11	<i>TrepaAC *</i>
gi 16265216 ref NP_438008.1 	(NC_003078) putative adenylate...	73	1e-11	<i>Sinme</i>
gi 17229396 ref NP_485944.1 	(NC_003272) adenylate cyclase ...	71	4e-11	<i>NosspCyaB2</i>
gi 1754640 dbj BAA13999.1 	(D89624) adenylate cyclase [Anab...	70	1e-10	<i>AnaspCyaB2</i>
gi 15890956 ref NP_356628.1 	(NC_003063) AGR_L_1679p [Agrob...	67	9e-10	<i>Agrtu</i>
gi 15965714 ref NP_386067.1 	(NC_003047) PUTATIVE ADENYLATE...	67	1e-09	<i>Sinme</i>
gi 15889837 ref NP_355518.1 	(NC_003062) AGR_C_4673p [Agrob...	65	3e-09	<i>Agrtu</i>
gi 14209675 gb AAK56849.1 AF292554_1	(AF292554) putative ad...	60	1e-07	<i>Thiro</i>
gi 5737842 gb AAD50121.1 AF153362_1	(AF153362) adenylyl cyc...	59	2e-07	<i>DicdiAC</i>
gi 15966612 ref NP_386965.1 	(NC_003047) PUTATIVE ADENYLATE...	58	5e-07	<i>Sinme</i>
gi 16265162 ref NP_437954.1 	(NC_003078) putative adenylate...	58	5e-07	<i>Sinme</i>
gi 2575805 dbj BAA22996.1 	(D49530) adenylate cyclase [Spir...	55	2e-06	<i>Spipl AC1*</i>
gi 6014766 sp P40137 CYAA_STIAU	ADENYLATE CYCLASE 1 (ATP PY...	53	1e-05	<i>StiauCyaA *</i>
gi 15966204 ref NP_386557.1 	(NC_003047) PUTATIVE ADENYLATE...	52	2e-05	<i>Sinme</i>
gi 95175 pir B35266	adenylate cyclase (EC 4.6.1.1) - Rhizo...	52	2e-05	<i>Rhime AC1*</i>
gi 15964012 ref NP_384365.1 	(NC_003047) ADENYLATE CYCLASE ...	52	2e-05	<i>Sinme</i>
gi 16263053 ref NP_435846.1 	(NC_003037) Probable adenylate...	52	3e-05	<i>Sinme</i>
gi 17228613 ref NP_485161.1 	(NC_003272) adenylate cyclase ...	51	6e-05	<i>NosspCyaA *</i>
gi 16263995 ref NP_436787.1 	(NC_003078) putative adenylate...	50	1e-04	<i>Sinme</i>
gi 16330472 ref NP_441200.1 	(NC_000911) adenylate cyclase ...	49	2e-04	<i>SynspAC *</i>
gi 6166050 sp P40138 CYAB_STIAU	ADENYLATE CYCLASE 2 (ATP PY...	49	2e-04	<i>StiauCyaB *</i>
gi 15598413 ref NP_251907.1 	(NC_002516) probable adenylate...	49	2e-04	<i>Pseae</i>
gi 12060475 dbj BAB20624.1 	(AB052847) adenylate cyclase [T...	47	0.001	<i>Theel</i>
gi 7470942 pir T17197	adenylate cyclase homolog - Spirulin...	43	0.014	<i>Spipl *</i>
gi 13473854 ref NP_105422.1 	(NC_002678) adenylate cyclase ...	41	0.063	<i>Meslo</i>
gi 15608460 ref NP_215836.1 	(NC_000962) hypothetical prote...	40	0.081	<i>Myctu</i>

>[gi|17229758|ref|NP_486306.1|](#) (NC_003272) adenylate cyclase [Nostoc sp. PCC 7120]
[gi|15553050|dbj|BAA13998.2|](#) (D89623) adenylate cyclase [Anabaena sp.]
[gi|17131357|dbj|BAB73965.1|](#) (AP003588) adenylate cyclase [Nostoc sp. PCC 7120]
 Length = 859

Score = 84.0 bits (206), Expect = 6e-15

Identities = 61/215 (28%), Positives = 107/215 (49%), Gaps = 27/215 (12%)

Query: 525 DPMLPGKRKWAIFYGFCDIRNFTDATEVL-QKDVMLFVNNIAEIVHSMVDYRQGSANKNIG 583
 D ++ G+RK F DIR +T TE L +V+ +N E + V Y+G+ +K IG
 Sbjct: 590 DALMVGGERKEVTVLFSDIRGYTTLTENLGAAEVVSLLNQYFETMVEAVFNYEGTLDKFIG 649

Query: 584 DAFLLVWKINDSQWYEDGNEIKWSNLTFINQLADCALIAFMKIYAKINREPKILEYRNDE 643
 DA + V F L A+ + + ++ ++ E+ N
 Sbjct: 650 DALMAV-----FGAPLPLTENHAWQAVQSALDMRQRLKEF-NQR 687

Query: 644 RLSQRLPGYKVKMGFGLHIGWIEGAIGSEFKIDASYLSPNVNMMASRLAATKQYGVAVL 703
 R+ Q P ++K+G G+ G + G IGS ++D + + VN++SRLE TK+YG ++
 Sbjct: 688 RIIQAQP--QIKIGIGISSGEVVGSGNIGSHKRMDDYTVIGDGNLSSRLETVTKEYGCDII 745

Query: 704 ISSELHQYFSNEVKKYTRQIDKVTVKGSVKPIGLF 738
 +S +Q S+ + + RQ+DK+ VKG + + ++
 Sbjct: 746 LSEFTYQLCSMRI--WVRQLDKIRVKGKHQAVNIY 778

Abbildung 12: Ergebnis der *blastp*-Datenbanksuche (NCBI) (Jan. 2002). Gezeigt sind die Treffer bis zu einem *Expect-Value* $\leq 10^{-2}$. Von den Alignments ist stellvertretend das Alignment der pAC mit *AnaspCyaB1* aufgenommen worden (vollständiges *blastp*-Ergebnis s. Abschn. 7.1). Einträge, die zur Zeit der Beendigung der Klonierung des pAC-Gens (März 1999) bereits im *blastp*-Ergebnis vorhanden waren, sind mit Sternchen* hinter der Spezies/AC gekennzeichnet. Die Angaben zu Spezies und AC-Typ sind manuell in diese Liste eingetragen worden

³⁷ Für die Namen der Spezies s. S. V

Pfam-Proteinanalyse

Für weitere Sequenzanalysen wurde die pAC (AS 1-865) einem *Pfam-search* unterzogen. Das Ergebnis ist in *Abbildung 13* als Übersicht dargestellt. Es wurden Ähnlichkeiten der pAC zu vier verschiedenen Proteindomänen aufgezeigt.

Pfam HMM search results, glocal+local alignments merged (Pfam_ls+Pfam_fs)

Model	Seq-from	Seq-to	HMM-from	HMM-to	Score	E-value	Alignment	Description
ion_trans	80	453	1	228	-15.5	0.66	glocal	Ion transport protein
!! guanylate_cyc	526	741	1	226	-16.1	3.6e-06	glocal	Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain
TPR	813	835	12	34	11.3	0.012	local	TPR Domain
sodfe_C	817	830	100	113	2.7	0.82	local	Iron/manganese superoxide dismutases, C-terminal domain

Abbildung 13: Ergebnis des *Pfam-search* (Feb. 2002), durchgeführt bei Embl-Heidelberg. (ion_trans: Ionentransfer-Protein; guanylate_cyc: Guanylatcyclase; TPR: Tetratricopeptid-repeat; sodfe C: Eisen/Magnesium Superoxid-Dismutase, C-terminale Domäne)

Mit der Auflistung der Guanylatcyclase-Familie wurde die Existenz einer Klasse III-Cyclase-Domäne im pAC-Protein bestätigt. Die *Pfam-GC*-Familie enthält sowohl Guanylat- als auch Adenylatcyclasen.

Am C-Terminus wurde eine Domäne (AS 813-833) mit Ähnlichkeit zu einem Tetratricopeptid-repeat (TPR) identifiziert. Diese Proteindomäne vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkungen und besteht in der Regel aus einer degenerierten 34AS-Sequenz, welche gewöhnlich repetitiv vorkommt. Weitere Proteinanalysen und Vergleiche mit TPR-Sequenzen ergaben, daß die pAC-TPR-Domäne die AS 802-835 umfaßt (s. *Abbildung 14*).

```

TPR: domain 1 of 1, from 802 to 835: score 5.8, E = 0.57
      *->aeayynlGnaylklgkydeAiedyekALeldPnn<-*
          + G + lg+++eA +ekA +++Pn+
query   802   FLHQFGQGFGYLLGNWKEAHMLFEKAKQIRPND   835

```

Abbildung 14: Alignment einer TPR-Sequenz mit pAC (AS 802-833); entnommen aus dem Ergebnis eines *Pfam-searches* (Washington University in St.Louis).

Eine Analyse der cyanobakteriellen ACn (Alignment s. Abschn. 7.2.2) ergab, daß AnaCyaB1 und AnaCyaB2 ebenfalls einen singulären Tetratricopeptid-repeat enthalten (AS 795-828 und AS 794-827).

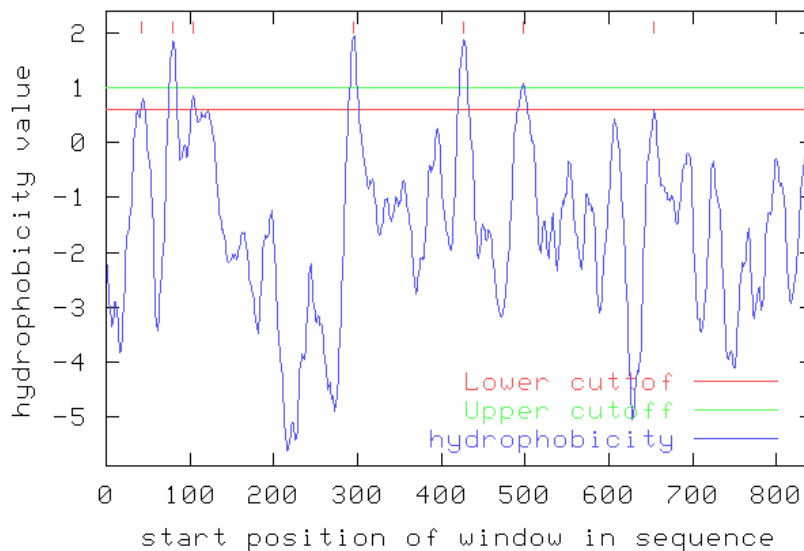
Überschneidend mit dem TPR wurde im Februar 2002 bei der *Pfam*-Suche erstmals eine Ähnlichkeit zu einer Superoxid Dismutase (SOD) (AS 817-830) angezeigt. Angesichts des hohen *Expect-Values* verglichen mit dem des TPR-Motivs und des kurzen ähnlichen Bereichs von nur

14AS (dies bedingt wahrscheinlich u.a. den hohen *E-Value*) wurde dieses Ergebnis nicht weiter in Betracht gezogen.

N-terminal (AS 80-453) konnte im *Pfam-search* eine Ähnlichkeit zu Ionenkanal-Proteinen festgestellt werden. Die *Pfam*-Proteinfamilie „*ion_trans*“ enthält Natrium-, Kalium- und Calcium-Ionenkanäle, die aus 6TM aufgebaut sind. Dieser erste Hinweis auf die Existenz eines Kationen-Kanals stand mit den proteinchemischen Daten von Schultz *et al.* (12) in Einklang. Für die weitere Untersuchung dieser möglichen Ionenkanal-Domäne mußten die transmembranären Bereiche des Proteins bestimmt und ein Datenbankvergleich mit höherer Empfindlichkeit als der bereits erwähnte *blastp-search* durchgeführt werden.

TopPred2 – Vorhersage möglicher transmembranspannender Abschnitte

Die Voraussage möglicher transmembranspannender Bereiche der pAC (AS 1-865) wurde nach dem *TopPred2*-Algorithmus beim Pasteur Institute durchgeführt (Feb. 2002). *Abbildung 15* beinhaltet die Parameter der TM-Bestimmung, den Hydrophobizitätsplot und die gefundenen transmembranären Segmente.



<p>Algorithm specific parameters:</p> <p>Full window size : 21 Core window size : 11 Wedge window size: 5 Using hydrophobicity file: GES-scale</p> <p>Cutoff for certain transmembrane segments: 1.00 Cutoff for putative transmembrane segments: 0.60 Critical distance between 2 transmembrane segments: 2</p> <p>Critical loop length: 60</p> <p>Kingdom: eucaryote</p>	<p>Transmembrane segments</p> <p>Found: 7 segments</p> <p>Candidate membrane-spanning segments:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Helix</th> <th>Begin-End</th> <th>Score</th> <th>Certainty</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>43 - 63</td> <td>0.815</td> <td>Putative</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>80 - 100</td> <td>1.855</td> <td>Certain</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>104 - 124</td> <td>0.863</td> <td>Putative</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>296 - 316</td> <td>1.938</td> <td>Certain</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>427 - 447</td> <td>1.877</td> <td>Certain</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>498 - 518</td> <td>1.092</td> <td>Certain</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>654 - 674</td> <td>0.605</td> <td>Putative</td> </tr> </tbody> </table>	Helix	Begin-End	Score	Certainty	1	43 - 63	0.815	Putative	2	80 - 100	1.855	Certain	3	104 - 124	0.863	Putative	4	296 - 316	1.938	Certain	5	427 - 447	1.877	Certain	6	498 - 518	1.092	Certain	7	654 - 674	0.605	Putative
Helix	Begin-End	Score	Certainty																														
1	43 - 63	0.815	Putative																														
2	80 - 100	1.855	Certain																														
3	104 - 124	0.863	Putative																														
4	296 - 316	1.938	Certain																														
5	427 - 447	1.877	Certain																														
6	498 - 518	1.092	Certain																														
7	654 - 674	0.605	Putative																														

Abbildung 15: Parameter und Ergebnisse der Proteinanalyse mit *TopPred2*

Die im *TopPred2*-Ergebnis angegebenen *TM-Segmente* 1, 2, 3, 4 und 5 wurden als TMs in die vermutete AC-Topologie übernommen.

Das gefundene membranspannende *Segment 7* (AS 654-674) liegt im Bereich der AC-katalytischen Domäne (siehe *blast-search*), welche rein cytosolischen Charakter besitzt und aus diesem Grund ausgeschlossen wurde. Aus der im *Smith/Waterman*-Datenbankvergleich (s.u.) gefundenen Ähnlichkeit zu K^+ -Kanälen ergab sich ein weiterer transmembranärer Proteinabschnitt von AS 157-175. Er stellt den Spannungssensor des Kanals dar und konnte mangels Hydrophobizität (Anhäufung basischer AS) in der *TopPred2*-Analyse nicht als TM eingestuft werden.

Die Ähnlichkeit zu K^+ -Ionenkanälen führte auch zu einer veränderten Interpretation des membranspannenden *Segments* 6. Vermutlich handelt es sich hierbei um den *Pore-Loop*, welcher in die Membran eintaucht und auf der gleichen Membranseite wieder austritt (s.u.).

Letztendlich ergeben sich für das pAC-Protein 6TM gefolgt von einer *loopartigen* Halb-TM. Da der AC-katalytische C-Terminus cytosolischen Charakter besitzt, muß auch der N-Terminus intrazellulär sein, was im Einklang mit dem Aufbau von K^+ -Kanälen steht.

Smith/Waterman-Datenbanksuche

Im Datenbankvergleich mit der pAC nach dem *Smith/Waterman*-Algorithmus zeigen sich neben Ähnlichkeiten zu den bakteriellen ACn, die bereits aus dem *blastp*-Vergleich bekannt waren, Ähnlichkeiten zu Kaliumkanälen. Um die Ergebnisse des Datenbankvergleichs auf den N-terminalen Bereich zu konzentrieren, wurde die *Smith/Waterman*-Suche mit den AS 1-521 wiederholt (Jan. 2002). *Abbildung 18* zeigt einen Ausschnitt aus dem Ergebnis. Zu erkennen sind Ähnlichkeiten zu K^+ -Kanälen vom K_v -Typ (spannungsgesteuerte 6TM-Kanäle). Stellvertretend ist aus dem Ergebnis des *Smith/Waterman*-Datenbankvergleichs das Alignment zwischen pAC und $K_v1.1$ der Maus gezeigt (*Abbildung 17*). Für das vollständige Ergebnis s. Abschn. 7.1.

K_v -Kanäle sind aus 6TM (S1-S6) aufgebaut, C- und N-Terminus sind cytosolisch. S4 besitzt die Funktion eines Spannungssensors. Typisch für diese Struktur sind basische AS (Arginin, z.T. Lysin) in unterschiedlicher Anzahl, die durch jeweils zwei hydrophobe AS getrennt werden: (R/K)XX(R/K)XX(R/K)XX(R/K)XX(R/K). Die positiv geladenen AS, eingebettet in die hydrophobe Membran, reagieren auf Änderungen des Membranpotentials mit einer Verschiebung und damit einer Konformationsänderung des Kanalmoleküls. S5 und S6 sind durch einen *Pore-Loop* verbunden, welcher die Signatur-Sequenz von K^+ -Kanälen beinhaltet. Er bildet eine Halb-TM. (Für einen *review* siehe (52)). K_v -Kanäle bestehen aus nur 2TM, die durch den *Pore-Loop* verbunden sind (s. *Abbildung 16*).

Der homologe Bereich zwischen K_v -Kanälen und der pAC-Proteinsequenz erstreckt sich über AS 64(77)-173. Dieser Bereich beinhaltet pAC-TM2 (AS 80-100) und pAC-TM3 (AS 104-124), welche in etwa auf den entsprechenden K^+ -Kanal-Bereichen zu liegen kommen (vgl. Abschn. 7.2.3 *K⁺-Kanal Alignment*). Anhand der Alignments konnte der Spannungssensor (TM4) der pAC an den Positionen AS 157-175 identifiziert werden. Dem Konsensus entsprechend besitzt in diesem Abschnitt jede 3. AS basischen Charakter. Während die Schleifen zwischen TM4/TM5 (intrazellulär) und TM5/TM6 (extrazellulär) nicht mit K_v -Kanälen alignen, bestehen zwischen den TM-Bereichen 5 und 6 Ähnlichkeiten zu S5 und S6. Ein möglicher *Pore-Loop* befindet sich bei pAC erst *downstream* von TM6: das hydrophobe *Segment S6* der *TopPred2*-Analyse (AS 498-518) trägt ein AS-Motiv (AS 500-507: ALLALGFG), das dem Konsensus der

K⁺-Kanalsignatursequenzen nahe kommt. Daher wurde angenommen, daß dieses Segment den *Pore-Loop* bildet. Der *Linker* zwischen dem *Pore-Loop* als letztem Element des vermuteten K⁺-Kanals und der AC-Domäne ist mit 11AS sehr kurz. Der Aufbau der mutmaßlichen N-terminalen Ionenpore der pAC ist in Abschn. 5.1.2 diskutiert.

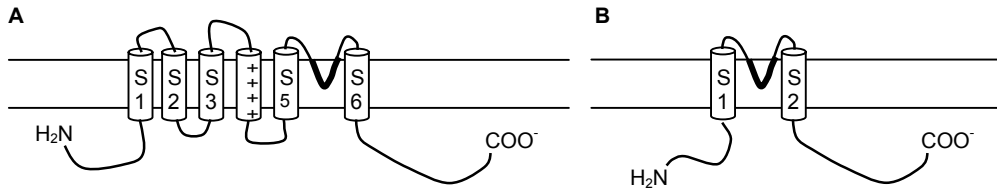


Abbildung 16: Schematische Darstellung von K⁺-Kanälen. A) spannungsgesteuerter K_v-Kanal: S1-S6 sind transmembranäre Bereiche. S4 stellt den Spannungssensor dar. Zwischen S5 und S6 befindet sich der Selektivitätsfilter (*Pore-Loop*). Vier dieser Strukturen lagern sich zu einer Ionenpore zusammen. B) K_{ir}-Kanal: diese K⁺-Kanäle besitzen zwei Membranhelices, welche durch den *Pore-Loop* verbunden sind. Intakte Kanäle sind ebenfalls aus Tetrameren aufgebaut.

```

Sequence name: swall:CIK1_MOUSE
Sequence documentation:
ID   CIK1_MOUSE          STANDARD;          PRT;          495 AA.
AC   P16388;
DT   01-AUG-1990 (Rel. 15, Created)
DT   01-AUG-1990 (Rel. 15, Last sequence update)
DT   15-JUL-1998 (Rel. 36, Last annotation update)
DE   VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL PROTEIN KV1.1 (MK1) (MBK1).
GN   KCNA1.
OS   Mus musculus (Mouse).
OC   Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
OC   Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
Alignment of: EMBOSS_001 x CIK1_MOUSE ..
Alignment segment 1/1:
                Quality:      97.00                Escore:      0
                Matching length:      97                Total length:      113
Matching Percent Similarity:      70.10    Matching Percent Identity:      29.90
Total Percent Similarity:      60.18    Total Percent Identity:      25.66
                Gaps:      2

      64 DDIRIIAFDKRADDGFDVITIICMIIFSIEIII...ASLVRTDYFNSEFFF 110
         |:  :|  ::  |  |  ::  :|:|  ||:|:::  |  :||:|:::
206 DNTTVIYTSNIFTDPFFIVETLCIIWFSFELVVRFFACPSKTDFFKNIMN 255

      111 WLDIISTVVSQILDITSFNIAVGLQGSVAAKSASQLSQANKASKTSSKAIR 160
         ::||::  :  ::  ::::  |:|  ::  :  :  ||  :|
256 FIDIVAIIPYFI.....TLGTEIAEQEGNQKGEQATSLAILR 292

      161 VVRLVRLIRIVKL 173
         |:||||:|  ||
293 VIRLVRFVRFIFKL 305
    
```

Abbildung 17: Stellvertretendes K⁺-Kanal/pAC-Alignment aus der *Smith/Waterman*-Suche.

Score list:	Strd	Orig	ZScore	Escore	Len	!	Documentation	..
Sequence								
swall:O77336	+	102.00	0.00	0.0	4550	!	077336 PFC0425W PROTEIN. 6/2001	
swall:Q9XSP9	+	100.00	0.00	0.0	273	!	Q9XSP9 VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL ISOFORM 4 (FRAGMENT). 6/2001	
swall:Q9NGM0	+	98.00	0.00	0.0	1267	!	Q9NGM0 MYOSIN VI. 9/2001	
swall:CIK1_MOUSE	+	97.00	0.00	0.0	495	!	P16388 VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL PROTEIN KV1.1 (MK1) (MBK1). 7/1998	
swall:CIK1_RAT	+	97.00	0.00	0.0	495	!	P10499 VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL PROTEIN KV1.1 (IA) (RBK1) (RCK1). 7/1998	
swall:Q9DAE0	+	97.00	0.00	0.0	315	!	Q9DAE0 1700012K17RIK PROTEIN. 6/2001	
swall:Q9D2A5	+	97.00	0.00	0.0	370	!	Q9D2A5 5330432F22RIK PROTEIN. 6/2001	
swall:AAK73568	+	97.00	0.00	0.0	315	!	Aak73568 ATTACHES TO CRE. 9/2001	
swall:CIK1_HUMAN	+	96.00	0.00	0.0	495	!	Q09470 VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL PROTEIN KV1.1 (HUK1) (HBK1). 8/2001	
swall:Q9DEY6	+	96.00	0.00	0.0	283	!	Q9DEY6 PUTATIVE POTASSIUM CHANNEL KV1 (FRAGMENT). 9/2001	
swall:Q9GPD5	+	95.00	0.00	0.0	771	!	Q9GPD5 ACP36DE (FRAGMENT). 6/2001	
swall:Q9TUK5	+	95.00	0.00	0.0	274	!	Q9TUK5 VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL ISOFORM 5 (FRAGMENT). 6/2001	
swall:Q09078	+	95.00	0.00	0.0	274	!	Q09078 POTASSIUM CHANNEL PROTEIN (CLONE KC4) (FRAGMENT). 6/2001	
swall:Q9N583	+	94.00	0.00	0.0	1724	!	Q9N583 Y110A7A.1 PROTEIN. 10/2000	
swall:Q9GPD8	+	94.00	0.00	0.0	773	!	Q9GPD8 ACP36DE (FRAGMENT). 6/2001	
swall:Q9GPD7	+	94.00	0.00	0.0	770	!	Q9GPD7 ACP36DE (FRAGMENT). 6/2001	
swall:Q9GPD4	+	94.00	0.00	0.0	772	!	Q9GPD4 ACP36DE (FRAGMENT). 6/2001	
swall:Q9GPD3	+	94.00	0.00	0.0	770	!	Q9GPD3 ACP36DE (FRAGMENT). 6/2001	
swall:AAK68883	+	94.00	0.00	0.0	1758	!	Aak68883 HYPOTHETICAL PROTEIN Y110A7A.1B. 10/2001	
swall:Q9VWS5	+	93.00	0.00	0.0	1895	!	Q9VWS5 CG15040 PROTEIN. 6/2001	
swall:Q9VGN4	+	93.00	0.00	0.0	399	!	Q9VGN4 CG14703 PROTEIN. 5/2000	
swall:Q9XSQ0	+	92.00	0.00	0.0	260	!	Q9XSQ0 VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL ISOFORM 1 (FRAGMENT). 6/2001	
swall:CECI_CAEEL	+	91.00	0.00	0.0	304	!	P34618 PROTEIN CEC-1. 8/2001	
swall:MIH_TETH	+	90.00	0.00	0.0	633	!	P40631 MICRONUCLEAR LINKER HISTONE POLYPROTEIN (MIC LH) [CONTAINS: MICRONUCLEAR LINKER HISTONE-BETA; MICRONUCLEAR LINKER HISTONE-DELTA; MICRONUCLEAR LINKER HISTONE-GAMMA]. 8/2001	
swall:O60983	+	90.00	0.00	0.0	1038	!	O60983 REP-LIKE. 5/2000	
swall:Q9GPD6	+	90.00	0.00	0.0	770	!	Q9GPD6 ACP36DE (FRAGMENT). 6/2001	
swall:Q98QA1	+	90.00	0.00	0.0	622	!	Q98QA1 LIPOPROTEIN. 9/2001	
swall:Q16322	+	89.00	0.00	0.0	511	!	Q16322 CYCLIC GMP GATED POTASSIUM CHANNEL. 6/2001	
swall:P91642	+	88.00	0.00	0.0	454	!	P91642 CDK8. 9/2001	
swall:Q96923	+	88.00	0.00	0.0	1087	!	Q96923 GELSOLIN-RELATED PROTEIN. 6/2001	
swall:Q9N4C7	+	88.00	0.00	0.0	252	!	Q9N4C7 HYPOTHETICAL PROTEIN Y76B12C.4. 6/2001	
swall:O35788	+	87.00	0.00	0.0	1339	!	O35788 CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL BETA SUBUNIT. 9/2001	
swall:O44948	+	86.00	0.00	0.0	253	!	O44948 C17F3.3 PROTEIN. 11/1998	
swall:Q9U0J9	+	86.00	0.00	0.0	842	!	Q9U0J9 HYPOTHETICAL 94.5 KDA PROTEIN. 6/2001	
swall:Q91781	+	86.00	0.00	0.0	489	!	Q91781 POTASSIUM CHANNEL. 6/2001	
swall:CIK2_RABIT	+	85.00	0.00	0.0	273	!	Q09081 VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL PROTEIN KV1.2 (KC22) (FRAGMENT). 7/1998	

Abbildung 18: Ergebnis der *Smith/Waterman*-Datenbanksuche mit pAC AS 1-521. Gezeigt sind 36 von 149 Treffern. Für die Suche wurden keine speziellen Parameter eingestellt.

Topologievorschlag

Aus den aufgeführten Proteinanalysen wurde die folgende Topologie für das Paramecium-AC-Protein abgeleitet.

Tabelle 18: Mutmaßliche Proteindomänen der Paramecium-AC

Proteindomäne	Proteinabschnitt
K ⁺ -Kanal	AS 1-518
<i>TM1</i>	AS 43-63
<i>TM2</i>	AS 80-100
<i>TM3</i>	AS 104-124
<i>TM4 (Spannungssensor)</i>	AS 157-175
<i>TM5</i>	AS 296-336
<i>TM6</i>	AS 427-447
<i>Pore-Loop</i>	AS 498-518
AC-Domäne	AS 530-741
TPR-like (TPRL)	AS 802-835

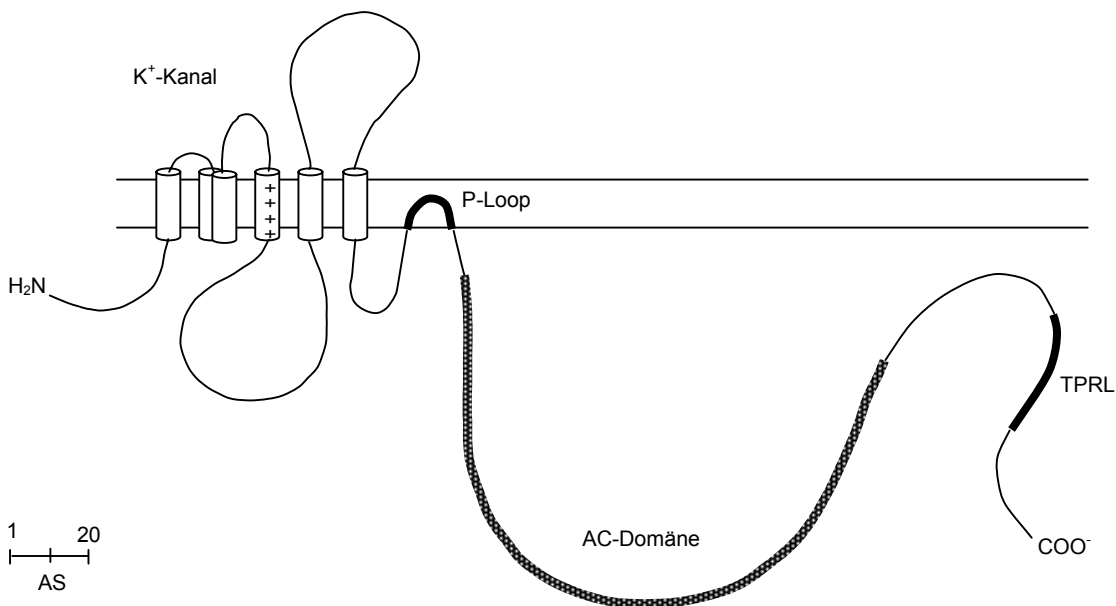


Abbildung 19: Vermutete Topologie der Paramecium-AC. In dem Multidomänenprotein kann man drei funktionelle Abschnitte unterscheiden: a) K⁺-Kanal (AS 1-518), b) Klasse III AC-katalytischer Bereich AS (530-741) und c) TPRL (AS 802-835).

4.3 Resynthese des Gens mit universellem Code

Heterologen Expressionsexperimenten mit dem pAC-Gen wurde die vollständige Resynthese des Gens vorangestellt. Dies erschien aus zwei Gründen sinnvoll. a) Wegen der Abweichungen des Ciliatencodes vom universellen genetischen Code (s. S. 67). Die sehr zeitaufwendige Mutation der 34 TAA- und TAG-Codons konnte durch die Resynthese vermieden werden. b) Erfahrungen im Labor mit der Expression von Paramecium-Genen zeigten, daß die Anpassung der Codonusage auf die Zellkultur für den Expressionserfolg ausschlaggebend sein kann. Die Expression der ParaGC in *HEK293*-Zellen gelang erst nach Anpassung der A/T-reichen Paramecium-Codonusage bestimmter Genabschnitte auf Säuger-Codonusage (1). Durch die Resynthese konnte eine Anpassung der Codonusage des pAC-Gens von 66% A/T-Gehalt (kodierender Bereich) auf Säuger-Codonusage zur Expression in *HEK293* vorgenommen werden.

4.3.1 DNA-Sequenz und allgemeine Synthesestrategie

Der Resynthesepan wurde von Jürgen Linder erstellt. Das pAC-Protein wurde mit einem nicht-degenerierten Säugercode retranslatiert (Software: *DNAstar™*, *EditSeq*). Durch die Einführung von *silent*-Mutationen in die erhaltene DNA-Sequenz wurde a) die Abwesenheit möglicher *Splice*-Stellen sichergestellt und b) die Sequenz an eine geschickte Synthesestrategie angepaßt (Einführung/Entfernung geeigneter Schnittstellen). Darüber hinaus wurden *upstream* des Startcodons eine *Kozak*-Sequenz (53) und eine *Ehe* I-Schnittstelle (bp -12 - -1: **GGC'GCCGCCACC** (*Ehe* I, *Kozak*-Sequenz)), *downstream* des Stopcodons eine *Not* I-Schnittstelle eingeführt.

Das Gen wurde in Anlehnung an die Proteintopologie in 6 Fragmente (Frag. a-f) gegliedert (s. *Tabelle 19*). Je nach Länge der Fragmente wurden diese in insgesamt 13 Unterfragmente von 200-250bp weiter unterteilt. Sowohl die Fragmente, als auch die Unterfragmente schließen jeweils mit einer singulären Schnittstelle ab (Ausnahme: *Mlu* I: zweifach). Die Sequenz des synthetischen pAC-Gens ist in *Abbildung 11* abgedruckt. Für die Synthese wurde jedes der Unterfragmente als ein PCR-Produkt hergestellt. Hierfür wurden die Unterfragmente in je zwei Synthesepriemer (sense/antisense) unterteilt. Es entstanden einzelsträngige Oligonukleotide von 100-160bp Länge, die sich an ihren 3'-Enden um 24bp komplementär überschneiden, so daß an dieser Stelle die gegenseitige Primeranlagerung zu Primer-Dimeren stattfinden konnte. An den 5'-Enden befanden sich die das jeweilige Unterfragment begrenzenden Schnittstellen. Die Synthesepriemer beginnen je 4bp *upstream* dieser Restriktionserkennungssequenzen (vgl. *Abbildung 20*). Die Sequenzen der 26 Synthesepriemer können in Abschn. 2.3.3 nachgelesen werden.

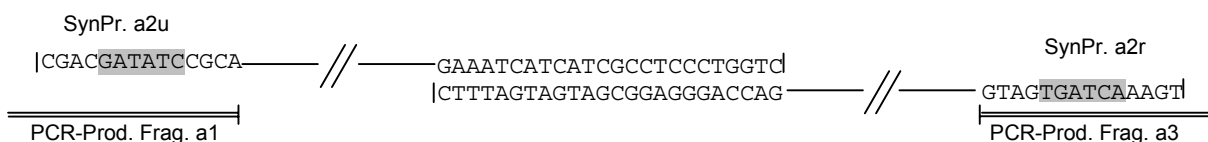


Abbildung 20: Synthetische Konstruktion der Unterfragmente am Beispiel des Fragment a2 (*Eco*R I bis *Spe* I): Die Synthesepriemer (SynPr) a2u und a2r überlappen komplementär mit ihren 3'-Enden um 24bp. An den 5'-Enden stehen sie je 4bp über die Schnittstelle (grau hinterlegt) hinaus. Die PCR-Produkte der benachbarten Unterfragmente überlappen wiederum um den Bereich begrenzenden Schnittstellen + 4bp darüber hinaus.

Tabelle 19: Auflistung der Fragmente und Unterfragmente des synthetischen pAC-Gens (pACsyn), deren Lage auf dem Gen und die für jedes Unterfragment verwendeten Syntheseprimer.

Fragment	Begrenzende Schnittstellen	Gen-Abschnitt	SynPr	Lage SynPr [bp]	PCR-Produkt [bp]
Frag. a	<i>EheI-HindIII</i>	bp -12-548		N-Term. + TM1-TM4	
Frag. a1	<i>EheI-EcoRV</i>	bp -12-195	a1u a1r	-12-105 81-202	-12-202
Frag. a2	<i>EcoRV-SpeI</i>	bp 196-373	a2u a2r	189-300 277-382	189-382
Frag. a3	<i>SpeI-HindIII</i>	bp 374-548	a3u a3r	369-478 455-557	369-557
Frag. b	<i>HindIII-Clal</i>	bp 549-761		Cytosol. Schleife TM4/TM5	
Frag. b1	<i>HindIII-Clal</i>	bp 549-761	b1u b2r	544-672 649-769	544-769
Frag. c	<i>Clal-SacI</i>	bp 762-1181		TM5 + 2/3 extraz. Schleife	
Frag. c1	<i>Clal-MluI</i>	bp 762-990	c1u c1r	756-894 870-999	756-999
Frag. c2	<i>MluI-SacI</i>	bp 991-1181	c2u c2r	986-1103 1080-1186	986-1186
Frag. d	<i>SacI-SalI</i>	bp 1182-1570		Rest extraz. Schleife + TM6 + Pore-Loop	
Frag. d1	<i>SacI-MfeI</i>	bp 1182-1367	d1u d1r	1173-1299 1275-1376	1173-1376
Frag. d2	<i>MfeI-SalI</i>	bp 1368-1570	d2u d2r	1363-1488 1464-1579	1363-1579
Frag. e	<i>SalI-SfuI</i>	bp 1571-2248		katalyt. Bereich	
Frag. e1	<i>SalI-NheI</i>	bp 1571-1842	e1u e1r	1566-1722 1699-1851	1566-1851
Frag. e2	<i>NheI-MluI</i>	bp 1843-2030	e2u e2r	1838-1952 1929-2039	1838-2039
Frag. e3	<i>MluI-SfuI</i>	bp 2031-2248	e3u e3r	2026-2154 2130-2256	2026-2256
Frag. f	<i>SfuI-MscI</i>	bp 2249-2606		Linker + TPRL + C-Term.	
Frag. f1	<i>SfuI-MscI</i>	bp 2249-2420	f1u f1r	2243-2349 2325-2427	2243-2427
Frag. f2	<i>MscI-NotI</i>	bp 2421-2606	f2u f2r	2414-2523 2499-2606	2414-2606

4.3.2 Herstellung und Klonierung der Fragmente

Unterfragmente wurden durch PCR aus den jeweiligen Syntheseprimern amplifiziert, in *EcoR V*-linearisierten, *pBluescript II SK(-)* einkloniert (*pBlue*, $\Delta EcoR V$) und anschließend sequenziert. Die 13 Unterfragmente wurden in *pBluescript II SK (-)* zunächst zu den Hauptfragmenten und diese dann zum vollständigen, synthetischen pAC-Gen zusammengesetzt. Nach jedem Klonierungsschritt wurden die Schnittstellen durch Sequenzierung überprüft. Das synthetische Gen wird mit pACsyn bezeichnet. Eine grafische Darstellung der Klonierungsschritte befindet sich jeweils am Ende der beiden folgenden Kapitel (*Abbildung 21*, *Abbildung 22*).

Frag. a wurde aus den antisense klonierten Unterfragmenten a1, a2 und a3 zusammengesetzt. Das *Spe I/Spe I*-Fragment aus *pBlue*-a3 wurde in den *Spe I*-verdauten Vektor *pBlue*-a2 kloniert. Es resultierte Frag. a2-a3 antisense-orientiert in *pBluescript*, $\Delta EcoR V$. In der anschließenden Klonierung über *Cla I/EcoR V* diente dieses Konstrukt als Vektor, in welchen das *Cla I/EcoR V*-Insert aus *pBlue*-a1 eingesetzt wurde. Das Ergebnis war Frag. a in *pBluescript*, $\Delta EcoR V$ (*pBlue*-Frag.a).

Frag. b wurde direkt aus der PCR erhalten, da es nicht in Unterfragmente unterteilt war. Es wurde in sense-Orientierung kloniert.

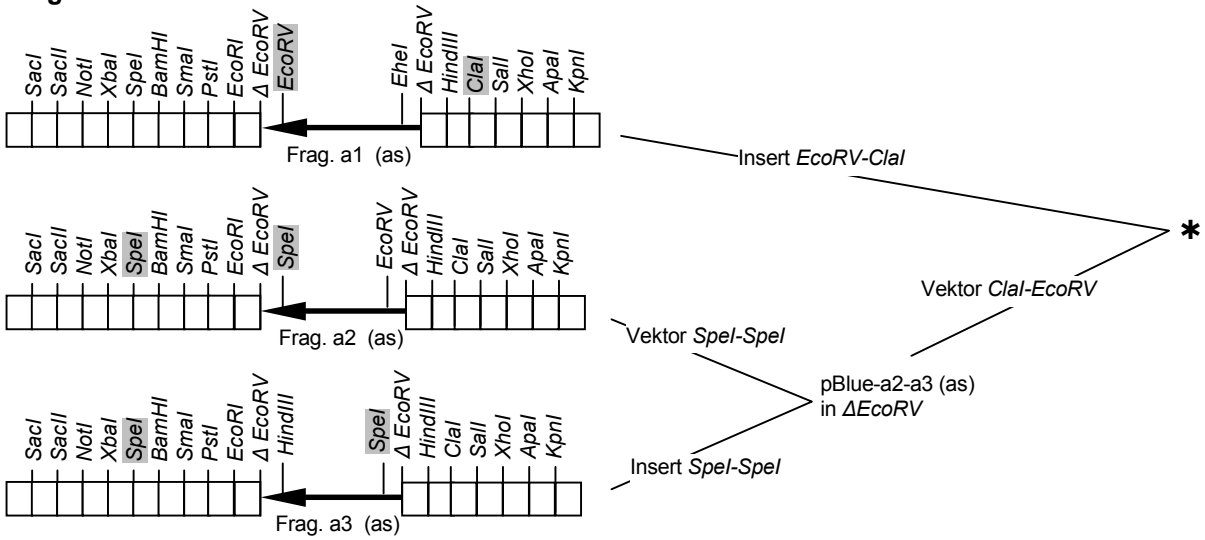
Die Klonierung von **Frag. c** erfolgte aus den in sense-Orientierung klonierten Unterfragmenten c1 und c2. Frag. c1 wurde mit *EcoR I* und *Mlu I* aus dem Vektor geschnitten und in den entsprechend linearisierten *pBlue*-c1-Konstrukt inseriert. Es entstand Frag. c in *pBluescript*, $\Delta EcoR V$.

Die Zusammensetzung von **Frag. d** erfolgte durch einen Klonierungsschritt über die Restriktionschnittstellen *BamH I* und *Mfe I* aus den zwei Unterfragmenten d1 und d2, welche sense-orientiert kloniert waren. Frag. d1 wurde als Insert in das geschnittene Konstrukt *pBlue*-d2 ligiert. Als Produkt wurde Frag. d in sense-Orientierung in *pBluescript*, $\Delta EcoR V$ erhalten.

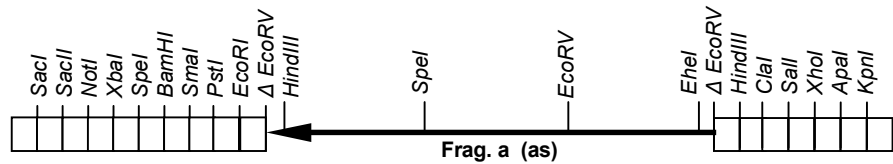
Frag. e (katalytischer Bereich) war aus den drei Unterfragmenten e1, e2 und e3 zusammengesetzt, welche nach der PCR-Klonierung in antisense-Orientierung in *pBluescript* vorlagen. Zunächst wurden e1 und e2 über eine *Nhe I/Sal I*-Klonierung zusammengeführt. Im zweiten Klonierungsschritt diente ein *Mlu I/Sal I*-Fragment dieses Zwischenkonstrukts als Insert und wurde in den *Mlu I/Sal I* verdauten *pBlue*-e3-Konstrukt ligiert. Es resultierte Frag. e antisense-orientiert in *pBluescript* zwischen $\Delta EcoR V$ (restliche *EcoR V*-Erkennungssequenz) und *Sal I*.

Die Zusammensetzung von **Frag. f** geschah in einem Klonierungsschritt aus den Unterfragmenten f1 und f2 (beide antisense kloniert). Das *Not I/Msc I*-Fragment aus *pBlue*-f2 diente bei der Ligation als Insert, der entsprechend verdaute Klon *pBlue*-f1 als Vektor. Das Ergebnis war Frag. f in *pBluescript* (antisense-orientiert) zwischen den Schnittstellen *Not I* und $\Delta EcoR V$.

Frag. a

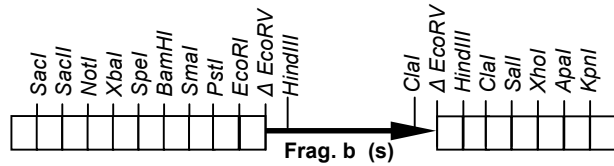


*** pBlue-Frag. a (as):**

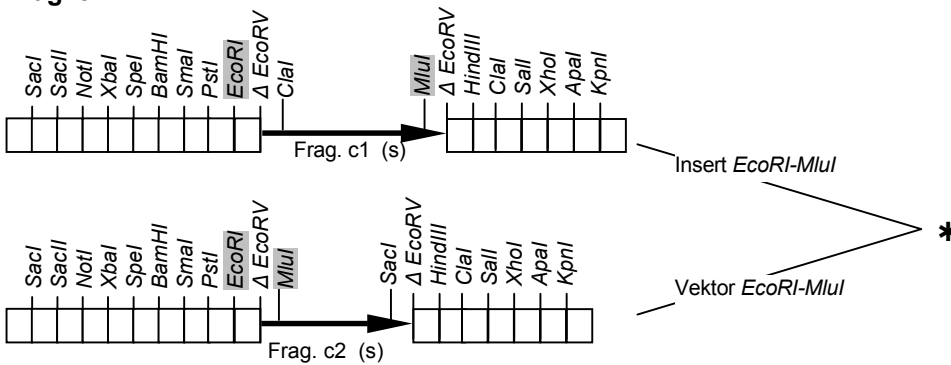


Frag. b

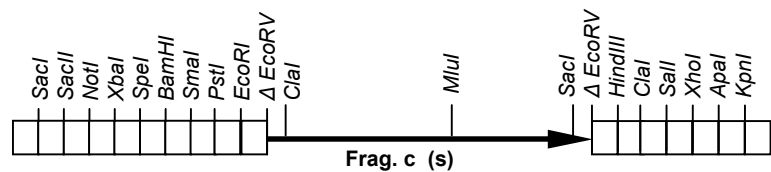
pBlue-Frag. b (s):



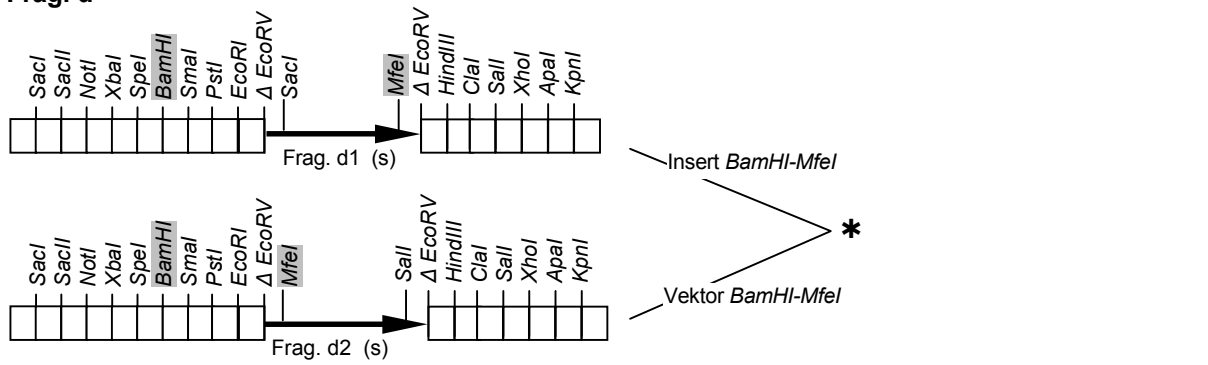
Frag. c



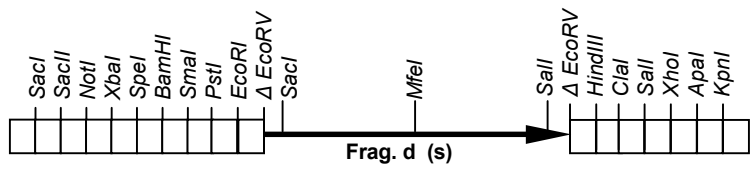
*** pBlue-Frag. c (s):**



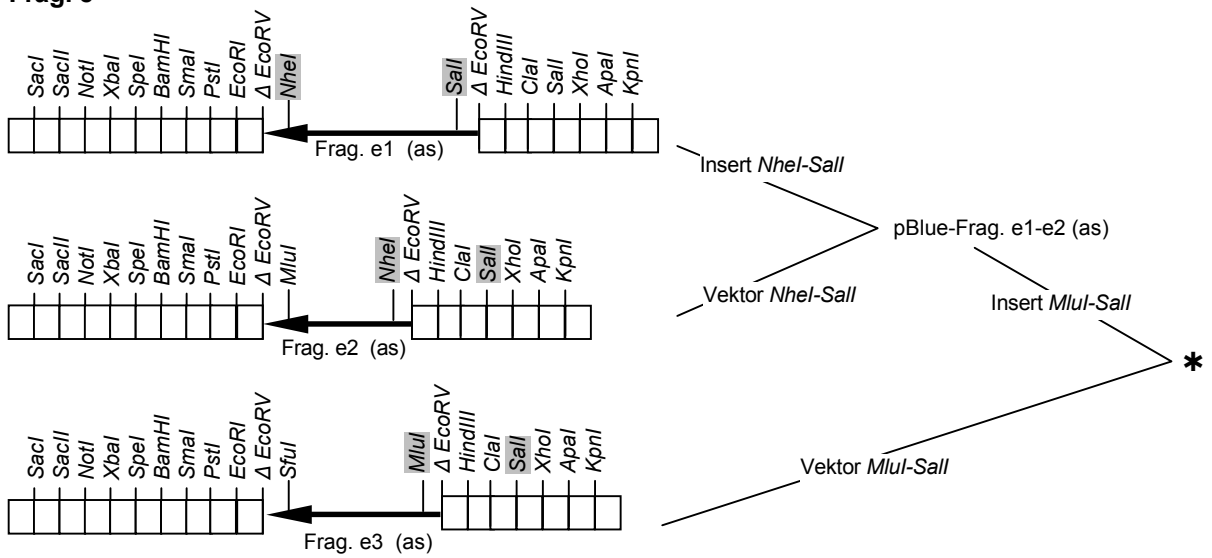
Frag. d



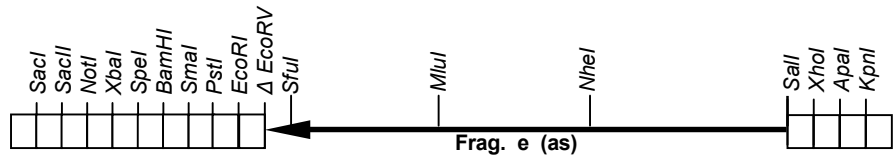
* pBlue-Frag. d (s):



Frag. e



* pBlue-Frag. e (as):



Frag. f

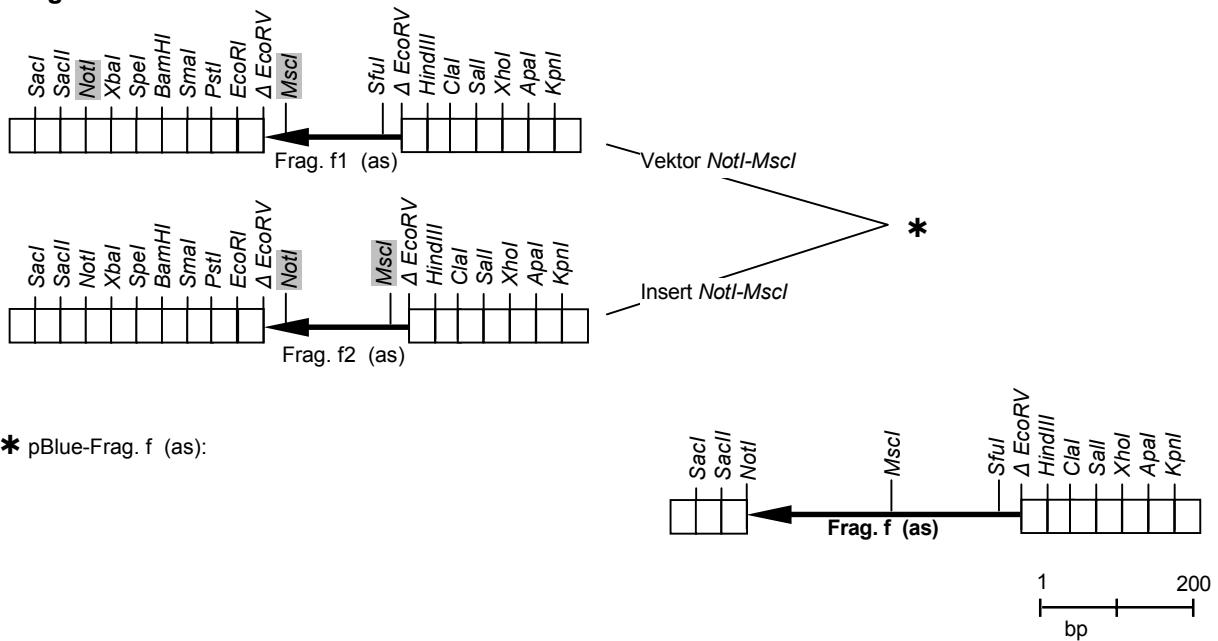


Abbildung 21: Die Grafiken verdeutlichen die Klonierungsstrategie zur Herstellung der pAC-Fragmente. Die kästchenartigen Strukturen stellen die Arme der *Multiple Cloning Site* von *pBluescript II SK(-)* dar und sind nicht maßstabgetreu dargestellt. Die Pfeile symbolisieren die synthetischen DNA-Fragmente und sind zueinander maßstabgetreu. Lediglich die begrenzenden Schnittstellen wurden der Übersichtlichkeit wegen mit zu großem Abstand zum Vektor eingezeichnet.

4.3.3 Zusammensetzung der Fragmente zum Gesamtgen

Die Fragmente a-f wurden über 5 Klonierungsschritte sukzessive zum Gesamtgen pACsyn zusammengesetzt, welches am Ende in antisense-Orientierung im Vektor *pBluescript II SK(-)* vorlag (Schnittstellen: *Not I*- Δ *EcoR V*).

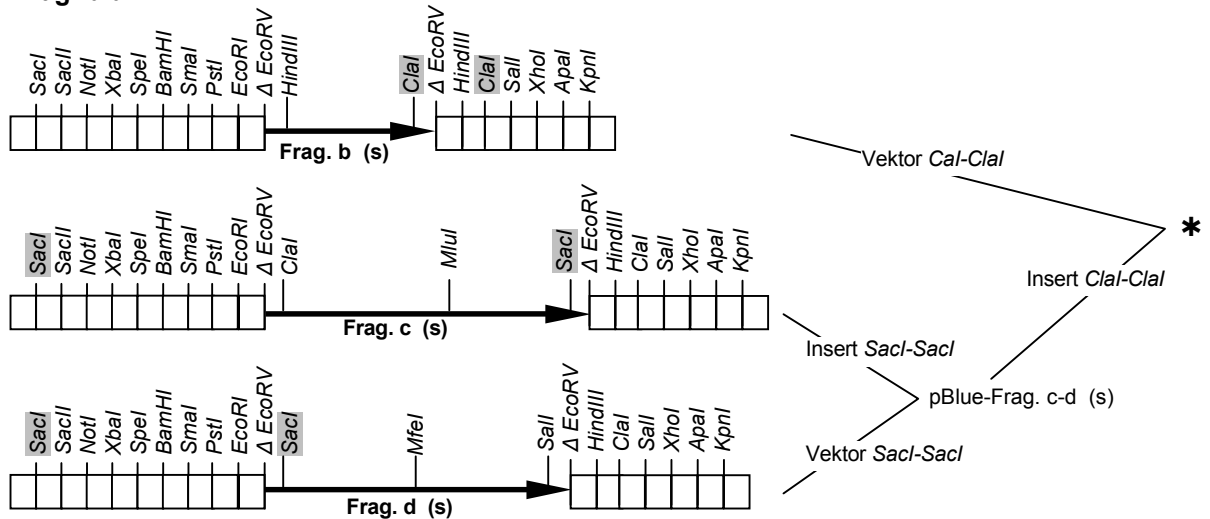
Zunächst wurden die Fragmente b, c und d zusammengeführt. Das *Sac I/Sac I*-Insert aus *pBlue-Frag. c* wurde in den entsprechend linearisierten Vektor *pBlue-Frag. d* ligiert. Aus dem resultierenden Konstrukt *pBlue-Frag. c-d* wurde das Insert durch einen *Cla I/Cla I* Verdau gewonnen und in den *Cla I*-verdauten *pBlue-Frag. b* eingesetzt. Es entstand das vorläufige Konstrukt *pBlue-Frag. b-d* (sense-orientiert), dessen *Hind III/Sal I*-Insert im übernächsten Schritt in die Klonierung eingesetzt wurde.

Die terminalen Fragmente e und f wurden mittels einer *Sfu I/Not I*-Klonierung zusammengeführt, wobei Frag. f als Insert und *pBlue-Frag. e* als Vektor diente. Aus dem Klonierungsprodukt *pBlue-Frag. e-f* gelangte das *Sal I/Not I*-Fragment als Insert in die nächste Klonierung.

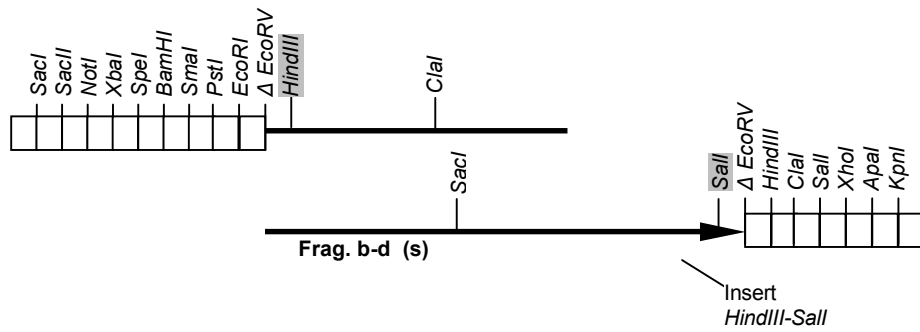
Um die Fragmente b-f zusammzusetzen, wurde eine Tripelligation mit den Inserts *Hind III/Sal I*-Frag. b-d und *Sal I/Not I*-Frag. e-f und dem Vektor *pBluescript*, *Not I/Hind III*-verdaut durchgeführt. Es resultierte das Fragment b-f in antisense-Orientierung eingesetzt in *pBluescript* in die Schnittstellen *Not I* und *Hind III*.

Der letzte Klonierungsschritt zum vollständigen, synthetischen Gen war die Verbindung von Frag. a mit Frag. b-c. Hierfür wurde *pBlue*-Frag. b-f mit *Hind* III geschnitten und das *Hind* III-Fragment aus *pBlue*-Frag. a eingesetzt.

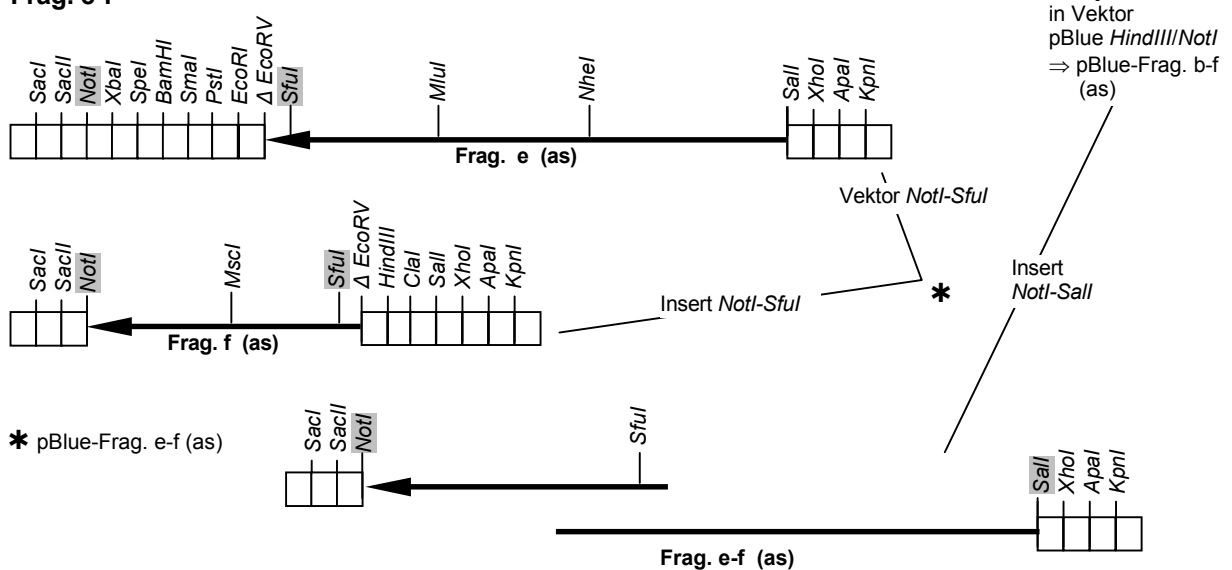
Frag. b-d



*** pBlue-Frag. b-d (s)**



Frag. e-f



Frag. a-f = pACsyn

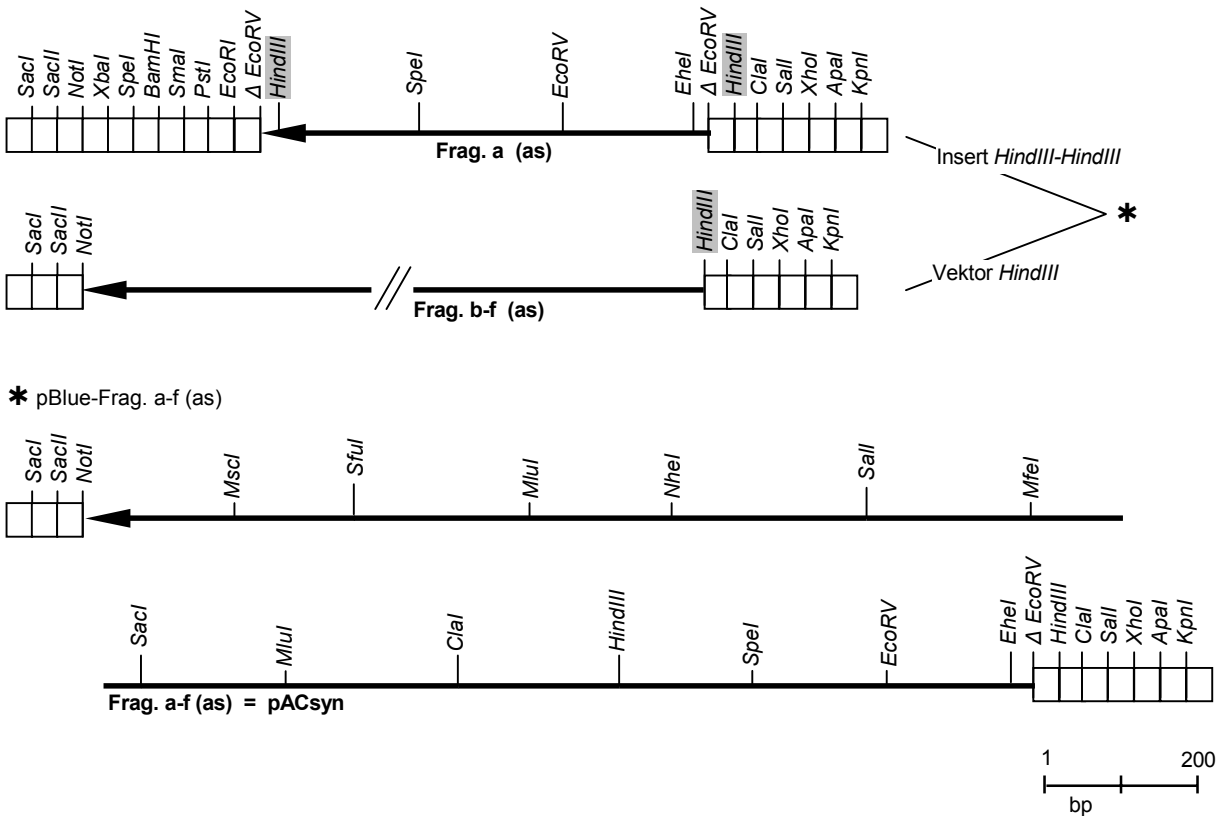


Abbildung 22: Klonierungsschritte für die Zusammensetzung des Gesamtgens pACsyn aus den Fragmenten a, b, c, d, e, f.

4.3.4 Nachträgliche Sequenzmodifikationen im synthetischen Gen

4.3.4.1 Neusynthese von Fragment d

Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Expression des pACsyn-Gens wurde zu einem späteren Zeitpunkt von Jürgen Linder eine Modifikation in Fragment d vorgenommen. Da das variierte synthetische pAC-Gen (bezeichnet als pACsynII) auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, soll die Modifikation an dieser Stelle beschrieben werden.

Begünstigt durch den hohen G/C-Gehalt des synthetischen Gens (Synthesepriemer d2r: G/C-Gehalt 66,4%) kommt es im „Pore-Loop-Bereich“ zu selbstkomplementären Abschnitten. Es besteht die Gefahr, daß sie zu Sekundärstrukturen führen, die sich ungünstig auf den Expressionsprozeß auswirken. Für diesen Abschnitt wurde ein neuer Synthesepriemer (d2rII) entwickelt, bei dem im genannten Bereich (bp 1509-1566) *wobble*-Basen gegen A oder T ausgetauscht wurden (s. *Abbildung 24*). Infolge dessen verschwanden selbstkomplementäre Bereiche und der G/C-Gehalt sank auf 56% (d2rII).

Im 5'-Bereich des Frag. d2 existiert ein kurzer Nukleinsäureabschnitt mit Ähnlichkeit zur Konsensussequenz für 5'-*Splice*-Stellen (vgl. *Abbildung 23*) (bp 1386-1395: GAAGGTGAACC; unterstrichen ist die zur *Splice*-Stelle homologe Sequenz). Diese Sequenz wurde bei der Herstellung des neuen Frag. d mit Hilfe des 40bp-PCR-Primers d2neu2-s entsprechend mutiert (pACsynII bp 1386-1395: **CAAAGTCAACC**).

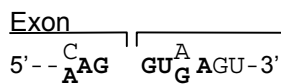


Abbildung 23: 5'-Konsensussequenz von *Splice*-Stellen

Vorgehensweise für die Herstellung des neuen d2-Fragments (Frag. d2neu2): Zunächst wurde mit den Syntheseprimern d2u und d2rII mittels PCR das im *Pore-Loop*-Bereich modifizierte Fragment d2neu amplifiziert und für die Sequenzierung in *pBluescript*, Δ EcoR V kloniert. Dieses Fragment diente in der folgenden PCR als Matrize. Sense-Primer war der oben erwähnte d2neu2-s, der am 5'-Ende des d2neu-Fragments bindet. Als Gegenprimer wurde der spezifisch am 3'-Ende von Frag. d2neu bindende Primer d2neu2-as verwendet. Ergebnis war das PCR-Produkt Frag. d2neu2, welches nach Klonierung in *pBluescript*, Δ EcoR V (*pBlue*-d2neu2) und Sequenzierung durch Tripelligation in das pACsyn-Gen eingesetzt werden konnte:

Insert: Frag. d2neu2, *Mfe* I/*Sal* I aus *pBlue*-d2neu2

Insert: *Sal* I/*Nhe* I-Fragment von pACsyn aus *pBlue*-Frag. a-f

Vektor: *pBlue*-Frag. a-f, *Sal* I/*Nhe* I

Eine einfache Klonierung über *Mfe* I/*Sal* I war wegen des Vorkommens einer zweiten *Sal* I-Schnittstelle in der *Multiple Cloning Site* von *pBluescript* im Konstrukt *pBlue*-Frag. a-f nicht möglich.

```

d2:      AAGCCAATTGACCGCATGATCGTGAAGGTGAACCTGATCGCCAAGAACCCCCAACTGGCG: 1422
d2neu2: AAGCCAATTGACCGCATGATCGTCAAAGTCAACCTGATCGCCAAGAACCCCCAACTGGCG: 1422
prot     K P I D R M I V K V N L I A K N P Q L A: 474

d2:      AAGGAGATGAAGCTGGAGTCCGACGGCAGCAGAGAGACCACCCAAATCGAGAACGCC: 1482
d2neu2:  AAGGAGATGAAGCTGGAGTCCGACGGCAGCAGAGAGACCACCCAAATCGAGAACGCC: 1482
d2rII:   CACCCAAATCGAGAACGCC
prot     K E M K L E S D G T Q K E T T Q I E N A: 494

d2:      ATCATCAAGATCGGCGCACTGCTGGCCCTCGGCTTCGGCGACGCCGGCTCCGCCATCATC: 1542
d2neu2:  ATCATCAAGATCGGCGCACTGCTGGCACTCGGATTCGGAGATGCTGGATCTGCCATCATC: 1542
d2rII:   ATCATCAAGATCGGCGCACTGCTGGCACTCGGATTCGGAGATGCTGGATCTGCCATCATC:
prot     I I K I G A L L A L G F G D A G S A I I: 514

d2:      GGCACCAACATGGCCTCCTCCGGCGACGTTCGACCCCCA: 1579
d2neu2:  GGAACGAACATGGCATCATCTGGAGACGTTCGACCCCCA: 1579
d2rII:   GGAACGAACATGGCATCATCTGGAGACGTTCGACCCCCA:
pro      G T N M A S S G D V D P : 526
  
```

Abbildung 24: Alignment des ursprünglichen Frag. d2 (*d2*), des modifizierten Frag. d2 (*d2neu2*), des Syntheseprimers d2rII (*d2rII*) und der entsprechenden pAC-Proteinsequenz (*prot*). Die Sequenzen der PCR-Primer d2neu2-s und d2neu2-as sind unterstrichen. Die im modifizierten Gen pACsynII veränderten Basen sind grau unterlegt. Die Schnittstellen *Mfe* I und *Sal* I sind fett gedruckt.

4.3.4.2 Stopcodon-Mutante

Eine Möglichkeit Proteinfaltungsprobleme zu minimieren ist die Verringerung der Proteinsyntheserate. Durch den Einsatz nicht optimaler Codonusage kann dies auf Ebene der Translation bewirkt werden.

Für pAC wurde von Jürgen Linder die Originalcodonusage in einem dem Frag. e (bp 1588-2247) entsprechenden Bereich von den universellen Stopcodons TAA und TAG (Paramecium: Q) durch deren Mutation zu CAA und CAG befreit (Durchführung: Anita Schultz). Die erhaltene pAC-Stopcodonmutante war zunächst für die Expression in *E.coli* bestimmt, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit u.a. auch für *Sf9*-Insektenzellkultur Versuche verwendet.

```

StopMut: GGTAACGTAATGGGCAATTTATGGATTTTGTGATATTCGTAATTTCACTGATGCCACT: 1637
prot:    G K R K W A I Y G F C D I R N F T D A T : 549
StopMut: GAAGTCTTGCAAAAAGATGTGATGTTGTTTGTAAATAATATAGCTGAGATTGTTCAATCA: 1687
prot:    E V L Q K D V M L F V N N I A E I V H S : 569
StopMut: ATGGTGGATCGATATCAAGGATCAGCCAATAAAAACATAGGAGATGCATTCCCTATTAGTT: 1737
prot:    M V D R Y Q G S A N K N I G D A F L L V : 589
StopMut: TGGAAAATCAATGATTCTCAATGGTATGAAGATGGGAATGAAATCAAATGGTCCAACCTTG: 1787
prot:    W K I N D S Q W Y E D G N E I K W S N L : 609
StopMut: ACATTCATAAACCAATTAGCTGATTGTGCTCTAATTGCTTTCATGAAGATATATGCTAAG: 1837
prot:    T F I N Q L A D C A L I A F M K I Y A K : 629
StopMut: ATCAATAGAGAACCTAAAATATTAGAATATAGAAATGATGAGAGATTAAGTCAACGTTTG: 1937
prot:    I N R E P K I L E Y R N D E R L S Q R L : 649
StopMut: CCAGGATATAAAGTAAAGATGGGATTCGGATTGCATATAGGATGGGGCATAGAAGGTGCC: 1987
prot:    P G Y K V K M G F G L H I G W G I E G A : 669
StopMut: ATTGGATCAGAATTCAAAATTGATGCCTCTTATCTGAGTCCAAATGTTAATATGGCTTCT: 2037
prot:    I G S E F K I D A S Y L S P N V N M A S : 689
StopMut: CGTTTAGAAGCTGCTACTAAACAATATGGTGTGGCTGTCTTAATCTCAAGCGAATTGCAC: 2087
prot:    R L E A A T K Q Y G V A V L I S S E L H : 709
StopMut: CAATATTTCTCCAATGAAGTCAAGAAATACACCAGACAGATCGATAAAGTCACTGTTAAG: 2137
prot:    Q Y F S N E V K K Y T R Q I D K V T V K : 729
StopMut: GGAAGTGTCAAACCTATTGGGTTGTTCACTGTGGAGATGGAGGCTGATGATCTGCCTCCT: 2237
prot:    G S V K P I G L F T V E M E A D D L P P : 749

```

Abbildung 25: Karte der Stopcodon-Mutante (bp 1588-2247). Im Vergleich zur pAC-Originalsequenz mutierte Nukleotide sind grau hinterlegt.

4.4 Expressionsversuche mit der AC-Domäne von pAC in *E.coli*

Die Adenylatcyclaseaktivität sollte durch heterologe Expression des synthetischen pAC-Gens zunächst in *E.coli* erfolgen.

4.4.1 Verkürzungen des unveränderten, cytosolischen Bereichs

Seit dem ersten Bericht 1995 (54) über die gelungene Expression eines löslichen Säuger-AC-Proteins, welches lediglich aus den cytosolischen AC-Domänen bestand und den Membrananker aussparte, hat sich die Expression von AC-Domänen losgelöst von Regulatoreinheiten oder Membranverankerungen (in verlinkerter oder nicht-gelinkelter Form) etabliert. Für die

Proteinbiosynthese des pAC-Proteins in *E.coli* wurde der C-terminale, cytosolische Bereich verwendet. In *Abbildung 26* ist eine Übersicht über die in *E.coli* exprimierten Konstrukte gezeigt.

Die in *E.coli* exprimierten Konstrukte wurden N-terminal mit einem *Hexahis-tag* fusioniert, welcher durch *pQE30* codiert wird. Die Klonierung in *pQE30* wurde einheitlich für alle Konstrukte über die *BamH* I-Schnittstelle durchgeführt. Durch diese Konstruktion begannen sämtliche Proteine mit dem Polypeptid MRGSHHHHHHGS (GS: AS der *in-frame BamH* I-Schnittstelle).

Da noch keine Daten über die notwendige Anzahl zusätzlicher AS *up-* und *downstream* des konservierten AC-Bereichs (Konsensusblocks I-IV) existierten, wurde Frag. e (bp 1570-2253) des synthetischen Gens ausgewählt, dessen korrespondierender Proteinbereich 15AS *upstream* des hochkonservierten F539 (Konsensusblock I) beginnt und 10AS *downstream* des postulierten Endes der pAC-Domäne (E741) endet (AS 524-751; 27,3kDa). Für die Klonierung wurde mittels PCR *upstream* des Fragments eine *BamH* I-Schnittstelle und *downstream* ein Stopcodon gefolgt von einer *BamH* I-Schnittstelle eingeführt (PCR-Primer: ACpQE830s / ACpQE830as). Das beschriebene Plasmid *pQE30-pAC-Frag. e* (AS 524-751) fand auch Anwendung in der Herstellung des Antigens für die Gewinnung der Anti-pAC-Antisera (s. Abschn. 4.10.1).

Biosyntheseversuche des katalytischen Bereichs wurden in *E.coli M15* und *E.coli BL21 (DE3) [pRep4]* durchgeführt. Für die jeweils ersten Enzymtests wurden die 48000xg-Überstände der Zellysate verwendet. Von den Lysat-Überständen der *M15*-Expressionskultur wurden steigende Mengen in den Adenylatcyclase-Enzymtest eingesetzt (103µg, 207µg, 414µg Gesamtprotein), der mit 2mM Mn²⁺ bei 37°C durchgeführt wurde. In keinem Fall konnte eine Aktivität über dem Kontrollwert³⁸ gemessen werden. Das SDS-PAGE-Gel zeigte, daß eine deutliche Überexpression stattgefunden hatte, das Produkt jedoch wahrscheinlich nicht in den Überstand gelangt, sondern als *inclusion-bodies* vorlag.

Das Experiment wurde in *BL21 (DE2) [pRep4]* wiederholt, wobei verschiedene Expressionszeiten (1, 2, 3, 4 und 5 Std.) getestet wurden. Dieser Versuch sollte zeigen, ob nach kurzer Expressionszeit, wenn erst geringe Mengen Protein entstanden waren, nennenswerte Mengen im Überstand vorhanden waren. Negativkontrolle war eine nicht-induzierte Kultur, die dem 5 Std.-Protokoll unterzogen wurde. Der Enzymtest (2mM Mn²⁺, 37°C, 100µg Gesamtprotein) ergab Werte im Bereich der Kontrolle. Das SDS-PAGE-Gel zeigte bei allen Proben eine starke Expression im Gesamtzellysat, die entsprechende Bande in den Überständen sind möglicherweise schwach vorhanden, eine klare Aussage konnte ohne Western Blot nicht getroffen werden. Zur Zeit dieses Experiments standen dafür noch keine Antikörper zur Verfügung.

³⁸ Als Negativkontrolle diente bei diesen Tests zu Beginn der Arbeit eine Expressionskultur, die das rekombinierte Plasmid mit dem entsprechenden AC-Teilgen enthielt, aber nicht induziert wurde.

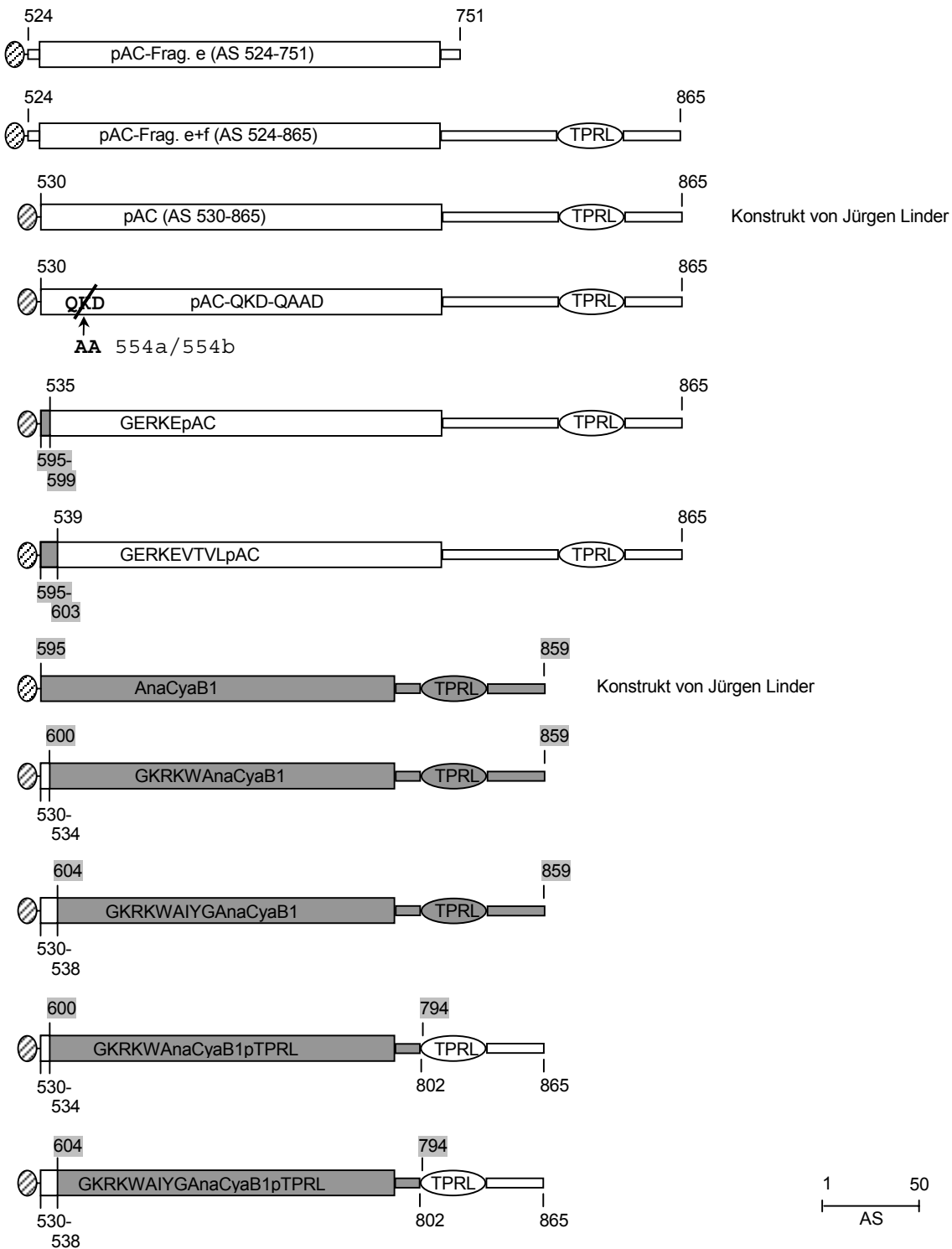


Abbildung 26: Übersicht über die in *E.coli* exprimierten Konstrukte. Die beiden Konstrukte von Jürgen Linder wurden der Vollständigkeit wegen aufgenommen. pAC-Proteinabschnitte sind weiß, AnaCyaB1-Proteinabschnitte grau gekennzeichnet. Der *Hexahis-tag* ist durch das schraffierte Oval dargestellt, die katalytische Domäne durch den breiten, rechteckigen Block, der TPRL durch das Oval und Linkerbereiche durch die schmalen, rechteckigen Abschnitte. Die Numerierungen oberhalb der Konstrukte geben die Positionsangaben des den katalytischen Bereich stellenden Enzyms an, die Numerierung unterhalb bezieht sich auf die eingefügten AS des jeweils anderen Proteins. Kloniert wurden die Konstrukte in *pQE30*, welcher den *Hexahis-tag* liefert. Molekulargewicht der Proteine: pAC-Frag. e (524-751): 27,3kDa; pAC-Frag. e+f (524-865): 40,8kDa; pAC (530-865): 40,1kDa; pAC-QKD/QAAD: 40,1kDa; GERKEpAC: 40,1kDa; GER-

KEVTVLpAC: 40,1kDa; AnaCyaB1 (595-859): 32,2kDa; GKRKWAnaCyaB1: 31,6kDa; GKRKWAIYGAnaCyaB1: 31,6kDa; GKRKWAnaCyaB1pTPRL: 31,4kDa; GKRKWAIYGAnaCyaB1pTPRL: 31,4kDa.

Dieses Ergebnis warf die Frage nach der Rolle des TPRL als potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungsdomäne für die Dimerisierung der katalytischen Schleifen und damit für die Enzymaktivität auf. Auch die starke Konservativität des C-Terminus (letzte 15-17AS) zwischen TPRL-tragenden ACn (AnaCyaB1 und -CyaB2 und pAC) läßt eine Funktion dieser letzten 15-17AS vermuten, die möglicherweise einen Effekt auf die enzymatische Aktivität besitzt. Aus diesen Überlegungen heraus wurde Frag. e+f (bp 1570-2606) in pQE30 für die Expression in *E.coli* kloniert. Dieser Genabschnitt codiert für die gesamte cytosolische Schleife ab 5AS downstream des vermuteten Austritts aus der Membran (AS 524-865; 40,8kDa). Für die Klonierung wurde Frag. f über die Schnittstellen *Sfu* I (bp 2248)/*Sac* I (MCS pBlue) aus pBlue-Frag. a-f in pQE30-Frag. e übertragen. Um die Geschwindigkeit der Proteinsynthese in *E.coli* BL21 (DE3) [pRep4] zu variieren, wurde mit steigenden Mengen IPTG induziert (10µM, 20µM, 30µM). In der Anwuchsphase wurde dem Medium 1% Glucose zugesetzt. Die Negativkontrolle wuchs durchgehend unter Anwesenheit von Glucose und wurde nicht induziert. Einer weiteren Kultur wurde zum Zeitpunkt der Induktion kein IPTG zugesetzt, sondern nur das glucosehaltige Medium gegen glucosefreies ausgetauscht, wie dies bei sämtlichen induzierten Kulturen durchgeführt wurde. Der AC-Test (5mM Mn²⁺, kein KCl, 37°C, 96-125µg Gesamtprotein aus Lysat-Überständen) fiel negativ aus.

Zu diesem Zeitpunkt begann die modellhafte Untersuchung der stark ähnlichen AnaCyaB1. In E.coli exprimiert wurden von Jürgen Linder die C-terminalen Peptide ab AS 560, AS 572, AS 589, AS 595 (GERKEVTVLFSDIR...) und AS 600 bis jeweils AS 859. Die höchste Aktivität wurde im Lysat-Überstand des Peptids ab AS 595 gefunden, wobei auf die Analyse der Expressionsrate und der Löslichkeit verzichtet wurde. Für die Übertragung auf die Arbeiten mit pAC war die beste funktionelle Exprimierbarkeit ausschlaggebend. Die weitere Verkürzung der AnaCyaB1 bis AS 600 (exprimiertes Produkt: AS 600-859) führte zu blank-Werten im AC-Enzymtest des Lysat-Überstands, so daß der Beginn der katalytischen Domäne auf AS 595 festgelegt wurde.

An dem AnaCyaB1-Peptid ab AS 595 wurden außerdem Untersuchungen bezüglich der Bedeutung des TPRL (AS 795-828) durchgeführt (Jürgen Linder): es wurden Verkürzungen des Proteins am C-Terminus durchgeführt, die den TPRL und unterschiedlich lange Linkerabschnitte entfernten (exprimierte Konstrukte: AS 595-792, AS 595-786, AS 595-781). Darüber hinaus wurde ein chimäres Protein hergestellt, bei welchem der AnaCyaB1-TPRL inklusive C-Terminus durch den TPRL inklusive C-Terminus von pAC ersetzt wurde (AnaCyaB1-pTPRL³⁹). Sämtliche Verkürzungen führten zu inclusion bodies, während das Chimär noch ca. 60% der Wildtyp-Aktivität zeigte. Es wurde geschlossen, daß der TPRL und der konservierte C-Terminus für die korrekte Faltung des Proteins notwendig sind und durch die TPRL-Sequenzen anderer Proteine ersetzbar ist.

Entsprechend wurde das pAC-Peptid AS 530-865 in E.coli exprimiert (Jürgen Linder), konnte aber nicht funktionell erhalten werden. Auch dieser Konstrukt bildete inclusion bodies. Es sei erwähnt, daß während und vor den Modellcharakter besitzenden Versuchen mit AnaCyaB1

³⁹ Aufbau des Konstruktes: AnaCyaB1 595-794/pTPRL 802-865

weitere N- und C-terminale Verkürzungen des cytosolischen pAC-Bereichs analysiert wurden: exprimierte Konstrukte: AS 457-865 (cytosolische Schleife nach TM6, Pore-Loop, cytosolische Schleife mit AC und TPRL), AS 515-865 (beginnt mit den letzten 4AS des Pore-Loop), AS 530-751 (katalytische Domäne zuzüglich 10AS downstream). Auch diese pAC-Peptide wurden in E.coli nur unlöslich exprimiert.

Ein weiterer Versuch (ebenfalls Jürgen Linder) den Anteil löslichen Proteins zu erhöhen, wurde mit einer veränderten Codonusage unternommen. Hierfür wurden in der Original-Parameciumsequenz im Bereich des Frag. e die universellen Stopcodons TAA und TAG (Paramecium: Q) zu CAA und CAG mutiert (vgl. Abschn. 4.3.4) Die Verwendung seltener Codons bewirkt eventuell eine verminderte Translationsgeschwindigkeit und läßt dadurch mehr Zeit für die Proteinfaltung. In dem Konstrukt pQE30-pAC 530-865-stopMut werden die AS 530-749 durch die mutierte Originalsequenz kodiert, die AS 750-865 durch das synthetische Gen. Die Expression in E.coli führte wieder zu inclusion bodies.

Die Gesamtheit dieser Bemühungen führten zu dem Schluß, daß vornehmlich ein Proteinfaltungsproblem vorliegt. Es schlossen sich Experimente an, die Aufschlüsse über den „Problem-bereich“ geben sollten, der zu dem unterschiedlichen Expressionsverhalten von AnaCyaB1 und pAC in E.coli führte.

4.4.2 Expression von Mutanten und Chimären

pAC-Mutanten und Chimären zwischen pAC und AnaCyaB1 sollten Erkenntnisse darüber bringen, welcher Proteinabschnitt im pAC-Protein (cytosolischer Bereich AS 530-865) zu den Faltungsproblemen bei der Proteinsynthese und damit zur Unlöslichkeit des exprimierten Proteins führte. Ein Sequenzvergleich zwischen pAC, AnaCyaB1 und anderen bakteriellen, homodimeren ACn (vgl. 7.2.2 *Alignment der Klasse III-ACn vom cyanobakteriellen Typ*) zeigte einige Längenunterschiede:

- a) Der Linker zwischen AC-Domäne und TPRL ist bei pAC mit 70AS um 57AS länger als der Linker bei AnaCyaB1 und -CyaB2. Dieser Bereich wurde im Rahmen von TPRL-Austauschen zwischen AnaCyaB1 (AS 595-859) und pAC (AS 530-865) von Jürgen Linder untersucht.

Wie oben erwähnt, war im AnaCyaB1-Enzym (AS 595-859) der TPRL inklusive des C-Terminus gegen den Paramecium-TPRL inklusive C-Terminus (pTPRL) austauschbar. Die Schnittstelle lag bei diesem Chimär direkt am TPRL: AnaCyaB1 (AS 595-794) + pTPRL (AS 802-865), d.h. es wurde der kurze Linker von AnaCyaB1 beibehalten. Umgekehrt wurden Chimären hergestellt mit den folgenden Schnittstellen: pAC 530-741/anaTPRL 781-859 (Linker vollständig von AnaCyaB1), pAC 530-747/anaTPRL 787-859, pAC 530-746/anaTPRL 787-859 (der Linker-Bereich, der von pAC in die zwei letzteren Konstrukte eingebracht wird, ist zwischen beiden ACn konserviert, bei AnaCyaB1 liegt der Schnitt 7AS oberhalb des TPRL). Zusammengefaßt ist bei allen drei Konstrukten der Linkerbereich etwa auf AnaCyaB1-Länge gekürzt. Die Expression aller drei Konstrukte führte zu inclusion bodies.

- b) Der Abstand zwischen Konsensusblock II und III scheint unter den Klasse III-ACn recht variabel. Dennoch fällt die pAC durch einen besonders langen Übergang von 63AS auf, während die verwandten ACn eine Länge von rund 40AS aufweisen. In diesem Ab-

schnitt treten viele geladene AS auf, die bei pAC aufgrund der Länge vermehrt vorhanden sind⁴⁰.

- c) Zwischen Konsensusblock I und II ist die pAC um eine AS kürzer verglichen mit den verwandten (cyano-)bakteriellen ACn. Die Länge in diesem Bereich ist innerhalb der homodimeren ACn und den Säuger-C_{1a}-Schleifen konserviert. Einzige Ausnahme bilden die Hefe-Typ-ACn, welche wie die pAC ebenfalls eine AS kürzer sind. (Die Säuger-C_{2a}-Schleifen sind in diesem Proteinabschnitt i.d.R. 7 (4+3) AS länger, leisten aber in diesem Bereich keinen Beitrag zum katalytischen Zentrum.) Der Unterschied zu der Gruppe der (cyano-)bakteriellen ACn war Anlaß, eine Mutante herzustellen (pAC-QKD/QAAD).

4.4.2.1 Expression der pAC-Mutanten QKD→QAAD

Die katalytische Domäne von pAC ist in Anschluß an Konsensusblock I um eine AS kürzer als die verwandten (cyano-)bakteriellen ACn.

Legt man die Sekundärstruktur der Säuger-AC-Kristallstruktur zugrunde, befindet sich an dieser Stelle der Übergang von den Helices α_1 nach α_2 , deren verbindender *Loop* bei den C_{1a}-Schleifen kaum vorhanden zu sein scheint.

Die in Anschluß an Konsensusblock I verkürzte Primärstruktur von pAC wurde durch Einführung der Mutation K554 nach AA554a/554b in pAC (AS 530-865) in ihrer Länge an die bakteriellen ACn angeglichen. Die Mutation wurde mit Hilfe des PCR-Primers ParAC-QKD-QAAD (sense-Primer) eingeführt, der für die AS-Sequenz (K)LQAADVMLFV codiert, wobei die Codons für LQ eine *Pst* I-Schnittstelle entsprechend dem synthetischen pAC-Gen tragen, während die 18bp am 3'-Ende der Primersequenz der Stopcodon-Mutanten entsprechen. Gegenprimer war pACs-4as, welcher spezifisch im 5'-Bereich des Frag. f bindet. Als Matrize diente pQE30-pAC 530-865-stopMut. Das Produkt wurde durch eine *Pst* I/*Sfu* I-Klonierung in pQE30(Δ PstI)-pAC 530-865⁴¹ eingesetzt, so daß die AS GKRKWAIIYGFCDIRNFTDATEVLQ vom synthetischen Gen codiert werden und das restliche Frag. e durch die Stopcodon-mutierte Originalsequenz. Frag. f entspricht dann wieder dem pACsyn-Gen (wie pQE30-pAC 530-865-stopMut).

Die Lysat-Überstände einer „langsamen Expression“ in *E. coli* BL21 (DE3) [*pRep4*] zeigten im Enzymtest gegenüber dem Kontrollwert (pQE30 Leervektor) eine erhöhte spezifische Aktivität (pQE-leer: 5pmol/mg/min; pAC-QKD/QAAD: 10,7pmol/mg/min). Sie übersteigt aber den Bereich des zweifachen Basalwert nicht deutlich. Bei diesem Versuch konnten erstmals größere Proteinmengen im Zentrifugationsüberstand erhalten werden. Im Western Blot (s. *Abbildung 30*) der Lysat-Überstände scheint die Bande ca. 1/5 der löslichen Proteinmenge der Positivkontrolle AnaCyaB1 (AS 595-859) zu enthalten. Im SDS-PAGE-Gel ist die Bande nicht er-

⁴⁰ Adressiert wurde dieser Bereich durch *cross-over*-Konstrukte von Jürgen Linder, die direkt nach Konsensusblock II ansetzten. Diese Chimären, deren Expression ebenfalls zur Bildung von *inclusion bodies* führte, werden nicht weiter besprochen.

⁴¹ In pQE30(Δ PstI)-pAC 530-865 wurde in der MCS von pQE30 die *Pst* I-Schnittstelle folgendermaßen entfernt: nach einem Restriktionsverdau mit *Sma* I/*Hind* III wurde das Plasmid geglättet und religiert.

kennbar. Der Versuch, das verkürzte Protein durch eine native Reinigung mit Ni-NTA-Agarose aufzukonzentrieren mißlang. Im Eluat war kein Protein vorhanden.

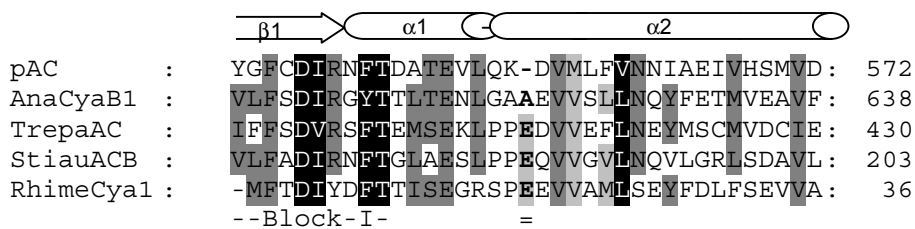


Abbildung 27: Alignment einiger homodimerer ACn vom (cyano-)bakteriellen Typ im Bereich des Konsensusblocks I und einiger AS *downstream*. Die in der pAC-Primärstruktur fehlende AS ist in den verwandten ACn fett gedruckt. Die angedeutete Sekundärstruktur entspricht der Sekundärstruktur der Säuger-AC-Kristallstruktur. Für die genaue Bezeichnung der ACn im Alignment s. S. 181f.

4.4.2.2 pAC-AnaCyaB1-Chimären

Verkürzungsexperimente von Jürgen Linder mit AnaCyaB1 ergaben, daß das Protein AS 595-859 am besten funktionell exprimierbar ist, während bei Verkürzung um weitere 5AS (AS 600-859) keine Enzymaktivität mehr vorhanden war. Dies ließ vermuten, daß die 5AS GERKE (595-599) eine wichtige Rolle spielen und möglicherweise für die Löslichkeit oder die Aktivität des Proteins unabdingbar sind. Der entsprechende Abschnitt in pAC GKRKW (AS 530-534) ist positiv geladen, während bei AnaCyaB1 die Ladungen dieser AS ausgeglichen sind. Aufgrund ihrer Anordnung kommen im β -Faltblatt, wie es laut mammalia-Kristallstruktur für diesen Proteinabschnitt zutreffen würde, je eine saure und eine basische AS auf einer Seite zu liegen. Darüber hinaus findet man bei pAC mit W eine AS mit einem sehr voluminösen, hydrophoben Rest. Diese Unterschiede können einen entscheidenden Einfluß bei der Proteinfaltung besitzen, da diese AS in Anschluß an den *Hexahis-tag* die Proteinkette anführen. Es wurden *cross-over*-Konstrukte ausgearbeitet, bei welchen diese 5AS in den beiden Proteinen jeweils durch das fremde Polypeptid ausgetauscht wurden. Ziel war, zu ermitteln, ob das GERKE-Motiv des aktiven Anabaena-Enzyms einen positiven Einfluß auf die Löslichkeit und die Aktivität des pAC-Proteins (530-865) besitzt, bzw. umgekehrt, ob der Austausch dieser AS im AnaCyaB1-Enzym (595-859) gegen das pAC-Motiv GKRKW in Bezug auf dessen Löslichkeit und Aktivität toleriert wird. Es wurden vier Konstrukte hergestellt, jeweils zwei mit der AnaCyaB1 (AS 595-859) und der pAC (AS 530-865). Bei diesen wurden einmal die ersten 5AS und einmal die ersten 9AS gegen die der jeweils anderen AC ausgetauscht. Um Aufschlüsse über mögliche Wechselwirkungen zwischen dem TPRL oder dem konservierten C-Terminus und den 9AS oberhalb des hochkonservierten F zu erhalten, wurden zwei weitere Konstrukte mit der katalytischen Domäne von AnaCyaB1 mit pTPRL kloniert, bei welchen die ersten 5AS bzw. 9AS gegen die entsprechenden pAC-AS ausgetauscht wurden (vgl. *Abbildung 28*).

Die AS-Austausche wurden durch lange PCR-Primer eingeführt, die für die einzuführenden 5 oder 9AS codierten und im 3'-Bereich 18bp mit der jeweiligen Matrize überlappten. Die sense-Primer enthielten am 5'-Ende zusätzlich eine *BamH I*-Erkennungssequenz. Für die pAC-Konstrukte wurden die Primer GERKEpAC-s bzw. GER-VLpAC-s mit pACQe3, für die

AnaCyaB1-Konstrukte die Primer GKRKWAna-s bzw. GKR-YGAna-s mit ANCB1as eingesetzt. Als Matrize wurde die pAC-Stopcodonmutante bzw. AnaCyaB1 verwendet. Die sequenzierten PCR-Produkte wurden im Fall von pAC über eine *BamH I/EcoR* V-Klonierung in das entsprechend verdaute Konstrukt *pQE30*-pAC (AS 530-865) eingesetzt, im Falle von AnaCyaB1 über eine *BamH I*-Klonierung in *BamH I*-linearisierten *pQE30*. Für die Klonierung der GKRKW(AIYG)AnaCyaB1pTPRL-Chimäre dienten die Konstrukte *pQE30*-GKRKW(AIYG)AnaCyaB1 als Vektor, in die ein *EcoR V/Hind III*-Insert aus *pQE30*-AnaCyaB1pTPRL⁴² eingesetzt wurde.

```
pAC (530-865):      GKRKWAIYGFCDIRNFT-----//-----FLHQFGQ-/-RELTEK.
AnaCyaB1 (595-859): GERKEVTVLFSDIRGYT-----//-----FLFHYHN-/-WTIFTK.

GEKRKEpAC:        GERKEAIYGFCDIRNFT-----//-----FLHQFGQ-/-RELTEK.
GERKEVTVLPAC:     GERKEVTVLFCDIRNFT-----//-----FLHQFGQ-/-RELTEK.

GKRKWAnaCyaB1:    GKRKWVTVLFSDIRGYT-----//-----FLFHYHN-/-WTIFTK.
GKRKWAIYGAnaCyaB1: GKRKWAIYGFSDIRGYT-----//-----FLFHYHN-/-WTIFTK.

GKRKWCyaB1pTPRL:  GKRKWVTVLFSDIRGYT-----//-----FLHQFGQ-/-RELTEK.
GKRKWAIYGCyaB1pTPRL: GKRKWAIYGFSDIRGYT-----//-----FLHQFGQ-/-RELTEK.
```

Abbildung 28: Übersicht über die hergestellten Chimären zwischen pAC und AnaCyaB1.

Zunächst wurden die Konstrukte mit den N-terminalen AS-Austauschen exprimiert und die Lysat-Überstände in einen Adenylatcyclase-Test eingesetzt. Sowohl GERKEpAC (40,1kDa) als auch GERKEVTVLPAC (40,1kDa) zeigten keine Aktivität. In GKRKWAnaCyaB1 (31,6kDa) hingegen wurde der AS-Austausch toleriert, es besitzt ca. 1/3 bis 1/2 der WT-Aktivität. Der Austausch von 9AS in GKRKWAIYGAnaCyaB1 (31,6kDa) hingegen führte zu inaktivem Enzym. Durch die in AnaCyaB1 (595-859) nicht entfernbaren AS GERKE wurde kein positiver Effekt auf pAC ausgeübt werden, während die pAC-AS GKRKW auch nicht zur Unlöslichkeit oder Inaktivität von AnaCyaB1 führten (vgl. *Tabelle 20*). Diese 5AS-Motive können folglich nicht ausschlaggebend sein für die funktionelle Expressierbarkeit der AnaCyaB1 bzw. die nicht funktionelle Expression der pAC. Das SDS-PAGE-Gel zeigte, daß alle Konstrukte etwa gleich stark im Pellet vorkommen, läßt aber bei keinem der Konstrukte lösliches Protein im Überstand erkennen (s. *Abbildung 29*). Aufgrund der eindeutig negativen AC-Test Ergebnisse wurde auf die Durchführung eines Western Blots verzichtet.

Tabelle 20: AC-Test Ergebnisse einiger pAC-AnaCyaB1-Chimären

	<i>pQE30</i> leer	AnaCyaB1 (595-859)	GERKE- pAC	GERKE- VTVL pAC	GKRKW- AnaCyaB1	GKRK- WAIYG- AnaCyaB1
spez. Aktivität pmol/mg/min	6,4	690,6	3,2	8,0	274,8	3,1

⁴² *pQE30*-AnaCyaB1pTPRL ist ein Konstrukt von Jürgen Linder (siehe S.112). Der Paramecium-TPRL ist nahtlos an AnaCyaB1 angefügt, unmittelbar *downstream* des Stopcodons befindet sich eine *Hind III*-Schnittstelle.

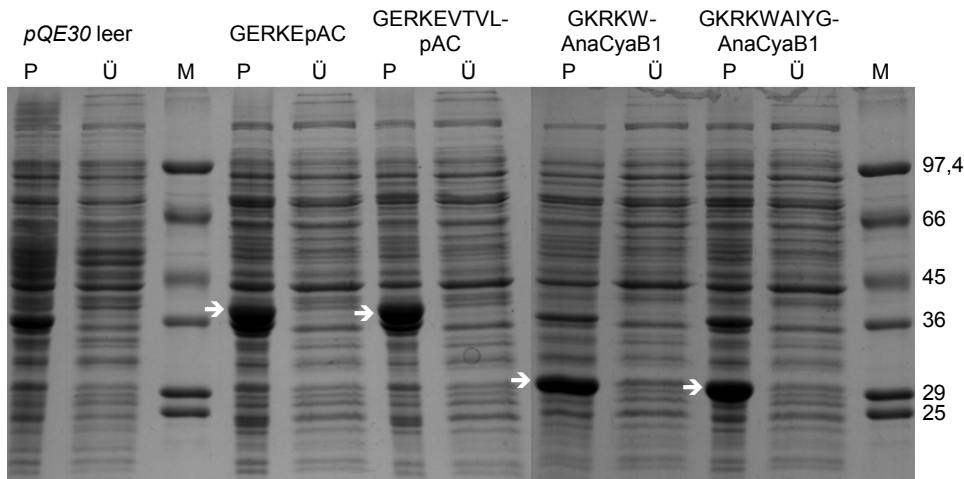


Abbildung 29: SDS-PAGE-Gel der exprimierten pAC-AnaCyaB1-Chimären. Bei allen Konstrukten sind die resuspendierten Pellets (*P*) und die Überstände (*Ü*) aufgetragen. Die Auftragsmenge beträgt bei den Überständen jeweils 40µg Protein. In den Spuren der Pelletproben wurde die Menge unlöslichen Rückstandes aufgetragen, die 40µg löslichen Proteins (Überstand) im Zellysate entspricht. Hierfür wurden die Pellets im ursprünglichen Volumen resuspendiert und das gleiche Volumen wie für 40µg Gesamtprotein des Überstands aufgetragen. *M*: Proteinmarker.

Die Konstrukte GKRKWAnaCyaB1pTPRL (31,4kDa) und GKRKWAIYGAnaCyaB1pTPRL (31,4kDa) wurden parallel zu den Chimären AnaCyaB1pTPRL (31,4kDa) und GKRKWAnaCyaB1 (31,6kDa) exprimiert. Der Western Blot der Überstände zeigte, daß von all diesen Konstrukten auch ein löslicher Anteil im Überstand vorkommt (s. *Abbildung 30*), Aktivität deutlich über Hintergrund konnte für die Chimären mit AS-Austauschen an N- und C-Terminus nicht festgestellt werden (vgl. *Tabelle 21*). Bei einer spezifischen Rückkopplung des TPRL oder C-Terminus an die ersten AS der katalytischen Domäne wäre eine Aktivitätserhöhung durch Einführung des Paramecium-TPRL in die Konstrukte GKRK(WAIYG)AnaCyaB1 zu erwarten gewesen. Aus diesen Daten wurde geschlossen, daß das vermutlich nicht der Fall ist. Die möglicherweise eine Tendenz andeutende leicht erhöhte Aktivität bei GKRKWAnaCyaB1pTPRL wurde aus diesem Grund nicht weiter verfolgt.

Tabelle 21: Ergebnis des AC-Tests (spezifische Aktivität) der AnaCyaB1-Chimären mit pAC-Domänen/-Peptiden.

	<i>pQE30</i> leer	Ana- CyaB1 (595-859)	Ana- CyaB1- pTPRL	GKRKW- Ana- CyaB1	GKRKW- Ana- CyaB1- pTPRL	GKRK- WAIYG- Ana- CyaB1- pTPRL
spezifische Aktivität [pmol/mg/min]	5,0	1697,8	16,9	288,6	12,1	7,6

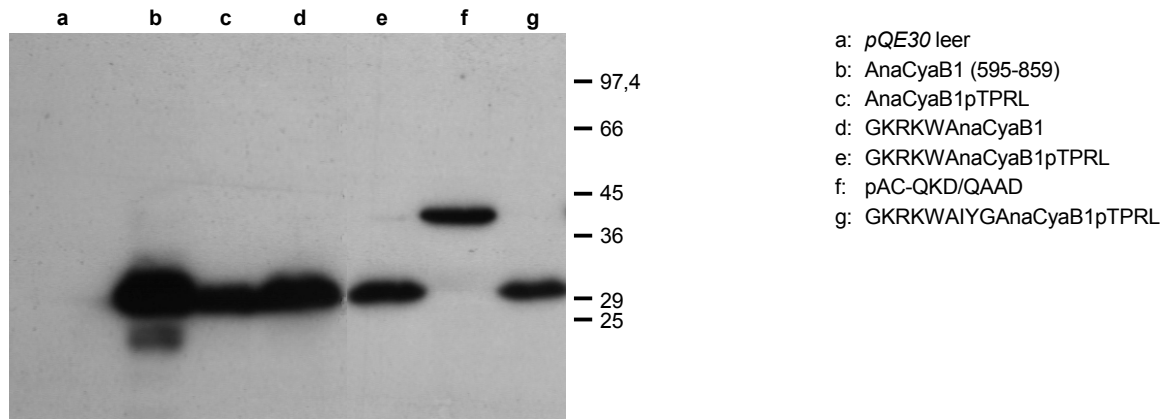


Abbildung 30: Western Blot der AnaCyaB1-pAC-Chimären und der Mutanten pAC-QKD/QAAD. Aufgetragen wurden je 40µg der Lysat-Überstände. Als primärer Antikörper wurde anti-RGS(His)₄ verwendet.

4.5 Heterologe Expression in HEK293

Parallel zu Expressionsexperimenten in *E.coli* wurden Expressionsversuche in *HEK293* durchgeführt. *HEK293* ist eine in diesem Labor etablierte, eukaryotische Zellkultur (1, 55, 56). Eine Übersicht über die transfizierten Konstrukte ist in *Abbildung 31* gegeben.

Für die Arbeiten mit *HEK293* fand der bicistronische Vektor *pIRES1neo* (Clontech) Verwendung, der *downstream* der *MCS* eine *internal ribosome entry site (IRES)* des Encephalomyocarditisvirus (*ECMV*) trägt, so daß die Expression des Gens von Interesse und eines Selektionsmarkers oder Reporterproteins unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors (*CMV*) stehen. Die Ribosomenanlagerung an die bicistronische mRNA erfolgt sowohl am 5'-Ende als auch an der *IRES*. Zellen, die den Selektionsmarker (Neomycinphosphotransferase) exprimieren und eine Selektion mit G418 überleben, besitzen ein Transkript des zu exprimierenden Gens. Voraussetzung ist die genomische Integration. Dieses System macht die klonale Selektion transfizierter Zellen entbehrlich.

Zur Bestimmung der Basalaktivität der Zellen wurde bei jeder Transfektion parallel mit dem entsprechenden Leervektor *pIRES1neo(Δ)* als Negativkontrolle gearbeitet.

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung der Transfektion und Kultivierung wurde eine stabile Zelllinie mit einem bereits positiv getesteten AC-Chimär in *pIRES1neo* von Thomas Seebacher hergestellt (im Weiteren als Positivkontrolle bezeichnet). Im AC-Enzymtest ergaben diese Homogenate eine spezifische Aktivität die etwa 10-15fach über dem Basalwert lag, was die richtige Handhabung der Kultur bestätigte.

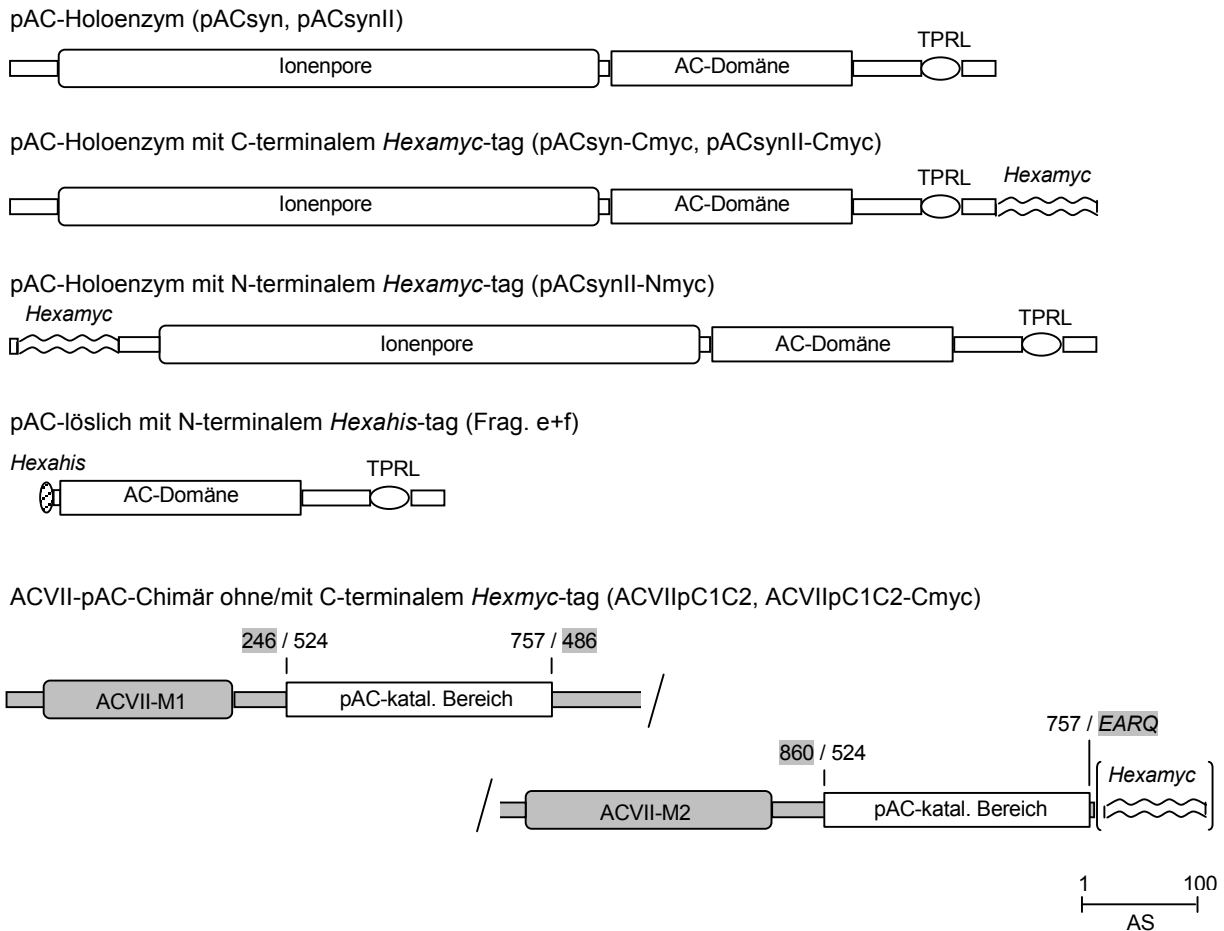


Abbildung 31: Übersicht über die in *HEK293* exprimierte pAC-Konstrukte. Das pAC-Holoenzym, kodiert von dem ursprünglichen synthetischen Gen (pACsyn) und dem synthetischen Gen II (pACsynII) wurde mit und ohne C-/N-terminalem *Hexamyc-tag* transfiziert. Der lösliche Abschnitt des Proteins (Frag. e+f) wurde ebenfalls in *HEK293* versucht zu exprimieren. Darüber hinaus wurde ein Chimär aus dem AC VII-Proteingerüsts mit den pAC-katalytischen Bereichen (ohne und mit C-terminalem *Hexamyc-tag*) hergestellt. Molekulargewichte der Proteine: pACsyn(II): 97,9kDa, pACsyn(II)-Cmyc: 108,7kDa; pACsynII-Nmyc: 108kDa; pAC-Frag. e+f: 40,8kDa; ACVIIpC1C1: 123,7kDa; ACVIIpC1C2-Cmyc: 134,5kDa.

4.5.1 Expression des Holoenzym und des cytosolischen Bereichs

4.5.1.1 Anpassung des Vektors und Klonierung des pACsyn-Gens

Das ursprüngliche Vorhaben, pACsyn *Ehe I/Not I*-geschnitten über die *MCS*-Schnittstellen *EcoRV/Not I* in *pIRES1neo* zu klonieren, erwies sich als nicht sinnvoll, da hierbei ein alternatives Startcodon außerhalb des Leserahmens entstünde:

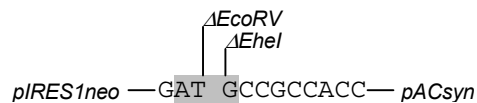


Abbildung 32: Entstehung eines alternativen Startcodons (grau hinterlegt) bei Ligation eines *EcoRV*-Rests auf ein *Ehe I*-Ende.

Für die Ligation in eine der weiter *downstream* liegenden Schnittstellen der MCS mußte der Vektor angepaßt werden, da die Gefahr bestand, daß die zwei G/C-reichen DNA-Abschnitte der *Not* I-Erkennungssequenz und der *Kozak*-Sequenz Sekundärstrukturen auf Ebene der mRNA bilden, was zu einer Beeinträchtigung der Translation führen könnte (57). Durch einen *EcoR* V/*EcoR* I-Verdau wurde das potentiell problematische Fragment aus *pIRES1neo* entfernt, der linearisierte Vektor geglättet und wieder ligiert. Der veränderte Vektor wurde mit *pIRES1neoΔ* bezeichnet (s. *Abbildung 33*).

Das synthetische pAC-Gen wurde für die Klonierung als geglättetes *Ehe* I/*Not* I-Fragment (Ausgangskonstrukt: *pBlue*-Frag. a-f, s. S. 106) in den *Bam*H I-verdauten, geglätteten *pIRES1neoΔ* eingesetzt, das rekombinierte Konstrukt wird mit *pIRESΔ*-pACsyn(II) bezeichnet.

```

900
CGAGCTCGGATCGATAATTCAGTGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTAATTCG
          Clal*           BamHI           BstXI

```

Abbildung 33: Verbleibende MCS des veränderten *pIRES1neo* (*pIRES1neoΔ*). (*EcoR* V/*EcoR* I-verdaut, *gebluntet*, religiert). Die Reste der geglätteten Schnittstellen sind kursiv gedruckt. *Clal* I liegt nach Amplifikation in *dam*⁺-Stämmen methyliert vor.

4.5.1.2 Version 1 des synthetische pAC-Gens in HEK293

Es wurden gleichzeitig zwei unabhängige Transfektionen von *pIRESΔ*-pACsyn in *HEK293* durchgeführt. Mit den ersten Zellhomogenaten wurde der Einfluß des Proteaseinhibitorcocktails *complete*TM *mini* und der Standardpuffersubstanzen Tris und MOPS im AC-Suspensionspuffer auf die mögliche Enzymaktivität getestet. Ebenfalls in Betracht gezogen wurde der Aspekt der Notwendigkeit eines Glycerolzusatzes (10%) in PBS zum Waschen der Kulturen vor deren Ernte. Die Überprüfung des Glycerolzusatzes im Waschpuffer und gleichzeitig die Verwendung eines MOPS-Puffers geschah in Hinblick auf Erfahrungen, die während der proteinchemischen Arbeiten mit der AC-aktiven Cilienfraktion von Paramecien gemacht worden waren. Es hatte sich herausgestellt, daß die Aktivität beim Einfrieren der Cilien nur bei Verwendung eines MOPS-Puffers erhalten werden konnte. Darüber hinaus war zur Stabilisierung des Enzyms ein Glycerolzusatz notwendig. Die AC-Aktivität im Enzymtest der verschiedenen aufbereiteten *HEK*-Homogenate⁴³ entsprach dem Basalwert der Kontrollhomogenate. Eine Expressionskontrolle war mangels eines geeigneten spezifischen Antikörpers nicht möglich. Alternativ wurde die Expression des Reporterproteins GFP von der bicistronischen mRNA untersucht, wodurch Aussagen über das Vorhandensein einer funktionsfähigen, durchgängigen mRNA möglich wurden.

⁴³ Jeweils eine Kulturplatte wurde nach Waschen mit glycerolfreiem PBS mit Tris-haltigem AC-Suspensionspuffer mit und ohne Proteaseinhibitorcocktail homogenisiert. *pIRES1neoΔ*-Leervektor transfizierte Zellen wurden entsprechend behandelt. Die Zellen einer Platte wurden mit glycerolhaltigem PBS gewaschen und in AC-Suspensionspuffer auf MOPS-Basis mit Proteaseinhibitorcocktail aufgearbeitet.

4.5.1.3 GFP-Fluoreszenzuntersuchungen zur Überprüfung der Transkription

pIRES1neo bietet die Möglichkeit der Expression eines Reporterproteins, welches bei Erscheinen die vollständige Transkription der Expressionskassette belegt. Hierfür wird das entsprechende Gen *downstream* der *IRES* anstelle des Selektionsmarkers einkloniert. Von Jürgen Linder wurde mir ein entsprechender *pIRES1neo*-Vektor (*pIRES-GFP*) überlassen. Es wurden folgende Konstrukte transfiziert: *pIRES1neo* (Negativkontrolle), *pIRES-GFP* (Positivkontrolle), *pIRES-GFP-AC V*, *pIRES-GFP-pACsyn*, *pIRES-GFP-pACsynII*. Die Untersuchung des Konstruktes *pIRES-GFP-AC V* wurde als zusätzliche Positivkontrolle durchgeführt, da die Intensität und die Anzahl fluoreszierender Zellen bei Plasmiden mit langem Insert in der *MCS* geringer ist. *pACsynII* war zum Zeitpunkt dieser Untersuchung bereits verfügbar und wurde in das Experiment einbezogen. Es entstanden transient transfizierte Zelllinien, die 45Std. nach Transfektion unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden. Das Ergebnis ist in *Tabelle 22* zusammengefaßt.

Die Untersuchung ergab, daß die Expression des *pACsyn*-Gens (Variante I) bereits auf Ebene der Transkription bzw. der Prozessierung der naszierenden RNA zu Problemen führte, die die Entstehung einer funktionellen mRNA verhinderten. Dies korrelierte mit dem negativen Ergebnis des oben beschriebenen Expressionsversuchs. Bei den die Selektion überlebenden, transfizierten Zellen handelt es sich wahrscheinlich um Artefakte, bei welchen lediglich das resistenzvermittelnde Gen des Selektionsmarkers in das Genom der Zellen integriert wurde.

Bezüglich des *pACsynII*-Gens konnte aufgrund der Fluoreszenzuntersuchung keine eindeutige Aussage getroffen werden. Es konnten zwar nur sehr wenige fluoreszierende Zellen mit einer geringen Intensität gefunden werden, jedoch bot sich ein anderes Bild, als bei der Negativkontrolle und dem Konstrukt mit dem ursprünglichen *pACsyn*-Gen. Das *pACsynII*-Gen wurde in folgenden Expressionsexperimenten verwendet.

Tabelle 22: Ergebnis der Fluoreszenzuntersuchungen mit dem bicistronischen Vektor *pIRES-GFP*, welcher *downstream* der *IRES* das Reportergen GFP trägt.

Konstrukt	Bedeutung	Beobachtung
<i>pIRES1neo</i>	Negativkontrolle	Keine Fluoreszenz
<i>pIRES-GFP</i>	Positivkontrolle	Einige deutlich fluoreszierende Zellen
<i>pIRES-GFP-AC V</i>	Positivkontrolle eines rekombinanten <i>pIRES-GFP</i> mit langem Insert	Fluoreszierende Zellen, aber geringere Anzahl und schwächere Fluoreszenz
<i>pIRES-GFP-pACsyn</i>	Probe	Keine fluoreszierenden Zellen
<i>pIRES-GFP-pACsynII</i>	Probe	Anderes Erscheinungsbild als Negativkontrolle, jedoch nur extrem wenige, sehr schwach fluoreszierende Zellen auffindbar.

4.5.1.4 Getaggte und ungetaggte Konstrukte in HEK293

In weiterführenden Expressionsexperimenten in *HEK293* wurden Zelllinien des pACsynII-Gens mit und ohne *Hexamyc-tag* (N- und C-terminal) hergestellt (*pIRESΔ-pACsynII*, *pIRESΔ-pACsynII-Cmyc*, *pIRESΔ-pACsynII-Nmyc*). Die Fusion mit einem *Hexamyc-tag* bot die Möglichkeit des immunchemischen Expressionsnachweises. Trotz des negativen Ergebnisses der Fluoreszenzuntersuchung mit dem ursprünglichen synthetischen Gen wurde auch eine N-terminal *getaggte* Variante dieses pAC-Gens transfiziert (*pIRESΔ-pACsyn-Cmyc*). Darüber hinaus wurde Frag. e+f (bp 1570-2606), versehen mit einem N-terminalen *Hexahis-tag*, für die Expression in *HEK293* vorbereitet. Der Versuch ein lösliches pAC-Konstrukt (AS 524-865) zu exprimieren, sollte von der Membranverankerung und den Schwierigkeiten, die bei der korrekten Faltung und Einfädung solcher Proteinabschnitte bei heterologer Expression auftreten können, unabhängig machen. Die Expression des entsprechenden löslichen Proteinabschnitts in *E.coli* führte zur Bildung von *inclusion bodies*, so daß das *HEK293*-System eine alternative Chance bot, lösliches Protein zu erhalten.

Klonierung der Konstrukte

pACsyn und *pACsynII* mit C-terminalem *Hexamyc-tag*:

Für die Fusion des *Hexamyc-tag* an den C-Terminus wurde zunächst das Stopcodon des pAC-Gens entfernt: durch PCR mit dem Primerpaar FragfDer1-s/FragfDer1-as wurde ein alternatives Frag. f ohne Stopcodon (Frag. fΔStop) erhalten. Nach dem Codon der letzten AS folgte eine *Not* I-Erkennungssequenz. Der *Hexamyc-tag* konnte aus einem bestehenden Konstrukt in *pIRES1neo* gewonnen werden, in welchem er von einer *Not* I-Schnittstelle (5'-Ende) und einer *Bam*H I-Schnittstelle (3'-Ende, *downstream* des Stopcodons) flankiert wurde (s. *Abbildung 34*). Die *Bam*H I-Schnittstelle war auf die *Bam*H I-Schnittstelle in *pIRES1neo* kloniert. Die endgültige Klonierung wurde als Tripelligation folgender Fragmente durchgeführt: Vektor: *pIRESΔ-pACsyn(II)*, *Sfu* I/*Xho* I⁴⁴ geschnitten; Insert 1: Frag. fΔStop, *Sfu* I/*Not* I; Insert 2: *Hexamyc-tag*, *Not* I/*Xho* I.

pACsynII mit N-terminalem *Hexamyc-tag*:

Der *Hexamyc-tag* wurde nicht *upstream* des Startcodons fusioniert, sondern in die *Hpa* I-Schnittstelle (bp 18) des pACsyn-Gens eingesetzt. Die *Hexamyc*-Kassette wurde aus einem bestehenden Klon entnommen, aus welchem sie *upstream* durch eine *Pst* I- und *downstream* durch eine *Sph* I-Schnittstelle herausgeschnitten werden konnte (s. *Abbildung 34*). Durch Glätten der Überhänge entstand ein Fragment, welches *in frame* in die *Hpa* I von *pIRESΔ-pACsynII* eingesetzt werden konnte.

Frag. e+f mit *Hexahis-tag*:

Für die Expression in *HEK293* mußte dem codierenden Bereich eine *Kozak*-Sequenz vorangestellt werden. Das gesamte Gen inklusive des *Hexahis-tags* wurde durch PCR an *pQE30*-Frag. e+f mit den Primern KozpQE-s und FragfNot-as gewonnen. Durch das überhängende 5'-Ende des sense-Primers wurde *upstream* des Startcodons eine *Eco*R V-Schnittstelle gefolgt von der *Kozak*-Sequenz GCCGCCACC eingeführt. Die 18bp des 3'-Endes waren komplemen-

⁴⁴ *Xho* I: Schnittstelle auf *pIRES1neo* (bp 3000) 2057bp *downstream* der *Bam*H I

tär zum Startcodon und den folgenden 5 Basentriplets (MRGSHH), welche von *pQE30* codiert werden. Das PCR-Produkt wurde durch eine *EcoR* V/Not I-Klonierung in *pIRES1neo* eingefügt.

Kassette des C-terminalen Hexamyc-tags:

```
gcggccgctATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAG  
GACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAA  
GAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGAGCTTGGGCGACCTC  
ACCATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATTCAAGGCCTCTCTAGaggatcc
```

Kassette des N-terminalen Hexamyc-tags:

```
tctgcagctATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAG  
GACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAA  
GAGGACTTGAATGAAATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGAATGAAATGGAGAGCTTGGGCGACCTC  
ACCATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTgcatgcg
```

Abbildung 34: DNA-Sequenz der verwendeten *Hexamyc*-Kassetten. Die flankierenden Linkerbereiche sind mit Kleinbuchstaben dargestellt, die eigentliche Sequenz des *Hexamyc*-tags mit Großbuchstaben. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt.

Expression der Konstrukte und AC-Enzymtests

Sämtliche Konstrukte wurden gleichzeitig transformiert und nach Beendigung der Selektion je eine Kulturplatte geerntet (AC-Suspensionspuffer auf MOPS-Basis mit *complete*TM *mini*). Keines der Probenhomogenate zeigte erhöhte AC-Aktivität gegenüber dem Kontrollwert. In die Doppelbestimmungen wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt (einfach und doppelt). Auffällig war, daß innerhalb einer Probe keine Linearität zwischen den erhaltenen *counts* bestand, weshalb auch die spezifischen Aktivitäten nicht gleich waren. Das Problem nicht linearer Testergebnisse setzte sich durch alle folgenden AC-Tests mit *HEK293* fort. Später kristallisierte sich als plausible Erklärung heraus, daß das regenerierende System Kreatinkinase/Kreatinphosphat in der eingesetzten Konzentration nur bis zu einer *HEK293*-Homogenatmenge von bis zu ca. 60µg Gesamtprotein ausreichend arbeitet. Die einfache Proteinmenge der Proben im Test lag zwischen 43µg und 105µg Gesamtprotein. In Anbetracht des erwarteten positiven Ergebnisses der mitgeführten Positivkontrolle (s. S. 117), konnte an der negativen Bewertung der Testergebnisse festgehalten werden. Das Auftreten von AC-Aktivität hätte sich auch nach Verlassen des linearen Bereichs in erhöhten *counts* und einer erhöhten spezifischen Aktivität niedergeschlagen.

Es wurden Western Blots zur Expressionsanalyse durchgeführt. Sämtliche mit *Hexamyc* fusionierten Konstrukte (pACsyn-Cmyc, pACsynII-Cmyc, pACsynII-Nmyc) konnten mit dem monoklonalen Anti-myc-Antikörper nachgewiesen werden (s. *Abbildung 35*). Auffallend ist die starke Degradation der Expressionsprodukte. Unterhalb des Hauptexpressionsproduktes erscheint eine Reihe kleinerer Proteine, die wahrscheinlich C- bzw. N-terminale Abbauprodukte der Expressionsprodukte darstellen. Die gleichbleibende Bandenintensität aller Konstrukte läßt auf die gleiche Expressionsrate schließen. Das *ungetaggte* Expressionsprodukt pACsynII kann schwach mit dem sehr unempfindlichen Anti-pAC-1.3-Antiserum auf der erwarteten Laufhöhe detektiert werden, nicht jedoch die *ungetaggte* pAC vom ursprünglichen pACsyn-Gen (s. *Abbildung 58*). Der immunchemische Nachweis des löslichen Konstrukts pAC-Frag. e+f wurde mit dem monoklonalen anti-RGS(His)₄-Antikörper durchgeführt. Es konnte nur ein sehr schwa-

ches Signal erhalten werden, was auf eine äußerst niedrige Expressionsrate hinweist, da der verwendete Antikörper eine hohe Empfindlichkeit aufweist (s. *Abbildung 35*).

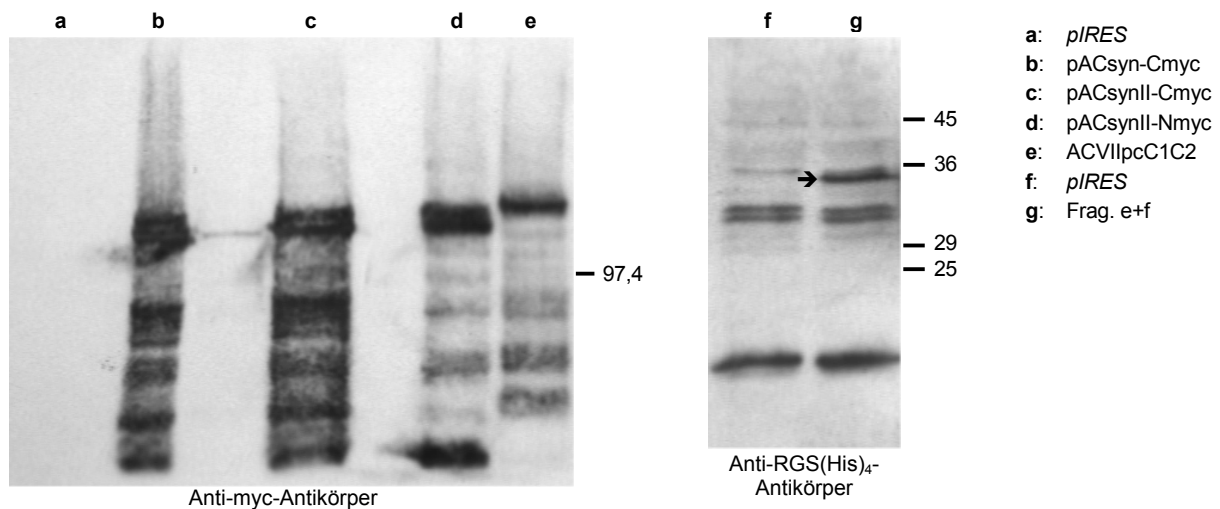


Abbildung 35: Western Blot der HEK293-Zelllinien der pAC-Holoenzyme und des pAC-Frag. e+f. Die *Hexamyc*-fusionierten pAC-Holoenzym-Konstrukte wurden mit dem Anti-myc-Antikörper nachgewiesen, Frag. e+f als *Hexahis-getaggt*es Protein mit dem anti-RGS(His)₄-Antikörper. Die Expression von pACsynII (nicht *getaggt*) konnte mit dem Anti-pAC-1.3-Antiserum nachgewiesen werden (siehe *Abbildung 58*).

Die negativen AC-Testergebnisse in Verbindung mit den Ergebnissen des Western Blots führten aufgrund verschiedener Überlegungen zu weiteren Testansätzen, die das Ziel verfolgten,

- einen möglicherweise notwendigen Zusatzfaktor oder Regulator aus *Paramecium* in den Testansatz einzubringen (s.u.),
- die Expressionsrate zu erhöhen oder den Abbau zu vermindern, um höhere Proteinmengen für die Dimerisierung des Enzyms zur Verfügung zu haben,
- die Proteinfaltung zu verbessern.

Zusatz von *Paramecienlysät* zu den AC-Testansätzen

Die Western Blots belegten, daß die Genprodukte vorhanden waren, in den AC-Tests konnte jedoch keine Aktivität gemessen werden. Ein Grund hierfür ist möglicherweise das Fehlen eines zusätzlichen Faktors, der für die Regulation verantwortlich ist oder gar eine weitere Unter-einheit der enzymatischen Aktivität bildet. Für diese Hypothese findet sich kein Hinweis in den proteinchemischen Untersuchungen die bis 1992 in diesem Labor durchgeführt wurden. Das gereinigte Protein war homogen (12). Trotzdem wurde ein Versuch unternommen, in welchem zu den Testansätzen verschieden aufbereitete Fraktionen eines Lysats aus *Paramecium tet.* zugesetzt wurden (zur Verfügung gestellt von Jürgen Linder). Die Lysate waren durch Homogenisation mit einem Hand-Homogenisator hergestellt worden. Testzusatz 1 war das vollständige Homogenisat (*H*). Testzusatz 2 war der Zentrifugationsüberstand von *H*, das heißt unlösliche Bestandteile, Zellorganellen und Plasmamembranbruchstücke waren abgetrennt worden (*H-Ü*). Bei der Herstellung von Testzusatz 3 war ein Homogenat unter Behandlung mit dem Detergens Brij hergestellt worden (*HB*). Testzusatz 4 war ein Zentrifugationsüberstand des

Brij-behandelten Homogenats (*HB-Ü*). Die verschiedenen Lysate waren ca. 1 Jahr bei -70°C gelagert worden. In den AC-Test wurden *HEK293*-Zellhomogenate von *pIRES1neoΔ* (Negativkontrolle), *pIRESΔ-pACsynII-Cmyc* und *pIRES1neo-Frag. e+f* eingesetzt. Darüber hinaus wurden die Paramecium-Lysate ohne *HEK293*-Homogenate getestet, um deren Eigenaktivität festzustellen. Sowohl *H* als auch *HB*, also die Homogenate, welche die Membranbestandteile beinhalten, zeigten eine spezifische AC-Aktivität von 14-15pmol/mg/min. Nach Abzug der spezifischen Aktivität der Negativkontrollen (*pIRES1neoΔ* + entsprechender Testzusatz) von den Proben mit Zusatz der verschiedenen Lysate zeigte sich bei keiner der Proben Aktivität, d.h. die Paramecienlysate-Zusätze konnten keine Aktivierung der exprimierten pAC-Proteine herbeiführen. Einzig eine Modulation der *HEK293*-eigenen Basalaktivität wurde festgestellt. *HB-Ü* erhöhte reproduzierbar in allen Testproben die *HEK293*-eigene Basalaktivität auf den 2fachen Wert, ohne selbst Aktivität zu zeigen. Hingegen schienen die Testzusätze *H* und *H-Ü* die Basalaktivität auf die Hälfte zu verringern, ebenfalls reproduzierbar in allen Proben. *HB* hatte keine Auswirkung. Die meßbare Erhöhung der AC-Aktivität durch *HB-Ü* kann auf eine Modulation der *HEK293*-eigenen AC oder auf eine Modulation der Kreatinkinase zurückzuführen sein (nicht-linearer Bereich des regenerierenden Systems). Die Testergebnisse sind in *Tabelle 23* zusammengefaßt. Bezüglich der Proben der Zelllinie *HEK293-pIRES1neo-Frag. e+f* ist zu bemerken, daß in einem Western Blot mit Zellhomogenatproben, die 9 Tage später genommen wurden, festgestellt wurde, daß die Zelllinie die Expression von pAC-Frag. e+f eingestellt hatte. Es ist also fraglich, ob zum Zeitpunkt dieses Tests noch Genprodukt vorhanden war.

Tabelle 23: Spezifische Aktivität der *HEK293*-Homogenate mit verschiedenen Paramecienlysate-Zusätzen. *H*: vollständiges Homogenat von Paramecien, *H-Ü*: Zentrifugationsüberstand des Paramecien-Homogenats, *HB*: vollständiges Paramecien-Homogenat, hergestellt unter Behandlung mit Brij, *HB-Ü*: Zentrifugationsüberstand des Brij-behandelten Homogenats.

Probe	spez. Aktivität pmol/mg/min	spez. Aktivität abzüglich der Aktivität d. Zusatzes pmol/mg/min	spez. Aktivität abzüglich der jeweiligen Neg.-Kontr. pmol/mg/min
<i>H</i>	13,9		
<i>H-Ü</i>	0,6		
<i>HB</i>	14,7		
<i>HB-Ü</i>	0,5		
PIRES	12,3		
pIRES + <i>H</i>	20,3	6,4	
pIRES + <i>H-Ü</i>	7,7	7,1	
pIRES + <i>HB</i>	27,4	12,7	
pIRES + <i>HB-Ü</i>	22,7	22,2	
e+f	11,5		
e+f + <i>H</i>	22,0	8,1	1,7
e+f + <i>H-Ü</i>	7,0	6,4	0
e+f + <i>HB</i>	27,5	12,8	0,1
e+f + <i>HB-Ü</i>	23,8	23,3	1,2
pAC	12,0		
pAC + <i>H</i>	19,8	6,0	0
pAC + <i>H-Ü</i>	7,5	6,9	0
pAC + <i>HB</i>	28,1	13,4	0,7
pAC + <i>HB-Ü</i>	23,9	23,4	0

Chloroquin-Zusatz als Hemmstoff des lysosomalen Abbaus

Ein möglicher Abbauweg für Membranproteine ist der lysosomale Abbau. In der Literatur wird u.a. von Pfister *et al.* (58) Chloroquin als Hemmstoff für den lysosomalen Abbau beschrieben. Entsprechend der Vorgehensweise dieser Veröffentlichung wurde je eine Kulturplatte der Zelllinien *HEK293-pIRESΔ-pACsynII-Cmyc*, *HEK293-pIRESΔ-ACVIIpC1C2-Cmyc* (s. Abschn. 4.5.2) und *HEK293-pIRESΔ-Frag. e+f* 4,5Std. mit Chloroquin-haltigem (0,2mM) Medium inkubiert. Bei je einer zweiten Platte wurde zum gleichen Zeitpunkt ein Medienwechsel ohne Chloroquin-Zusatz durchgeführt. Die gleiche Vorgehensweise wurde auf die Negativkontrolle *HEK293-pIRESΔ* und die Positivkontrolle (s. S. 117) angewendet. Es wurden nur Konstrukte ausgewählt, deren immunchemischer Nachweis aufgrund der *tags* möglich war. Die Kulturen mit Chloroquin-Zusatz wurden stündlich mikroskopisch untersucht. Nach 4,5Std. waren die Zellen z.T. rundlich, lösten sich stellenweise von der Platte und wurden geerntet. Die Homogenate wurden in einen AC-Enzymtest eingesetzt. Weder bei der Negativkontrolle, noch bei der Positivkontrolle (ca. 10fache Aktivität über Basalwert) konnte bezüglich der AC-Aktivität eine nennenswerte Auswirkung des Chloroquin-Zusatzes festgestellt werden (*pIRES*: 13pmol/mg/min sowohl mit als auch ohne Zusatz, Positivkontrolle: mit Chloroquin 347pmol/mg/min, ohne Chloroquin 276pmol/mg/min (ca. 80%)). Bei den getesteten Konstrukten konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Chloroquin festgestellt werden.

Ein Western Blot (*Abbildung 36*) brachte tatsächlich eine Verminderung des Abbaus der Expressionsprodukte *pACsynII-Cmyc* und *ACVIIpC1C2-Cmyc* zum Vorschein. Jedoch erscheint die (Doppel-) Bande des Hauptexpressionsprodukts gleich stark oder gar vermindert in den Proben mit Chloroquin-Zusatz, d.h. die Verringerung des Enzymabbaus hatte keine Anhäufung des Holoenzym zur Folge, was das eigentliche Ziel dieses Versuchs war. Lediglich bei der Positivkontrolle scheint Chloroquin keine Auswirkung auf das Ausmaß des Abbaus zu besitzen. *Frag. e+f* zeigte im Western Blot kein Signal mehr, d.h. es muß davon ausgegangen werden, daß diese Zelllinie die Expression des löslichen *pAC*-Proteinfragments eingestellt hatte.

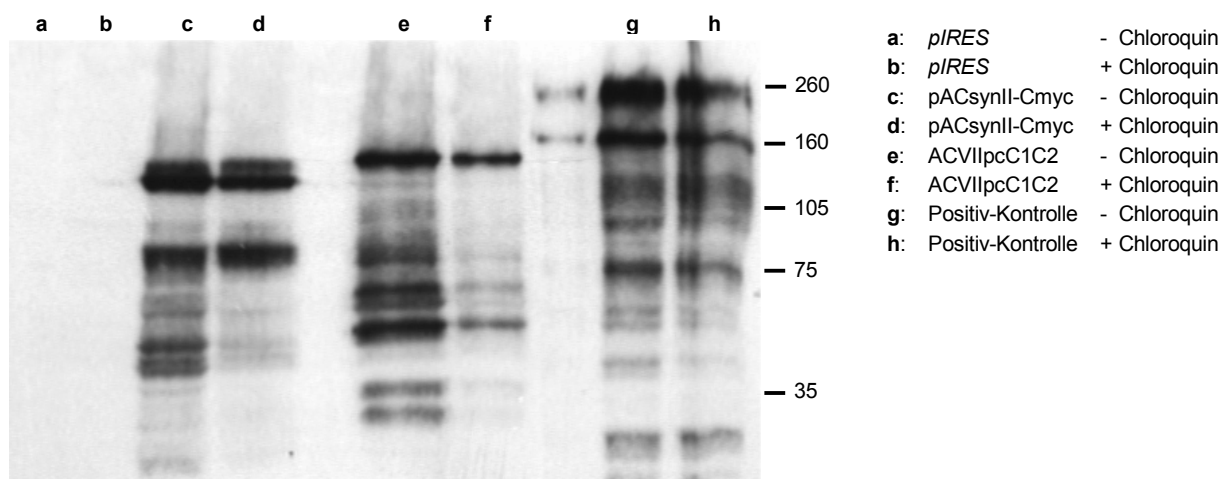


Abbildung 36: Western Blot der *HEK293*-Zelllinien *pACsynII-Cmyc*, *ACVIIpC1C2-Cmyc* und der Positivkontrolle. Der Immunoblot wurde mit dem Anti-myc-Antikörper durchgeführt. Es sind je Spur 40µg Protein aufgetragen.

Versuch der Verbesserung der Proteinfaltung in HEK293

Das Wachstum von Zellkulturen unter nicht-optimalen Bedingungen führt wahrscheinlich zu Veränderungen in der Proteinbiosynthese. Zhou *et al.* beschreiben eine verbesserte Oberflächenexpression einer *HERG*-Mutante, welche Defekte im Membran-*trafficking* aufweist, wenn die Expression in *HEK293* bei einer verminderten Temperatur (27°C) durchgeführt wird (59). Ein entsprechender Versuch wurde mit den *HEK293*-Zelllinien durchgeführt, welche folgende Konstrukte synthetisierten: pACsyn-Cmyc, pACsynII-Cmyc, ACVIIpC1C2 (s. Abschn. 4.5.2). Zusätzlich wurde die Negativkontrolle (*pIRES1neoΔ*) und die Positivkontrolle im Versuch mitgeführt. Es wurde je eine Kulturplatte für ca. 5Std. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend geerntet. Diese Inkubation wurde unter der Sterilbank durchgeführt, so daß die erhöhte Luftfeuchtigkeit der umgebenden Atmosphäre entfiel. Der Enzymtest ergab in keinem Fall AC-Aktivitäten, die über dem Wert der Negativkontrolle lagen. (Die Positivkontrolle zeigte wie erwartet eine spezifische Aktivität, die 15fach über basal lag).

4.5.2 Expression eines Chimärs aus pAC und Säuger-AC VII

Säuger-AC VII ist eine membranständige AC, welche im Arbeitskreis bereits aktiv in *HEK293* exprimiert wurde (55). Die Idee eines Chimärs verfolgte die Absicht, die Dimerisierung der katalytischen Bereiche der pAC zu unterstützen. Hierfür wurden sie anstelle der AC VII-katalytischen Bereiche C_{1a} und C_{2a} in das „Gerüst“ dieser Klasse III-AC eingesetzt, was dazu führen sollte, die katalytischen Domänen in eine korrekte, räumliche Orientierung zueinander zu bringen. Das Konstrukt bestand also aus dem membranverankerten Proteingerüst der AC VII, in deren cytosolischen Schleifen die katalytischen Bereiche C_{1a} und C_{2a} jeweils durch den katalytischen Bereich der pAC ersetzt waren. Im Alignment der AC VII mit pAC wurde eine passende Position für den Übergang von AC VII zum pAC-katalytischen Bereich festgelegt. Der pAC-katalytische Bereich für die Insertion in AC VII wurde von V524 bis E757 gewählt. Die AS 742-757, welche nicht mehr zur eigentlichen katalytischen pAC-Domäne gezählt werden, ersetzen im fertigen Chimär einen Teil des C_{1b}-Bereichs in AC VII. Um die Klonierbarkeit zu ermöglichen, wurde V524 auf DNA-Ebene eine *BamH* I-Schnittstelle vorangestellt, welche für GS kodiert. Am 3'-Ende des entsprechenden Fragments wurde eine *Asc* I-Erkennungssequenz eingeführt, welche für AR kodiert. Praktisch wurde die Einführung dieser Schnittstellen durch eine PCR mit dem Primerpaar FrageDer1Bam-s / FrageDer1Asc-as durchgeführt, wobei der sense-Primer im 5'-Überhang die *BamH* I-Erkennungssequenz, der antisense-Primer im 5'-Überhang die *Asc* I-Erkennungssequenz trug.

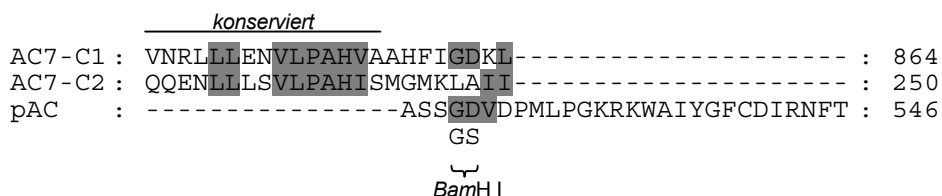


Abbildung 37: Übergang von AC VII zu pAC.

Bei der Auswahl der Übergangsstelle in AC VII wurde darauf geachtet, den bei Säuger-ACn konservierten Bereich *upstream* des Beginns der katalytischen Domäne zu erhalten (s. *Abbildung 37*). Direkt im Anschluß an diesen Abschnitt wurde in AC VII-C₁ *downstream* K246

eine Mutation zu *GS* eingeführt, welche auf DNA-Ebene die für die Klonierung notwendige *BamH* I-Schnittstelle enthält (Klonierung: PCR mit dem Primerpaar ACVII-mutC1Sal-s / ACVII-mutC1Bam-as; der antisense-Primer trägt im Überhang die einzuführende *BamH* I-Schnittstelle; der sense-Primer bindet spezifisch auf einer *Sal* I-Schnittstelle, so daß der Austausch des ursprünglichen Fragments gegen das PCR-Produkt in einer Tripelligation mit dem pAC-PCR-Produkt (s.o.) erfolgen konnte). In AC VII-C₂ wurde eine entsprechende Mutation zu *BamH* I *downstream* 1860 eingeführt. (PCR mit dem Primerpaar ACVII-mutC2Xho-s / ACVII-mutC2Bam-as; der antisense-Primer führt wiederum die notwendige *BamH* I-Schnittstelle ein, der sense-Primer bindet spezifisch auf einer *Xho* I-Schnittstelle, so daß der Austausch des Fragments in einer weiteren Tripelligation mit dem pAC-PCR-Produkt (s.o.) erfolgen konnte). Der Übergang vom pAC-katalytische Bereich zu AC VII-C_{1b} wurde in AC VII auf eine vorhandene *Mlu* I-Schnittstelle gelegt (bp 1453-1458) (AS 485, 486). In der zweiten cytosolischen Schleife wurde für den Übergang eine *Asc* I-Schnittstelle verwendet, die an dieser Stelle durch eine den Leserahmen um die AS *EARQ* erweiternde Mutation von Andreas Reimer eingeführt wurde (bp 3237-3244; 10bp *upstream* des Stopcodons) (20). Der Austausch der C_{1a}- und C_{2a}-Schleife gegen den pAC-katalytischen Bereich erfolgte nahezu längenkonserviert: das eingesetzte pAC-Fragment ist 234AS lang, der ausgetauschte C₁-Proteinabschnitt besitzt 238AS, der C₂-Abschnitt 219AS. Ein Längenunterschied in der C₂-Schleife sollte weniger kritisch sein, da direkt anschließend das C-terminale Ende des Proteins erreicht ist und die Länge bzw. das Vorhandensein eines C_{2b}-Bereichs innerhalb der Säuger-ACn nicht konserviert ist. Eine schematische Darstellung des Chimärs ist in *Abbildung 38* zu sehen. Dieses Chimär wurde darüber hinaus zusätzlich in einer Form mit einem C-terminalen *Hexamyc-tag* hergestellt.

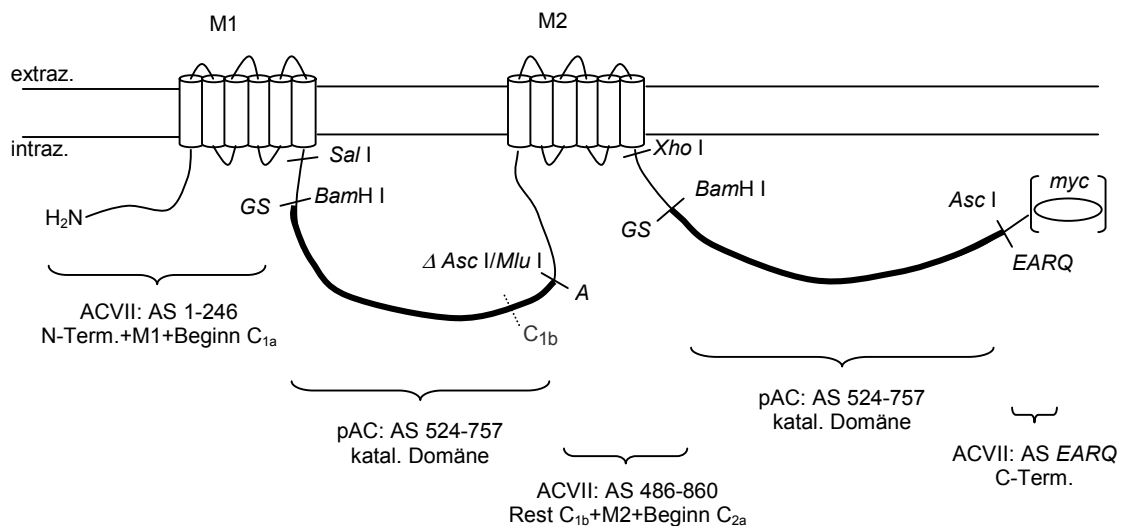


Abbildung 38: Schema des ACVII-pAC-Chimärs ACVIIpC1C2-(Cmyc). Die AC VII-katalytischen Schleifen C_{1a} und C_{2a} sind gegen den katalytischen Bereich der pAC ausgetauscht. Das AC VII-Proteingerüst ist mit dünnen Linien dargestellt, der eingesetzte pAC-katalytische Bereich mit dicken Linien. Die Schnittstellen für die Klonierung sind auf der Innenseite der Schleifen eingetragen, die dadurch zusätzlich eingeführten AS sind in kursiver Schrift unterhalb der Schleifen entsprechend angegeben.

Für die beschriebene Klonierung wurde von einer AC VII Sequenz von Andreas Reimer ausgegangen, in welche er verschiedene *silent* und *nicht-silent* Mutationen zur Einführung von Schnittstellen unter Erhalt der Funktionalität eingebracht hatte. Die genaue Sequenz ist bei Andreas Reimer (20) nachzulesen. Die Insertion in *pIRES1neo* entspricht der von Andreas Reimer: *upstream* des Startcodons befindet sich eine *Nhe* I-Schnittstelle und eine *Kozak*-Sequenz (*GCTAGCCGCCACC*), *downstream* des Stopcodons eine *Cla* I-Schnittstelle; die Klonierung erfolgte als geglättetes *Nhe* I/*Cla* I-Fragment in die *EcoR* V-Schnittstelle von *pIRES1neo*. Der *Hexamyc-tag* wurde ebenfalls von Andreas Reimer übernommen. Hier ist das Stopcodon durch eine *Not* I-Schnittstelle ersetzt und die Kasette für den C-terminalen *Hexamyc-tag* (s. *Abbildung 34*) angehängt.

Es wurden zwei stabile *HEK293*-Zelllinien hergestellt. Die Expression konnte im Western Blot nachgewiesen werden, sowohl mit dem pAC-spezifischen Antiserum Anti-pAC-1.3 (s. *Abbildung 58*) als auch bei der *hexamyc-getaggten* Version mit dem Anti-myc-Antikörper (*Abbildung 35*, *Abbildung 36*). Im immunchemischen Nachweis mit dem sehr empfindlichen Anti-myc-Antikörper wurde wie bei den anderen Expressionsprodukten bereits beschrieben, ein starker Abbau festgestellt werden. Die Zellhomogenate zeigten bei Einsatz im AC-Test (AC-Suspensionspuffer auf MOPS-Basis mit *complete™ mini*) nur Basalaktivität. Auch das Zurückdrängen des Proteinabbaus durch Inkubation der Zellkultur mit Chloroquin (s. S. 125) zeigte keinen Erfolg. Ebenso die Kultivierung für 5Std. bei Raumtemperatur (s. S. 126).

4.6 Experimente mit möglichen Signalpeptiden

Bei den Expressionsversuchen in *HEK293* wurden keine Untersuchungen bezüglich der Membranlokalisierung der exprimierten pAC-Holoenzyme durch Herstellung von Membranpräparationen vor Durchführung der Western Blots unternommen. Es ist keine Aussage darüber möglich, ob die exprimierten Proteine tatsächlich in die Membran eingefädelt werden.

Jürgen Linder führte jedoch bei seinen elektrophysiologischen Untersuchungen der pAC-Ionenpore Versuche zur Membranlokalisierung durch. Hierbei stellte sich heraus, daß das pAC-Holoenzym, fusioniert mit einem C-terminalen GFP-Protein, in CHO-Zellen nicht in die Zellmembran transportiert wurde, sondern im ER- oder dem Golgi-Apparat stecken blieb.

Es wurden Rückschlüsse gezogen, daß das exprimierte pAC-Holoenzym in *HEK293* vermutlich ebenfalls nicht in die Zellmembran transportiert wurde.

4.6.1 Lokalisationsuntersuchungen in eukaryotischen Zellen

4.6.1.1 Versuche mit den N-Termini der K⁺-Ionenkanäle rSK2 und Kir2.1

Zusammen mit dem Arbeitskreis um Bernd Fakler wurden Experimente geplant, die vorsahen die N-Termini zweier K⁺-Kanäle, welche hervorragend in die Zellmembran transportiert wurden, als potentielle Signalpeptide N-terminal mit dem pAC-Holoenzym zu fusionieren. Es wurde erhofft, hierdurch einen Transport zur Zellmembran hervorrufen und dadurch eine aktive Expression erreichen zu können. Es wurden die K⁺-Kanäle Kir2.1 (60) und rSK2 (61, 62) verwendet. Kir2.1 ist ein *inward-rectifier* mit zwei Transmembranhelices. rSK2 ist ein *small conductance* K⁺-Kanal, welcher aus 6 TM aufgebaut ist, aber trotz struktureller Ähnlichkeiten keine Homologien zu K_v-Kanälen besitzt, mit Ausnahme der *Pore*-Region. Plasmide mit den

mologien zu K_v -Kanälen besitzt, mit Ausnahme der *Pore*-Region. Plasmide mit den einklonierten DNAs dieser beiden K^+ -Kanäle wurden mir vom Arbeitskreis Fakler überlassen.

Bei der Fusion der N-Termini der K^+ -Kanäle vor die pAC wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde jeweils ein 26 bzw. 29AS langes Peptid vom N-Terminus der Kanäle als „Signalpeptid“ verwendet und ein etwa gleich langer Abschnitt (28AS) des pAC-N-Terminus dadurch ersetzt bzw. alternativ auch vor den gesamten N-Terminus der pAC fusioniert. Zum anderen wurde der gesamte N-Terminus der beiden K^+ -Kanäle, unter Aussparung der 6-9AS die der TM1 direkt vorangestellt sind, verwendet. Diese ersetzen wiederum den N-Terminus der pAC unter Berücksichtigung eines 14AS-Linkers vor TM1. Diese Linker-AS wurden nicht ausgetauscht, um gewisse Flexibilität für die richtige Einfädung der TM1 zu erhalten. Außerdem wurden die Gesamt-N-Termini der Kanäle zusätzlich auch vor das Gesamt-pAC-Protein gehängt. Auf diese Weise entstanden 8 Konstrukte (*Abbildung 39*).

Für die Klonierung wurden die 4 verschiedenen „Signalpeptide“ durch PCR amplifiziert, wobei jeder sense-Primer eine *Ehe* I-Schnittstelle gefolgt von einer *Kozak*-Sequenz am 5'-Ende *upstream* des Startcodons einführte. Mit Hilfe der antisense-Primer wurden am 3'-Ende der Fragmente geeignete *blunt*-Schnittstellen für die Verknüpfung mit pACsynII eingeführt. Die N-Termini des Kir2.1-Kanals wurden mit *Hpa* I-Schnittstellen ausgestattet. Beim kurzen „Signalpeptid“ (KirSigk AS 1-29) wurde hierfür an Position 29 eine Mutation von G nach V eingeführt (Primerpaar: IRK1-s/IRK1-as1). In das lange „Signalpeptid“ (KirSigL AS 1-77) konnte die *Hpa* I durch eine *silent* Mutation eingeführt werden (Primerpaar: IRK1-s/IRK1-as2). Die potentiellen Signalpeptide des rSK-Kanals wurden durch *EcoR* V-Schnittstellen klonierbar gemacht. Hier entstand sowohl beim kurzen, N-terminalen Peptid (rSKSigk AS 1-26), als auch beim langen Peptid (rSKSigl AS 1-130) eine E nach D Mutation (E26D, E130D) (Primerpaare: rSK2-s/rSK2-as1; rSK2-s/rSK2-as2). Um die potentiellen Signalpeptide durch eine *blunt*-Ligation vor das pACsynII-Gen klonieren zu können, wurde für die lange Version (pACL) *upstream* des Startcodons eine *Sma* I-Schnittstelle eingeführt, so daß nach Schneiden und Ligation ein zusätzliches G, bezeichnet als Position -1 im fertigen Konstrukt entsteht. Die Einführung der *Sma* I-Schnittstelle vor die kurze pAC-Version (pACk, AS 29-865) konnte neutral geschehen, da Codon 29 (GGG: Glycin) Teil der Schnittstelle war. Die Einführungen dieser Schnittstellen in pACsynII erfolgten ebenfalls durch PCR. Der antisense-Primer band spezifisch *downstream* der singulären *Hind* III-Schnittstelle, so daß diese für den Austausch des entsprechenden Fragments in pACsynII Verwendung finden konnte. PCR-Primerpaare: SigPara-s1 (pACsynIII) bzw. SigPara-s2 (pACsynIIk) mit pACs1as. Die Klonierung der Konstrukte erfolgte in *pBluescript II SK(-)*.

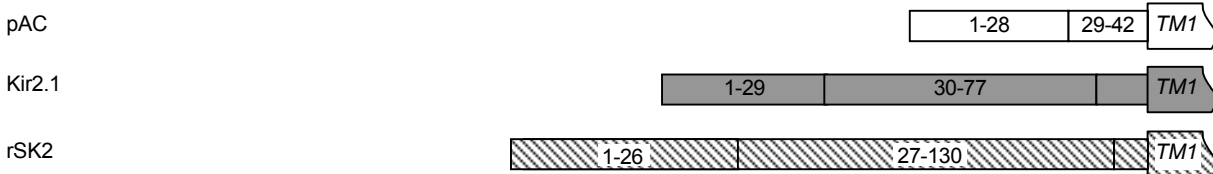
Für die Fluoreszenz-Untersuchungen wurden die Hybride in den Expressionsvektor *pBK-CMV* kloniert und C-terminal mit einem GFP-Protein fusioniert. Hiefür wurde das pACsynII-Gen ohne Stopcodon mit einer *Not* I-Schnittstelle *downstream* des letzten Codons verwendet (Frag. f Δ Stop; s. S. 121). Zwischen pAC und GFP-Protein befindet sich folgender Linker: AAIEFLQPGGST.

Die Expression in *CHO*-Zellen und die fluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsuntersuchungen wurden von Nikolaj Kloecker (Arbeitskreis Fakler) durchgeführt. Durchweg bei allen Konstrukten traten nur wenige Zellen auf, die eine geringe Fluoreszenz zeigten. Dies wurde auf eine niedrige Expressionsrate zurückgeführt. Das beobachtete Bild war bei sämtlichen Konstrukten gleich, so daß einige für alle Konstrukte repräsentative Bilder aufgenommen wurden

(s. *Abbildung 41*). Im Vergleich zu den Experimenten von Jürgen Linder konnte zwar eine Verschiebung in der Lokalisation innerhalb der Zelle gefunden werden, es findet jedoch kein Transport in die Zellmembran statt. Das heißt die N-Termini der beiden K^+ -Kanäle rSK2 und Kir2.1 werden bei pAC nicht wirksam, oder sind keine Signalgeber für den Export der Membranproteine vom ER in den Golgi-Apparat und eventuell weiter in die Zellmembran.

Die Unwirksamkeit eventueller Signalpeptidabschnitte der Kanal-N-Termini bei Fusion an das pAC-Holoenzym kann mehrere Gründe haben. Ein dreiviertel Jahr später veröffentlichten Ma *et al.* Daten, die zeigten, daß Kir2.1 ein AS-Motiv mit ER-Export-Signalqualität am C-Terminus trägt.

Ausgangs-Sequenzen



Signalpeptid-Konstrukte

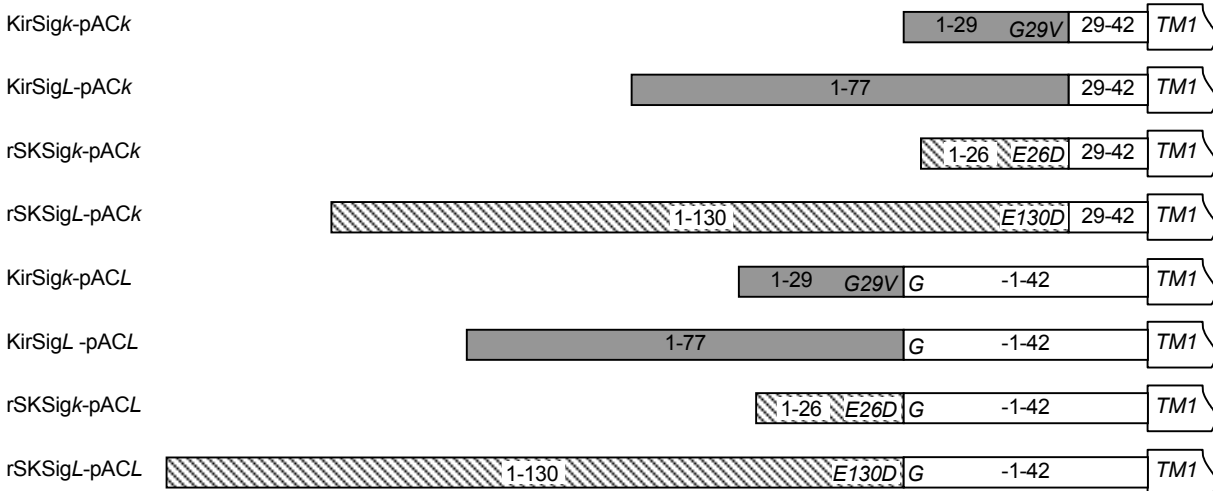


Abbildung 39: Hybride der pAC mit den N-Termini der K^+ -Kanäle rSK2 und Kir2.1. *KirSigk*, *KirSigL*: kurzes (AS 1-29) bzw. langes (AS 1-77) Fragment des N-Terminus von Kir2.1; die Einführung der Schnittstelle am kurzen Fragment führte zu der Mutation G29V. *rSKSigk*, *rSKSigL*: kurzes (AS 1-26) bzw. langes (AS 1-130) Fragment des N-Terminus von rSK2, die Einführung der Klonierungsschnittstelle am kurzen Fragment führte zur Mutation E26D; die Einführung der Schnittstelle am langen Fragment führte zur Mutation E130D. *pACk*: verkürzte pAC (AS 29-865); *pACL*: gesamte pAC mit zusätzlichem G (-1) *upstream* des Startcodons durch Einführung einer *Sma* I-Klonierungsschnittstelle. Die Darstellung ist maßstabsgetreu.

4.6.1.2 Versuche mit dem C-terminalen ER-Export-Signal FCYENE von Kir2.1

Ma *et al.* (63) fanden durch C-terminale Verkürzungen des *inward rectifier* K⁺-Kanals Kir2.1 (60) Hinweise darauf, daß der C-terminale, cytosolische Abschnitt AS 369-385 ein ER-Export-Signal beinhaltet. Die Entfernung dieses Abschnitts oder die Mutation der AS des enthaltenen Motivs FCYENE hatten eine Retention im ER zur Folge, ohne die Proteinfaltung, -zusammensetzung und das *gating* der Kanäle negativ zu beeinflussen. Durch die Fusion dieses Peptids (AS 369-385) an den N-Terminus von Kir2.1 bei gleichzeitiger, funktionseliminierender Mutation des C-terminalen Motivs oder an andere K⁺-Kanäle oder an nicht verwandte Proteine, die eine ER-Retention zeigten, konnte ein Transport dieser Proteine in den Golgi-Apparat oder die Plasmamembran bewirkt werden. Das *ER-to-Golgi* vorwärts-*trafficking* Signal konnte durch das ER-Retentionssignal RXR(R) (64, 65) überstimmt werden.

Diese Befunde waren Anlaß, einen entsprechenden Versuch mit dem FCYENE-Motiv auf die pAC zu übertragen. Analog zu der Publikation wurde der Proteinabschnitt AS 369-385, welcher das Motiv enthält, zwischen ein GFP-Protein und die pAC eingesetzt. Für die Klonierung wurde der Plasmidvektor *pEGFP-C3* von Clontech verwendet, ein Vektor für die Herstellung von Fusionsproteinen mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*). EGFP wird N-terminal an das Protein von Interesse fusioniert. Die Expression unterliegt dem CMV-Promotor und findet in Säuger-Zellkulturen statt. Die Herstellung der DNA von Kir2.1 AS 369-385 wurde synthetisch mit den 42 bzw. 44bp langen Oligonukleotiden FCYENE-s und FCYENE-as durchgeführt. Die Sequenz wurde in direkter Analogie zu Kir2.1 gewählt. Am 5'-Ende wurde eine *Xho*I-Schnittstelle für die Klonierung in *pEGFP-C3* eingeführt (FCYENE-s), am 3'-Ende ein *Ehe*I-Schnittstelle, welche die Fusion mit pACsynII ermöglichte. Die *Kozak*-Sequenz zwischen *Ehe*I und dem Startcodon von pACsynII tauchte im fertigen Fusionsprotein als Linker (AAT) zwischen dem Export-Signal und pAC auf (vgl. *Abbildung 40*).

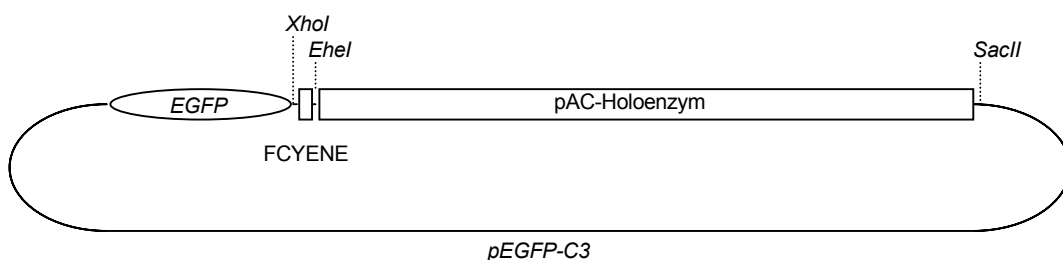


Abbildung 40: Schematische Darstellung des pAC-Chimärs mit dem N-terminalen ER-Export-Signal FCYENE und EGFP. EGFP ist N-terminal an den Gesamtkonstrukt fusioniert und wird von dem mammalia Expressionsvektor *pEGFP-C3* kodiert. Es folgt unmittelbar N-terminal des pAC-Proteins das FCYENE-Motiv haltige Peptid AS 369-385 von Kir2.1. pAC wird durch das pACsynII-Gen kodiert; die *Kozak*-Sequenz wurde nicht entfernt.

Die Expression und die Fluoreszenzuntersuchungen zur Lokalisation wurden von Nikolaj Kloecker in *OK*-Zellen (*opossum kidney cells*) durchgeführt (s. *Abbildung 41*). Es konnte jedoch keine verbesserte Membranexpression festgestellt werden, ebenfalls keine Anreicherung im Golgi-Apparat, was zu erwarten wäre, wenn das Export-Signal funktionell wäre (66). Die Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Zelle läßt auf eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum schließen.

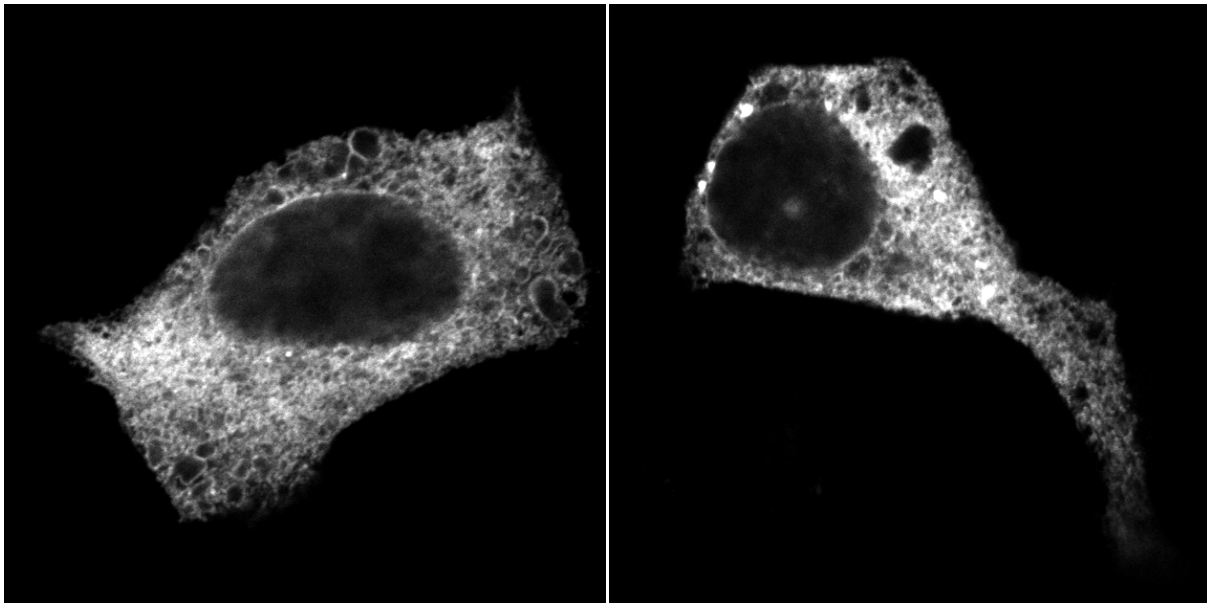
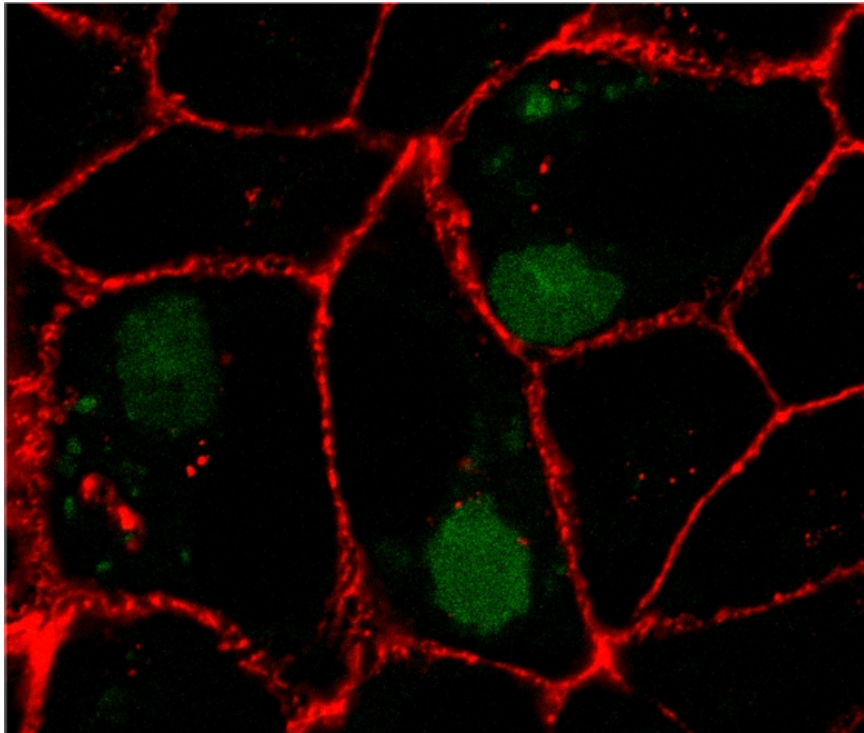


Abbildung 41: Bilder der Fluoreszenzlokalisationsuntersuchungen. **A:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des pAC-Holoenzym fusioniert an den N-Terminus eines K^+ -Kanals. Stellvertretend ist eine Aufnahme von dem Konstrukt KirSigk-pACK gezeigt. Die Untersuchung wurde in *CHO*-Zellen durchgeführt. Das Cytoskelett ist rot fluoreszierend markiert. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des pAC-Holoenzym fusioniert an das ER-Export-Signal FCYENE. N-terminal ist der Konstrukt verknüpft mit EGFP. Expression wurde in *OK*-Zellen durchgeführt. Die Verteilung der Fluoreszenz über die gesamte Zelle lässt auf eine Lokalisation im ER schließen.

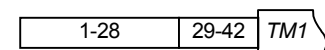
4.6.2 Membranständige Expression in *E.coli* mit dem N-Terminus einer mycobakteriellen AC

Während der Expressionsversuche in *E.coli* wurde wegen geringen Aussichten auf Erfolg darauf verzichtet, einen Versuch durchzuführen, das Holoenzym als transmembranäres Protein zu exprimieren. Ying Lan Guo war es jedoch gelungen, die AC *Rv1625c* (67) aus *Mycobacterium tuberculosis* (MycoAC) in *E.coli* aktiv zu exprimieren (68). Diese AC besteht aus einem 1x 6TM Membrananker und einer cytosolischen C-terminalen Schleife, auf der das katalytische Zentrum lokalisiert ist. Diese Struktur entspricht der einer halben Säuger-AC. Die funktionelle Expressierbarkeit in *E.coli* bedeutet, daß eine MycoAC Membran-*targeting* Sequenz mit dem Proteinsyntheseapparat von *E.coli* kompatibel war.

In Analogie zu den Versuchen mit den N-Termini der K⁺-Kanäle (s. Abschn. 4.6.1.1) wurden Hybridproteine aus MycoAC und pAC hergestellt. Dafür wurden die AS 1-33 des N-Terminus der MycoAC verwendet. Dieses Peptid ist laut Vorhersage 13AS von TM1 in MycoAC entfernt. Für die Fusion an pACsynII wurde dieses Fragment mittels PCR amplifiziert und am 3'-Ende unter Beteiligung des Codons 33 (CCC: Pro) eine *Sma*I-Schnittstelle eingeführt (antisense-Primer: SigMycP-as). Der sense-Primer (Myctub1-s) wurde von Jost Weber zur Verfügung gestellt und enthielt im 5'-Überhang unmittelbar *upstream* des Startcodons eine *Bam*H I-Schnittstelle für die Klonierung in das Expressionsplasmid *pQE30*. Dieses Fragment wurde jeweils N-terminal vor pACk und pACL (vgl. Abschn. 4.6.1.1) kloniert. Auf diese Art entstand ein pAC-Chimär, bei welchem die AS 1-28 durch den MycoAC-N-Terminus (AS 1-33) ersetzt wurden, und ein Chimär, bei welchem die pAC N-terminal durch den MycoAC-N-Terminus verlängert wurde (s. *Abbildung 42*). Durch die Verwendung des pQE30 waren beide Konstrukte N-terminal mit dem *Hexahis*-Peptid MRGSHHHHHHGS versehen.

Ausgangs-Sequenzen

pACsyn

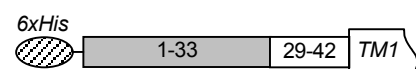


MycoAC



Signalpeptid-Konstrukte

MycSig-pACk



MycSig-pACL

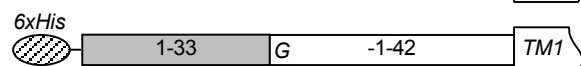


Abbildung 42: Schematische Darstellung der pAC-MycoAC-Hybride. *MycoAC*: AC *Rv1625c* aus *Mycobacterium tuberculosis*. *MycSig-pACk*: AS 1-33 des MycoAC N-Terminus ersetzen AS 1-28 der pAC. *MycSig-pACL*: MycoAC-N-Terminus (AS 1-33) N-terminal an das pAC-Holoenzym fusioniert. *6xHis*: *Hexahis*-tag, kodiert von pQE30. Vgl. *Abbildung 39*. Molekulargewicht: *MycSig-pACk*: 66,9kDa; *MycSig-pACL*: 102,8kDa.

Die Expression wurde in *E.coli* BL21 (*DE3*)/[*pRep4*] und in dem AC-defizienten (*cya*⁻) Stamm *E.coli* DHP1 durchgeführt. Während der Expression wurde durch regelmäßige Messung der OD₆₀₀ eine Wachstumskurve der Kulturen aufgenommen. Es stellte sich heraus, daß die mit *MycSig-pACL* und *MycSig-pACk* transformierten Kulturen nach Induktion im Wachstum stagnierten oder abstarben, während die Kontrollen (*pQE30* Leervektor) normal wuchsen. Die Zel-

len wurden homogenisiert und die Gesamtzellhomogenate in einen AC-Enzymtest eingesetzt. Die Proben aus der Expression in *DHP1*-Zellen zeigten durchweg spezifische Aktivitäten, die im Bereich der *blank*-Werte lagen. Die *BL21*-Homogenate der beiden MycSig-pAC-Chimären zeigten spezifische Aktivitäten im Bereich des doppelten Kontrollwerts. Dies war nicht signifikant. In erster Linie wäre bei aktiv exprimiertem Enzym eine Erhöhung der Aktivität in dem *cya*⁻-Stamm *DHP1* zu erwarten gewesen.

Im Western Blot (anti-RGS(His)₄-Antikörper) wurde gezeigt, daß trotz der Wachstumsstagnation eine geringe Expression stattgefunden hatte. In *DHP1*-Zellen ist eine geringfügig schwächere Expression zu beobachten als in *BL21*-Zellen, darüber hinaus wird das kurze Konstrukt nur ca. halb so stark exprimiert wie das lange. Es ist jedoch unklar, ob es zu einer membranständigen Expression gekommen ist oder ob das exprimierte Protein in *inclusion bodies* abgelagert wurde. Anhand des Western Blots (*Abbildung 43*) war keine Aussage möglich, da Zellhomogenate aufgetragen wurden.

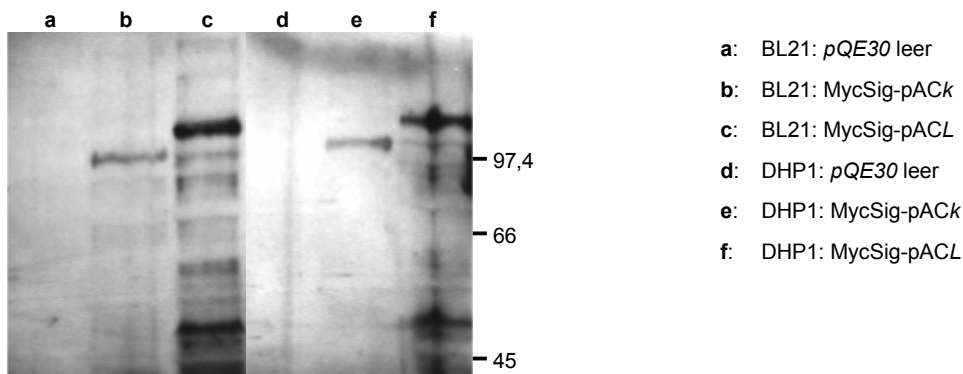


Abbildung 43: Western Blot der *E. coli*-Expression der pAC-MycoAC-Chimäre. Die Konstrukte wurden in *E. coli BL21 (DE2) [pRep4]* und *E. coli DHP1 (cya*⁻*-Stamm)* exprimiert. Die Immunodetektion wurde mit dem anti-RGS(His)₄-Antikörper durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug 5min. Für den Aufbau der Konstrukte vgl. *Abbildung 42*.

4.7 Versuche zellfreier Proteinexpression

Aufgrund der aufgetretenen Biosyntheseschwierigkeiten mit der pAC, welche auch die ausreichende lösliche Expression des cytosolischen Bereichs verhinderten, schien ein zellfreies System ein potentieller Lösungsweg zur Expression der löslichen pAC (AS 530-865).

4.7.1 Expression mit dem *RTS500 in vitro*-Expressionssystem

Das angewendete *RTS500*-System (*rapid translation system*) von Roche ist ein Zwei-Kammer-*in vitro*-Expressionssystem. Durch die zweite Kammer, welche über eine semipermeable Membran mit der Reaktionskammer in Kontakt steht, werden *in vitro* begrenzende Faktoren wie Energie und Edukte nachgeführt. Dadurch kann die Reaktion über mehrere Stunden aufrecht erhalten werden. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführungen mit diesem System standen ausschließlich *Kits* mit *E. coli*-Lysat zur Verfügung (*E. coli Circular Template Kit*). Es findet eine *in vitro*-Transkription und -Translation statt, so daß als Matrize das interessierende Gen inkloniert in einen geeigneten *pIVEX*-Plasmidvektor verwendet wird. *pIVEX*-Vektoren der 2.4-

Reihe codieren für einen N-terminalen *Hexahis-tag* gefolgt von einer Faktor Xa-Proteaseschnittstelle (IEGR), so daß das zu exprimierende Protein N-terminal mit dem 24AS-Peptid MSGSHHHHHSSGIEGRGRLILHM (*Nde* I kodiert für HM, s.u.) fusioniert vorliegt.

Tobias Kanacher testete das System mit der modellhaften, löslichen AnaCyaB1 (AS 595-895) einkloniert in pIVEX2.4c. Dieses AC-katalytische Fragment war aktiv exprimierbar mit einer akzeptablen Ausbeute an nativ aufreinigbarem Protein (69).

Für den Versuch der zellfreien Expression der pAC wurde der der löslichen AnaCyaB1 (AS 595-895) entsprechende cytosolische Abschnitt pAC (AS 530-865) gewählt. Die Klonierung wurde nach einer im *RTS500-Instruction Manual* empfohlenen Strategie über die *Nde* I/*Sma* I-Schnittstellen durchgeführt. Das *Nde* I-pAC(bp 1570-2598)-*Sma* I-DNA-Fragment wurde durch eine PCR mit dem Primerpaar pACsyn-*Nde*GKRKW-s / pACsyn-stop*Sma*-as amplifiziert und entsprechend in den Plasmidvektor *pIVEX-2.4b-Nde* inseriert.

In die *in vitro* Expression wurden 7,5µg des rekombinierten Plasmids eingesetzt. Die Parametern wurden analog der AnaCyaB1-Expression gewählt (30°C, 12Std., 120rpm). Die Reaktionslösung wurde nach Abtrennung partikulärer Bestandteile durch Zentrifugation (48000xg, 30min, 4°C) einer nativen Reinigung mit 70µl Ni-NTA-Agarose durchgeführt wurde. Die Proteinbestimmung ergab 43ng/µl Protein im Eluat, was der Ausbeute exprimierter AnaCyaB1 (AS 595-895) äquivalent ist. In den folgenden AC-Enzymtest wurde als Kontrolle ein Aliquot (20µl) der Reaktionslösung vor Expressionslauf (die Aufbewahrung geschah bei 4°C) eingesetzt. Darüber hinaus wurden getestet 20µl Reaktionslösung nach Expression, je 40µl Zentrifugationsüberstand und 40µl Eluat. Bei keiner der Expressionsproben konnten AC-Aktivitäten über dem Kontrollwert erreicht werden.

Zur Expressionskontrolle wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (s. *Abbildung 44*). Lediglich im Zentrifugations-Pellet kann eine starke Bande auf einer Laufhöhe zwischen 45 und 36kDa erkannt werden, welche in der gelelektrophoretischen Auftrennung des Pellets der AnaCyaB1 (AS 595-895)-Expression nicht vorhanden ist. In den Spuren der Reaktionslösung vor und nach Expression und im Zentrifugationsüberstand kann keine zusätzliche Bande ausgemacht werden. Im Eluat tritt ebenfalls keine Bande auf der erwarteten Laufhöhe von 40,1kDa auf. Der Proteingehalt von 43ng/µl wird vermutlich durch Proteinverunreinigungen, deren Banden schwach erkennbar sind, dargestellt.

Das Ergebnis weist darauf hin, daß auch in dem zellfreien System keine ausreichende pAC-Proteinmenge löslich synthetisiert wurde, sondern das exprimierte Protein in Form von Aggregaten anfiel.

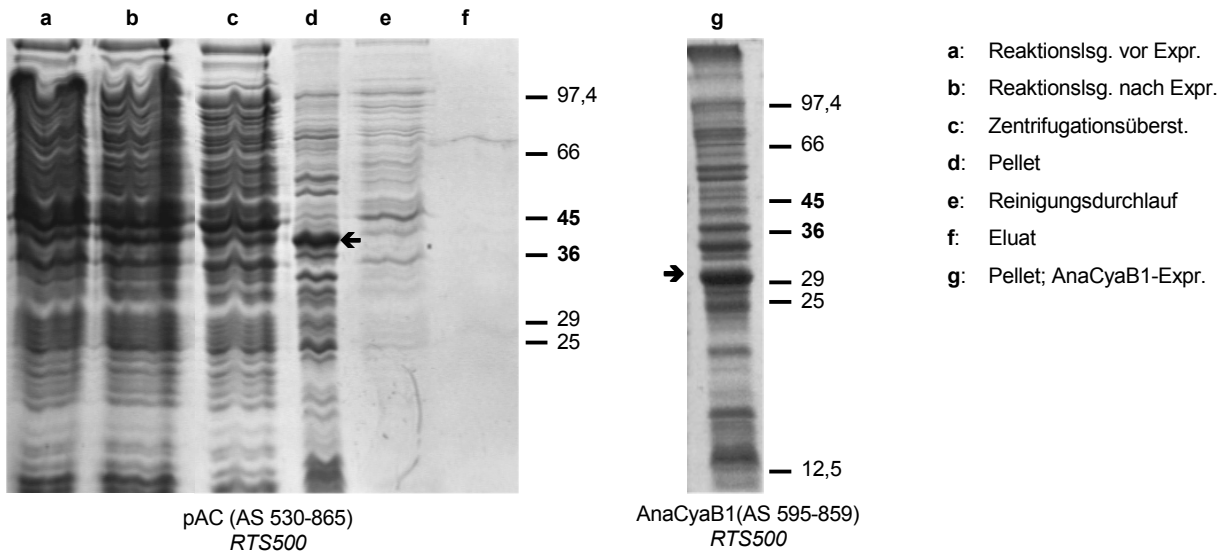


Abbildung 44: SDS-PAGE-Gel der *RTS500*-Expression. Gezeigt ist das Gel der pAC (AS 530-865)-Expression und als Vergleich die Spur des resuspendierten Pellets der AnaCyaB1 (AS 595-859)-Expression. Es wurden je 10 μ l Reaktionslösung vor und nach Expression, Zentrifugationsüberstand und Reinigungsdurchlauf aufgetragen. Vom Eluat wurden 5 μ l auf das Gel gegeben. Die aufgetragene Menge resuspendierten Pellets entspricht den partikulären Rückständen aus 10 μ l Reaktionslösung. Der Pfeil bei Spur d markiert die Produktbande bei ca. 40kDa, die im Vergleichspellet der AnaCyaB1-Expression nicht vorhanden ist. Das Expressionsprodukt der AnaCyaB1-Expression ist in der Pelletspur auf einer Laufhöhe von ca. 30kDa zu erkennen (Pfeil). Die schwachen Banden im Eluat sind nach der Digitalisierung des Bildes nicht mehr sichtbar. Mangels Probenmaterial konnte weder das SDS-PAGE-Gel wiederholt, noch ein Western Blot durchgeführt werden.

4.7.2 Paramecien-Lysat als Zusatz in der *in vitro*-Expression

Die Bildung von Aggregaten oder *inclusion bodies* bei der Expression des löslichen pAC-Bereichs sowohl in *E.coli* als auch im zellfreien System wurde auf Proteinfehlfaltung zurückgeführt, die offenbar auch durch das Arbeiten bei verminderter Temperatur (RT bzw. 30°C) nicht verbessert werden konnte. Es wurde angenommen, daß der *E.coli*-Proteinsyntheseparat (u.a. Chaperone und *heat shock* Proteine) die Faltung nicht bewerkstelligen konnten. Der Vorteil des zellfreien Systems, exogene Substanzen zusetzen zu können, führte zu der Überlegung, Paramecien-Lysat in die Reaktion einzubringen. Dadurch sollten proteinfaltungsunterstützende, Paramecien-eigene Komponenten während der Proteinbiosynthese zur Verfügung gestellt werden.

4.7.2.1 Herstellung des Paramecien-Lysats und Aufbereitung für die *in vitro* Expression

Aus 3l axenischer Kultur von *Paramecium tet. 51S* wurden ca. 80Mio. Zellen für die Herstellung des Lysats verwendet (Vorgehensweise s. Abschn. 3.6.2.1). Nach Lyse und Zentrifugation wurde ein recht viskoser Überstand erhalten, was vermuten ließ, daß die Zellkerne z.T. beschädigt und genomische DNA freigesetzt worden war. Die Zugabe der S7-Nuklease führte zu einem niederviskosen Lysat, obwohl die gleichzeitige Ca²⁺-Zugabe als Nuklease-Cofaktor nicht stattgefunden hatte. Anhand einer Agarose-Gelelektrophorese wurde der Erfolg des

DNA-Abbaus überprüft. Die DNA war auf ca. 900bp bis <500bp-Fragmente verdaut worden, was als ausreichend erachtet wurde. Es wurden die sogenannten 10.000g- und 100.000g-Lysate hergestellt, letztere mikrosomenbefreit. Das 10.000g-Lysat besaß einen Proteingehalt von 18µg/µl, das 100.000g-Lysat von 11µg/µl. Der Unterschiede in den Proteinfractionen wurde mit SDS-PAGE-Gelen analysiert. Im 100.000g-Lysat fehlten insbesondere Proteine < 20kDa (s. *Abbildung 45*). Darüber hinaus waren auf Agarose-Gelen des 100.000g-Lysats keine DNA-Überreste mehr detektierbar (vgl. *Abbildung 46*).

4.7.2.2 Stabilitätstest

Die Lysate wurden auf Stabilität der enthaltenen Proteine getestet. Es stellte sich heraus, daß das 10.000g-Lysat bei Inkubation bei 30°C bereits nach 3Std. deutlich auszuflocken begann, während das 100.000g-Lysat erst nach 5-8Std. eine Trübung aufwies. Auf einem SDS-PAGE-Gel ist dieser Unterschied quantitativ ersichtlich (*Abbildung 45*). Während das aufgetragene Pellet des 10.000g-Lysats stark proteinbeladen ist, ist im 100.000g-Lysat nur wenig Protein vorhanden (zu beachten ist, daß in den Spuren der Proben des 100.000g-Lysats bei gleichen Auftragsvolumina nur ca. die Hälfte an Protein enthalten ist). Diese starke Tendenz zum Ausflocken würde wahrscheinlich auch während der Expressionsreaktion bestehen, wobei hier weitere Zusätze und ein Rührer vorhanden waren, so daß die Proteinaggregate möglicherweise die Reaktion nicht beeinträchtigen.

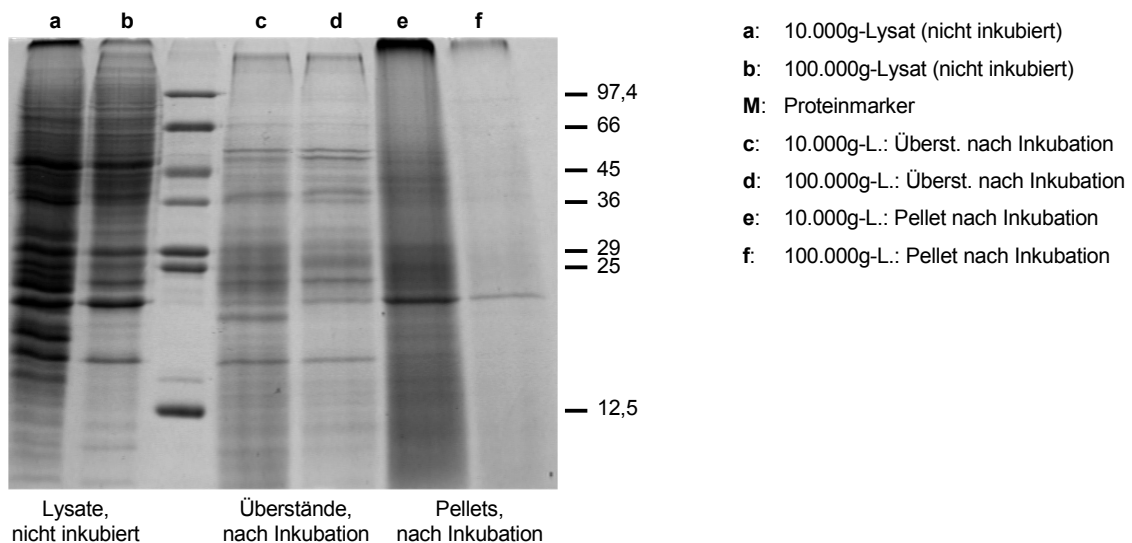


Abbildung 45: SDS-PAGE zu den Stabilitätstests. Aufgetragen wurden 4,4µl = 40µg des 10.000g-Lysats und 4,4µl = 24µg des 100.000g-Lysats nicht inkubiert. Die inkubierten Lysate (21Std., 30°C) wurden in Pellet und Überstand getrennt (Tischzentrifuge). Die Pellets wurden 2x konzentriert in Probenpuffer resuspeniert. Verglichen mit den nicht-inkubierten Proben wurden von den Überständen und den Pellets die 2x Menge aufgetragen (Überstände: 8,8µl; Pellets: 4,4µl).

4.7.2.3 Test auf Rest-DNAse-Aktivität

Der Test durch Zusatz exogener DNA entpuppte sich als nicht auswertbar, da auch bei den Negativkontrollen (Lysat mit exogenem DNA-Zusatz; nicht inkubiert) die Bande der exogenen DNA auf dem Agarosegel nicht wieder auffindbar war. Es wurde davon ausgegangen, daß sie

in den Taschen assoziiert mit Proteinaggregaten hängen blieb. Der vollständige Verdau der DNA innerhalb von 1-2min schien nicht plausibel.

Die Testung anhand dem Vergleich des Abbaugrades endogener DNA im unbehandelten Zustand und nach 4stündiger Inkubation bei 30°C zeigte keine Unterschiede (s. *Abbildung 46*). Dies führt zu dem Schluß, daß keine DNase-Aktivität mehr vorhanden war. Bei Inkubation über Nacht konnte in keiner der Probenspuren des Agarose-Gels mehr DNA detektiert werden, während in den Taschen mit bloßem Auge eine große Menge (Protein-)Rückstand erkennbar war. Dieser leuchtete stark nach Einfärbung mit Ethidiumbromid, was darauf hinwies, daß die gesamte endogene DNA in diesem Pellet hängen blieb (s.o., Tests mit exogener DNA).

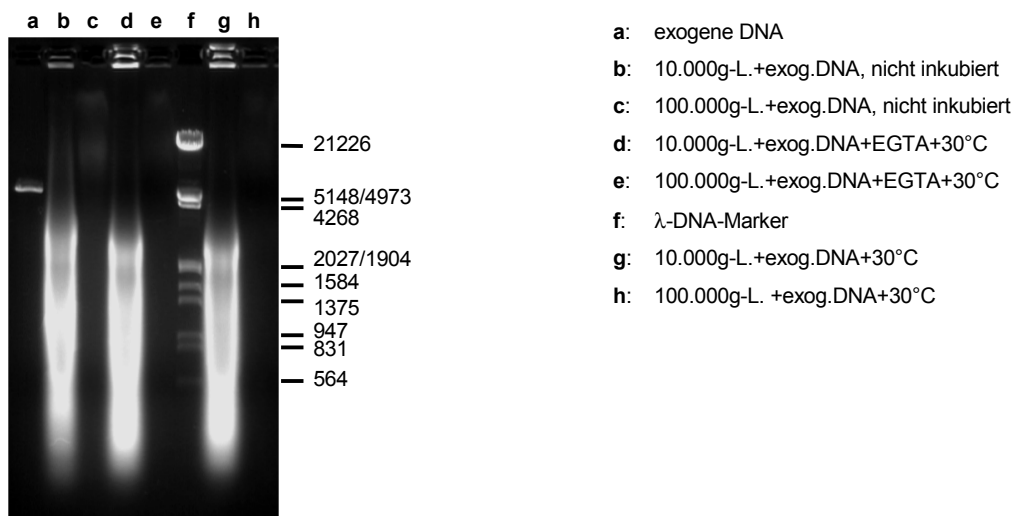


Abbildung 46: Agarose-Gelelektrophorese zum Test auf DNase-Aktivität. Die Negativkontrollen (a, b, c) wurden nicht inkubiert, sondern vor dem Auftragen aufgetaut. Die Proben d, e, g, h wurden 4Std. bei 30°C inkubiert. Den Proben d und e wurde vor Inkubation ein Zusatz von 2mM EGTA zugesetzt, was eine eventuelle DNase-Aktivität hemmen würde. In den Taschen der 10.000g-Lysate ist der Niederschlag hängen geblieben.

4.7.2.4 Überprüfung auf Proteaseaktivität

Bei der Herstellung der Lysate wurde mit dem Lyse-Puffer der Proteaseinhibitorcocktail *Complete™ mini* zugesetzt. Es wurde überprüft, ob die enthaltenen Proteaseinhibitoren jegliche proteolytische Aktivität zu hemmen vermochten, da Reste von Proteaseaktivität im Lysat den Proteinbiosyntheseapparat und entstehendes Expressionsprodukt in der *in vitro* Expression abbauen könnten. Es wurde ein *Hexahis-getaggt*es 32,2kDa Protein mit den Lysaten inkubiert und in einem Western Blot die Entstehung von Abbauprodukten überprüft (*Abbildung 47*). In den inkubierten Proben wurden keine Abbauproduktbanden nachgewiesen. Die Bandenstärke des Proteins auf der Laufhöhe des Ursprungsproteins entsprach der der eingesetzten Proteinmenge. Es konnte davon ausgegangen werden, daß keine proteolytische Aktivität mehr vorhanden war. Lediglich in den Negativkontrollen der Überstände mit Proteinzusatz, die bei -80°C bzw. 0°C gelagert wurden und bei dem reinen Testprotein, inkubiert bei 30°C, war aus ungeklärten Gründen nur noch eine geringe Proteinmenge detektierbar. Dies war jedoch ohne Einfluß auf obige Bewertung.

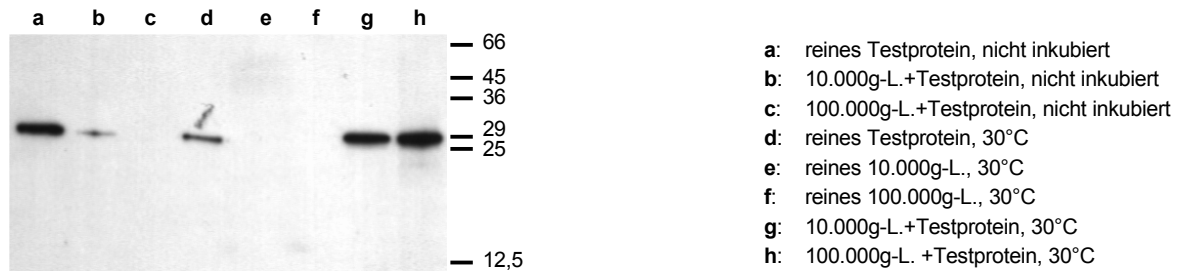


Abbildung 47: Western Blot des Test auf Proteaseaktivität. Als Negativkontrollen dienten reines Testprotein und beide Lysate jeweils mit Testproteinzusatz nicht inkubiert (a, b, c) und reines Testprotein und beide Lysate inkubiert bei 30°C (d, e, f). Die Proben (g, h) waren das 10.000g-Lysat und das 100.000g-Lysat jeweils mit Testprotein bei 30°C inkubiert.

4.7.2.5 Expressionsversuch mit dem RTS500 unter Zusatz des Paramecien-Lysats

Der Zusatz von 500µl Paramecien-Lysat zur Reaktionslösung sollte keine Bestandteile der Reaktionslösung aus dem *Kit* verdrängen. Um ein entsprechendes Flüssigkeitsvolumen in der Reaktionslösung für den Zusatz des Lysats einzusparen, wurden die lyophilisiert gelieferten Bestandteile der Reaktionslösung entsprechend konzentrierter aufgenommen.

Im ersten Versuch wurde unter Zusatz des 10.000g-Lysats der Einfluß des Paramecien-Lysats auf die *in vitro* Proteinsynthese anhand der Expression der AnaCyaB1 (AS 595-859) getestet. Die Reaktion wurde für 12Std. (30°C, 120rpm) durchgeführt. Im folgenden AC-Enzymtest konnte im Eluat der nativen Reinigung keine AC-Aktivität festgestellt werden. Eine SDS-PAGE zeigte, daß nur verschwindend geringe Mengen der AnaCyaB1 (AS 595-859) exprimiert wurden und daß bei der nativen Reinigung ein Paramecium-Protein quantitativ aufgereinigt wurde, aber keine Bande auf Laufhöhe des AnaCyaB1-Expressionsprodukts vorhanden war. Die Meßergebnisse des AC-Test zeigten bei den Proben mit Paramecienlysate sehr niedrige ³H-cAMP-Wiederfindungsraten, was auf eine sehr hohe Phosphodiesterase-Aktivität im Paramecienlysate hinweist.

Aus diesem Experiment ergaben sich folgende Problemstellungen:

- Aufgrund der Expressionshemmung der AnaCyaB1 (AS 595-859) (Positivkontrolle für Expression in *RTS500*) durch den Zusatz des Paramecien-Lysats mußte die Funktionalität des Paramecienlysate-Zusatzes grundsätzlich in Frage gestellt werden.
- Die offenbar sehr hohe PDE-Aktivität des Paramecienlysates müßte überprüft und gegebenenfalls für den Einsatz im AC-Test gehemmt werden.
- Die quantitative Aufreinigung des Parameciumlysate-Proteins erschöpft wahrscheinlich große Teile der Bindekapazität der Ni-NTA-Agarose. Die Reinigung eines eventuellen Expressionsprodukts zur Homogenität würde erst durch „Vorreinigung des Paramecienlysats“ möglich.

Verglichen mit den geringen Aussichten auf eine erfolgreiche Expression der löslichen pAC erschien der Aufwand für die Optimierung dieser Problembereiche zu hoch, so daß die Strategie der zellfreien Expression unter Paramecienlysate-Zugabe nicht weiter verfolgt wurde.

4.8 *Streptomyces lividans* – ein bakterielles Expressionssystem

Nach dem Scheitern der Expressionsversuche der pAC in *E.coli* und *HEK293* begannen Überlegungen nach alternativen Möglichkeiten. Kontakte zu Andreas Bechthold und seinem Arbeitskreis eröffneten *Streptomyces lividans* als alternatives Expressionssystem. Dies erschien vielversprechend, da Streptomyceten eine homodimere, bakterielle Klasse III-AC besitzen (*Streptomyces coelicolor* CyaA) (70), wobei die *Str.coe.CyaA* vom Brevibacterium-Typ ist, während die pAC der Gruppe der Anabaena-ACn angehört (vgl. Abschn. 5.1.1). Es bestand die Hoffnung, daß Bakterien mit einer AC dieser Art die korrekte Faltung der pAC unterstützen können. Das synthetische pAC-Gen eignete sich hinsichtlich des G/C-Reichtums gut für die Expression in *Streptomyces*.

4.8.1 *Streptomyces lividans* 1326

Zunächst wurde auf anraten von Axel Trefzer die Expression in dem Stamm *Streptomyces lividans* 1326 mit dem Plasmidvektor *pUWL201* versucht. *pUWL201* ist ein Shuttlevektor für die Expression in *Streptomyces*, welcher durch den *ermE up*-Promotor eine Überexpression ermöglicht (31).

Als Ausgangsplasmid wurde das rekombinierte Konstrukt *pQE30-Frag. e+f* (AS 524-865) verwendet, dessen Insert inklusive der benötigten RBS durch einen Verdau mit *EcoR I/Xba I* herausgeschnitten werden konnte. Durch die Verwendung der *Xba I* als 3'-Schnittstelle, welche eine einfache Klonierung in *pUWL201* ermöglichte, wurde an diesem Ende ein überschüssiges 1026bp-Vektorfragment (*downstream* Stopcodon bis *Xba I*) mitgeschleppt. Das fertige Konstrukt trug durch die Verwendung des *pQE30*-Konstrukts N-terminal das *Hexahis-tag*-Peptid MRGSHHHHHHGS.

Die Protoplastierung der Streptomyceten war diffizil. Die erhaltenen Protoplasten waren in den beschriebenen Kontrollen positiv (s. S. 54). Aus der Transformation wurden jeweils zwei unabhängige Klone einer Leervektor-Kontrolle (*pUWL201*) und des Konstrukts *pUWL201-Frag. e+f* für die Transformation gewonnen. Es wurden je eine 100ml Expressionskultur angesetzt und geerntet.

Für den ersten Enzymtest wurden zwei verschiedene Arten der Zellhomogenatherstellung getestet. Neben dem Aufschluß mit der *French™ Pressure Cell* (Standardmethode) wurde die Hälfte des resuspendierten Zellpellets anders lysiert. Nach der Zellhomogenisation mit dem Glashomogenisator, welche bei *Streptomyces* lediglich zu einer Zerkleinerung der Mycelien führt, schloß sich eine 1stündige Behandlung mit Lysozym (2mg/ml) zum Andauen der Zellwände an. Anschließend wurde nach 5maligem Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 30°C die Lyse durch eine Ultraschallbehandlung vervollständigt. Die Abtrennung partikulärer Bestandteile durch Zentrifugation erfolgte wie üblich. Die beiden Methoden unterschieden sich in der gefundenen Proteinmenge nicht nennenswert. In den AC-Test wurden sowohl die Überstände als auch die Homogenate der jeweiligen Zellhomogenat-Herstellungsmethode eingesetzt. Die Homogenate zeigten in beiden Fällen die geringere Basalaktivität. In keinem Fall konnte eine AC-Aktivität der *Frag. e+f* exprimierenden Kultur gegenüber der Leervektor-Kontrolle festgestellt werden. Eine Expression hatte jedoch stattgefunden. Das exprimierte Protein war abgeschätzt am Western Blot zur Hälfte löslich. Das Signal im Western Blot

war jedoch schwach, so daß die exprimierte Proteinmenge möglicherweise für eine Dimerisierung der katalytischen Domänen nicht ausreichte. Aus diesem Grund wurde eine Anreicherung des Proteins durch native Reinigung versucht (Zellpellet einer 100ml Expressionskultur, zweiter Klon; s.o.). Es wurde ausschließlich mit Waschpuffer P5 gereinigt (2x2ml), was sich im Eluat anhand starker Verunreinigungen kenntlich machte. Es wurde parallel eine *pUWL201*-Leervektor-Kontrolle gereinigt. Das Proteinbandenmuster (SDS-PAGE) der beiden Eluate unterscheidet sich in wenigen Banden, jedoch kommt im Eluat der Expressionskultur von Frag. e+f keine zusätzliche Bande der erwarteten Größe von 40,8kDa vor. Entsprechend ergaben sich im Enzymtest keine Werte über Kontrolle.

Die Streptomyceten-Kultur ermöglichte eine wahrscheinlich geringe, lösliche Expression des pAC cytosolischen Bereichs, so daß durch die Steigerung der löslichen Expressionsrate möglicherweise Proteinmengen erreicht werden, die eine ausreichende Dimerisierung mit sich bringen und der aktive Konzentrationsbereich erreicht wird. Hierfür wurde eine *Streptomyces lividans* Zelllinie in Betracht gezogen, welche eine genomisch inserierte T7-Polymerase trägt und hohe Expressionsraten zeigt.

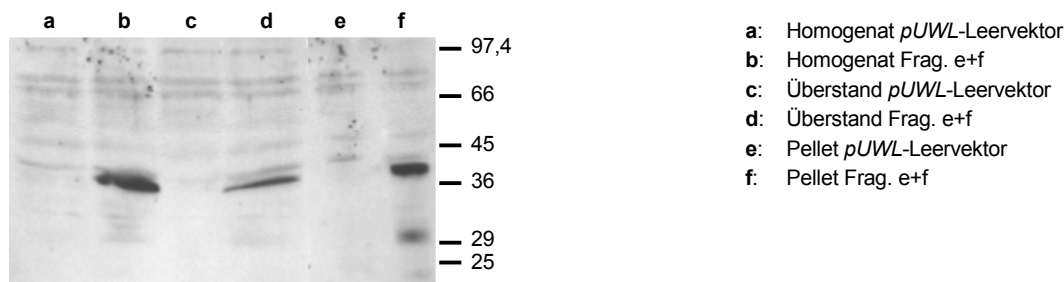


Abbildung 48: Western Blot der Expression von pAC-Frag. e+f in *Streptomyces lividans* 1326. Als Primärantikörper diente anti-RGS(His)₄-Antikörper. Die Proben stammen aus der Zellhomogenat-Herstellung mit der *French Press*. Von den Homogenaten und den Überständen wurden jeweils 40µg Gesamtprotein aufgetragen. Das Zellpellet wurde in einem zehntel des ursprünglichen Volumens mit Probenpuffer resuspendiert. Die aufgetragene Menge entspricht der 2x Menge an unlöslichen Rückständen verglichen mit der Auftragsmenge der Homogenat-Proben (Belichtungszeit: 2min).

4.8.2 *Streptomyces lividans* T7-System

Mit der T7-*S. lividans* Expressionskultur von Josef Altenbuchner (71) konnte eine Überexpressionsrate ähnlich der von *E.coli*-Expression gelingen. Dies war von *Streptomyces*-eigenen Proteinen bekannt (72). Die Expression der T7-Polymerase steht unter Thiostreptonkontrolle.

Der T7-Expressionsvektor *pRSETa* wurde für die Klonierung der Konstrukte verwendet und anschließend mit dem Streptomyceten-Plasmidvektor *pGM9* für die Transformation und Proteinexpression in *S.lividans* fusioniert.

4.8.2.1 Klonierung und Transformation

Für die Klonierung von pAC-Frag. e+f (AS524-865) wurde als Ausgangskonstrukt ein Klon verwendet, in welchem Frag. e+f analog zu *pQE30*-Frag. e+f (vgl. S. 111) inseriert war. Die Klonierung wurde über die Schnittstellen *Bam*H I/*Sac* I durchgeführt.

Als Positivkontrollen wurden kloniert: a) die bei bisherigen Expressionsversuchen verwendete AnaCyaB1 (AS 595-859), welche mit 40,1% allerdings keine G/C-reiche Codonusage besitzt. b) die MycoAC (*Rv1625c*) (AS 204-443), welche für die Expression in Streptomyeten aufgrund der Zugehörigkeit von *Mycobacterium tuberculosis* zu der Ordnung der Actinomyceten gut geeignet sein sollte. Wegen der entstehenden Schwierigkeiten und den Entwicklungen im Labor, bei welchen sich die Insektenzellkultur *Sf9* als alternative Zellkultur herausstellten (s.u.), kam es nicht zu deren Transformation.

Die in *pRSETa* klonierten Konstrukte, fusioniert mit *pGM9* wurden durch Expression in *E.coli* überprüft. Hier ergaben sämtliche Konstrukte stark überexprimierte Produkte.

Bei der Protoplastierung der *T7-S.lividans*-Kulturen kam es häufig zur vollständigen Lyse einiger Zellen während der Zentrifugationsschritte nach Lysozymbehandlung. Dies konnte an der hohen Viskosität der Mycel- und Protoplastensuspension festgestellt werden, die auf eine DNA-Freisetzung schließen ließ. Diese Problematik steht möglicherweise in Zusammenhang mit den Schwierigkeiten, die sich später durch Eintrübung der Kulturen zeigten (s.u.). Die Protoplasten einer geglückten Protoplastierung (Protoplasten-Kontrollen positiv) wurden mit *pGM9-pRSETa*-Leervektor (Negativkontrolle) und *pGM9-pRSETa*-Frag. e+f transformiert. Es wurden jeweils zwei Kanamycin-resistente Klone in Kultur genommen werden.

4.8.2.2 Expression von Frag. e+f in *T7-S. lividans*

Für die Expression wurden 100ml R5-Medium mit je 1ml einer dicht gewachsenen Vorkultur angeimpft und jeweils einmal mit 25µg/ml und einmal mit 50µg/ml Thiostrepton induziert. Die Ernte erfolgte nach 24stündiger Kultivierung. Es trat eine leichte Trübung des überstehenden Mediums nach Absetzen der Mycelien auf. Die mikroskopische Kontrolle zeigte nur vereinzelt Vorkommen kleiner, runder Punkte, die nicht eingeordnet werden konnten, so daß nichts gegen die Verwendung der Kulturen für einen Enzymtest sprach. Für den AC-Test wurden die Zellpellets von je 40ml Kultur eingesetzt, nach Standardmethode aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Die Zentrifugationsüberstände fanden Verwendung für den AC-Test, jedoch wurde in keiner Probe der beiden Frag. e+f-Klone Aktivität über Kontrollwert gemessen.

Ein SDS-PAGE-Gel zeigte, daß der pAC-katalytische Bereich nicht in sichtbarer Menge exprimiert wurde (Gel nicht gezeigt).

Das Experiment sollte unter Anwendung einiger Optimierungen, die nach Rücksprache mit Volker Pfeifer bekannt wurden, unter der parallelen Mitführung der Positivkontrollen wiederholt werden. Eine Verbesserung der Expression konnte nach aktueller Erfahrung von Volker Pfeifer durch Überimpfen großer Mengen Vorkultur (25ml-100ml abgesetzt Kultur) auf die zu induzierende Hauptkultur und lange Expressionszeiten, z.T. bis 48Std. erreicht werden. Darüber hinaus konnten hohe Thiostrepton-Konzentrationen zur Induktion eingesetzt werden.

4.8.2.3 Ungeklärte Trübungsproblematik in *Streptomyces lividans*-Kulturen

Für die optimierte Expression sollten sämtliche Konstrukte gemeinsam transformiert und exprimiert werden. Neue Protoplastierungen ließen sich jedoch nicht mehr durchführen, da die Kulturen sowohl in CRM-, als auch in R5-Medium ca. 3-12Std. nach Erreichen einer dicht gewachsenen Kultur eine Eintrübung des Mediums zeigten, die nach Absetzen der Mycel-Kultur

im überstehenden Medium erhalten blieb. Wurde die Protoplastierung vor dem sichtbaren Eintrüben durchgeführt, entstanden auch nach kurzer Lysozymbehandlung meist hochviskose Mycel-/Protoplastensuspensionen, wahrscheinlich durch DNA-Austritt. Protoplastierungen, die erfolgreich schienen, waren positiv in den Antibiotika-Sensitivitäts- und Resistenztests, jedoch lysierten sie nicht bei der Inkubation mit demineralisiertem Wasser (s. S. 54), d.h. sie verhielten sich wie zellwandhaltiges Mycel.

Die mikroskopische Kontrolle der eingetrübten Kulturen zeigte neben Streptomycceten-Mycel kleine, ovale Punkte, welche Einzeller sein konnten und sich zu bewegen schienen. Das Aussehen dieses Kulturbestandteils erinnerte an das von Protoplasten. Der erste Verdacht wies auf eine Kontamination hin. Dies wurde von Volker Pfeifer und Shu Ming Li nach einer kurzen mikroskopischen Untersuchung ebenfalls für wahrscheinlich gehalten, wobei Uneinigkeit bezüglich des Geruchs der Kultur herrschte. Streptomycceten-Kulturen besitzen einen charakteristischen Geruch, dessen Änderung auf eine Kontamination hinweist. Während die Mitglieder des einen Arbeitskreises den Geruch für normal hielten, empfand der andere Arbeitskreis den Geruch als etwas zu süßlich.

Es wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, die eine Kontamination nicht bestätigten:

- a) Um sicher zu gehen, daß es sich nicht um eine Kontamination der Dauerkulturen handelte, wurde eine frische Kultur von Volker Pfeifer verwendet, welche im dortigen Labor „kontaminationsfrei“ angezchtet wurde. Im hiesigen Labor stellte sich wiederum nach 1 bis 2 1/2 Tagen eine Trübung ein.

- b) Die Arbeitsinstrumente und Medien wurden frisch autoklaviert.

Reines Medium (CRM, R5) wurde ohne weiteres Öffnen entsprechend der Streptomycceten-Kulturen bei 30°C und schütteln inkubiert; das Medium blieb auch nach mehreren Tagen klar.

Die Kontaminationsfreiheit der LaminAir-Sterilbank wurde getestet durch die 1stündige Inkubation einer geöffneten R5-Agarplatte unter der in Betrieb befindlichen Bank; es wurde kein Koloniewachstum auf der Platte festgestellt.

Die Überprüfung der Eppendorf-Pipetten als einzige nur äußerlich desinfizierte Arbeitsgeräte erfolgte durch mehrmaliges Luft Ausstoßen in reines Medium bzw. Medium Auf- und Abpipettieren; auch nach einwöchiger Inkubation des Mediums war kein Wachstum von Mikroorganismen erkennbar.

- c) Das überstehende Medium einer eingetrübten Kultur enthielt nach Absetzen des Streptomycceten-Mycels hauptsächlich die einzellerartige Eintrübung und wenig kurze Mycelfäden. Ein Aliquot wurde in einer Verdünnungsreihe auf Agarplatten (R5, LB) ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten konnte jedoch auf beiden Medien morphologisch nur eine Art von Kolonien gefunden werden, welche entsprechend der Streptomycceten sehr fest, und nicht zu verstreichen war. Nach längerer Inkubation (mehrere Tage) bildeten sich auf den R5-Platten Kolonien mit der für Streptomycceten typischen mehlartigen Oberfläche, die nach einigen weiteren Tagen Falten warfen und sich stellenweise rötlich färbten. Das Aussehen entsprach dem von Streptomycceten-Kolonien, andere Kolonien konnten nicht festgestellt werden. Ein weiteres Aliquot des Überstands wurde auf LB-Medium mit Streptomycin bzw. Spectinomycin angeimpft. Auch in diesen Schüttelkulturen (zunächst bei 37°C kultiviert) entstand nur eine mycelartig wachsende Kultur

entsprechend der Streptomyceten, das überstehende Medium blieb auch nach Tagen klar.

- d) Von der T7-Streptomyces Ausgangskultur von Volker Pfeifer (auf Agarplatte) wurde mit einer gut ausgeglühten Impföse eine Aliquot abgenommen und ohne Homogenisation, d.h. ohne Verwendung weiteren Arbeitsgeräts, auf reines Medium ohne AB überimpft. Auch hier entstand nach ca. 3-12Std. nach Erreichen einer dichten, Streptomyceten-Mycel Kultur eine Trübung. Das gleiche geschah bei Durchführung eines entsprechenden Tests mit den unter b) beschriebenen Kolonien von Agarplatten des Verdünnungsausstrichs.

Diese Kontaminationstests zeigten, daß sowohl das Arbeitsgerät als auch die Ausgangsmaterialien (Medien, Antibiotika) ausreichend steril waren. Die Untersuchungen, die mit dem trüben Kulturüberstand durchgeführt wurden, ergaben keinen Hinweis auf eine Kontamination.

Das Weiterarbeiten mit dieser Streptomyceten-Kultur hätte eine aufwendige Überprüfung der Trübung mit mikrobiologischen Tests zur Identifizierung der möglichen Kontamination oder der verschiedenen Medienbestandteilen, die zu der Eintrübung z.B. durch den „Zerfall“ des Mycels führten. Hierauf wurde in Anbetracht des Aufwands und der Tatsache, daß durch Jost Weber als alternative Expressionskultur die Insektenzellkultur *Sf9* entwickelt wurde, verzichtet.

4.9 Proteinexpression in der Insektenzellkultur *Sf9*

Jost Weber arbeitete mit einem der pAC entsprechenden Enzym aus Plasmodium falciparum (pIAC). Es war ihm gelungen, den cytosolischen Abschnitt dieses Proteins in der Insektenzellkultur Sf9 funktionell zu exprimieren. Auch die native Reinigung dieses hexahis-getaggtten Proteinabschnitts war möglich (73).

Jürgen Linder hatte bereits zu Beginn der Expressionsarbeiten Versuche mit pAC in Sf9 unternommen. Er konnte das Holoenzym exprimieren (s. Abbildung 58, Abbildung 60), jedoch keine Aktivität feststellen. Der lösliche Abschnitt des Enzyms konnte ebenfalls nicht aktiv exprimiert werden.

Die positiven Ergebnisse von Jost Weber mit *Sf9* waren Anlaß, neue Expressionsversuche mit pAC in dieser Zellkultur zu beginnen. Es wurden zwei verschieden lange pAC-Konstrukte zur Transfektion gebracht. Darüber hinaus wurden vier pAC-pIAC-Chimären für die Expression in dieser Kultur entworfen, die zwei herausstechende Unterschiede in den Primärsequenzen des katalytischen und C-terminalen Bereichs dieser beiden ansonsten sehr stark konservierten ACn berücksichtigten. Diese Chimären sollten die Möglichkeit bieten, den kritischen Proteinabschnitt der pAC zu identifizieren, welcher im Vergleich zur pIAC bei Expression zu nicht-funktionellem Protein führte.

4.9.1 Konstrukte für die Transfektion und deren Klonierung

Die Durchführung der Virusgewinnung und der transienten Transfektion erfolgte wie in Kapitel 3.9 beschrieben. *Abbildung 50* zeigt eine Übersicht über die exprimierten Konstrukte.

Als Kontrolle für die Virusherstellung, die Handhabung und die Funktionalität der Kulturzellen wurde ein aktiv exprimierbares Konstrukt der pIAC (AS 526-884) (analog AnaCyaB1 AS 595-

859) von Jost Weber durch die gesamte Prozedur von der Bacmid-Herstellung bis zur Transfektion und Homogenatherstellung parallel bearbeitet.

4.9.1.1 Modifikation des *pFastBac1* zu *pFastBacHis*

Für die Klonierung der zu exprimierenden Gene wurde das Donorplasmid *pFastBac1* verwendet. Um die N-terminale Fusion der Genprodukte mit einem *Hexahis-tag* zu erreichen, wurde das Plasmid modifiziert. Jürgen Linder inserierte einen Konstrukt in den *pFastBac1*, welcher zwischen der geglätteten *BamH I*-Schnittstelle (Δ *BamH I*) und der *Hind III*-Schnittstelle eine *Kozac*-Sequenz, gefolgt von einer Sequenz, die für MRGSHHHHHGS codiert, einführte. GS codiert für eine *BamH I*-Schnittstelle welche für die Klonierungen in *pFastBacHis* verwendet wurde (s. *Abbildung 49*). Dieser Konstrukt von Jürgen Linder war das Ausgangsplasmid für die Klonierungen in *pFastBacHis*.

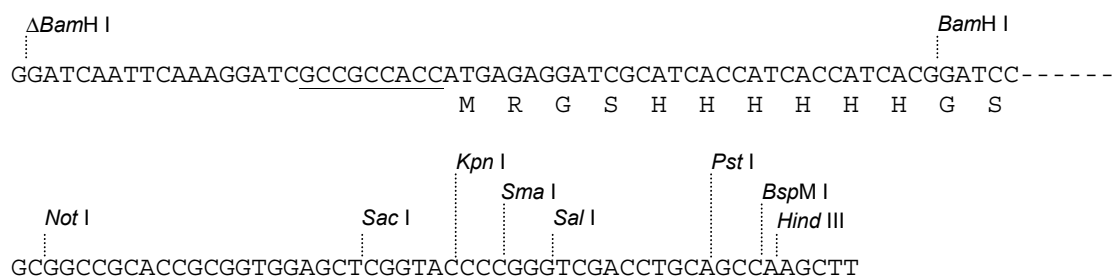


Abbildung 49: MCS des *pFastBacHis*. Die ursprüngliche MCS von *pFastBac1* wurde zwischen den Schnittstellen *BamH I* (in *pFastBacHis* als Δ *BamH I* eingezeichnet) und *Hind III* durch einen Konstrukt mit *Kozac*-Sequenz (unterstrichen) und *Hexahis-tag* ersetzt. Die Klonierungen in *pFastBacHis* erfolgen am 5'-Ende über die „neue“ *BamH I*-Schnittstelle. Alle weiteren angegebenen Schnittstellen der MCS im modifizierten Vektor sind singular. Die gestrichelte Linie zwischen *BamH I* und *Not I* deutet den Bereich an, welcher das Konstrukt von Jürgen Linder beinhaltet und bei Klonierungen (i.d.R. *BamH I/Not I*) herausgeschnitten wurde.

4.9.1.2 Reine pAC-Proteinabschnitte

Für die pAC-Expression in *Sf9* wurden Enzymabschnitte gewählt, die exakt analog zu pAC-Abschnitten waren, die aktiv in *Sf9* exprimierbar waren (73). Beide waren von Jürgen Linder bereits in *pFastBacHis* kloniert, jedoch nicht transfiziert worden.

Der cytosolische Abschnitt von pAC (AS 530-865), welcher dem best exprimierbaren AnaCyaB1-Abschnitt (AS 595-859) (s. Abschn. 4.4.1) entspricht, wurde in Form der Stopcodon-Mutante (s. Abschn. 4.3.4) für die Expressionsexperimente ausgewählt. Jürgen Linder hatte diesen Abschnitt bereits als synthetische Genvariante transfiziert und konnte keine aktive Expression erreichen. Die Stopcodonvariante besaß auch für *Sf9* eine nicht-optimale Codonusage, so daß die daraus resultierende langsamere Expressionsrate möglicherweise zu aktiv gefaltetem Protein führen könnte.

Ein zweites Konstrukt war pAC (AS 515-865). Dieser Proteinabschnitt beinhaltete den mutmaßlichen *Pore*-Bereich. Hintergrund für die Klonierung dieses Konstrukts war die Überlegung, daß intramolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen in der pAC Auswirkungen auf die Faltung des Enzyms besitzen können. Der kurze Linker zwischen *Pore-Loop* und der AC-

katalytischen Domäne machte eine räumlich nahe Anordnung und damit Wechselwirkungen mit diesem Proteinabschnitt denkbar. Möglicherweise führt die N-terminale Verlängerung der cytosolischen Schleife bei der Proteinsynthese und -faltung zur richtigen Orientierung der entstehenden AS-Sequenz. Jost Weber konnte den entsprechenden pAC-Abschnitt mit einer geringen AC-Aktivität löslich exprimieren.

Klonierung:

Beide Konstrukte wurden von Jürgen Linder über die *Bam*H I/*Not* I-Schnittstellen in *pFastBachHis* kloniert. Hierfür wurde direkt *upstream* der entsprechenden Basen des pAC-Gens eine *Bam*H I-Schnittstelle eingeführt. Die *Not* I-Schnittstelle am 3'-Ende ist im pACsyn-Gen enthalten.

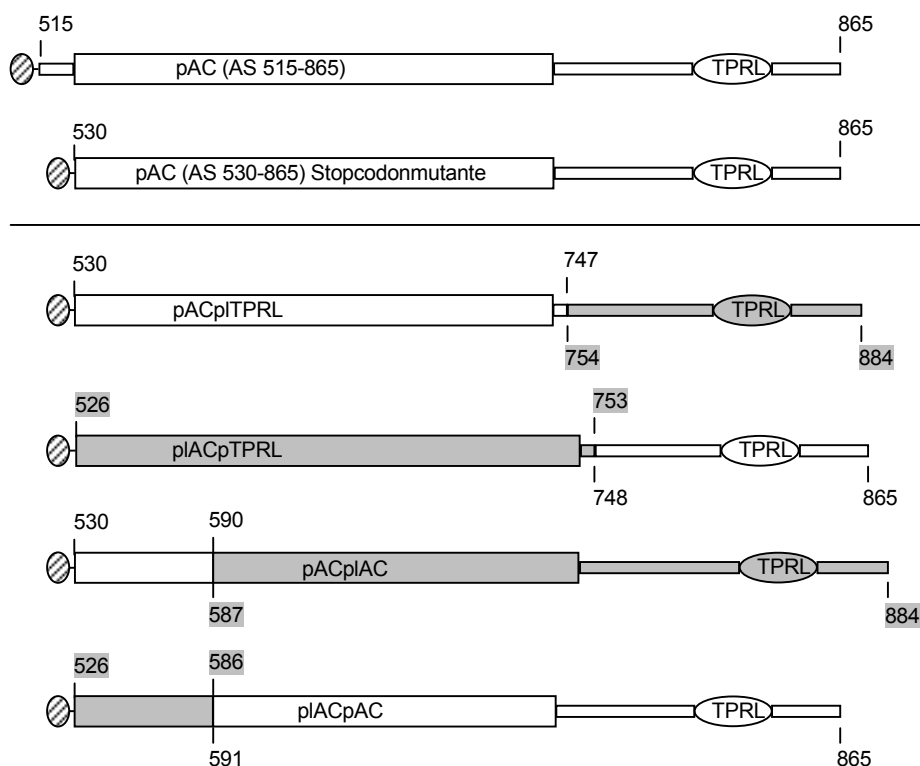


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Konstrukte für die Expression in *Sf9*. pAC-Proteinabschnitte sind weiß, pIAC-Proteinabschnitte grau gekennzeichnet. Der *Hexahis-tag* ist durch das schraffierte Oval dargestellt, die katalytische Domäne durch den breiten, rechteckigen Block, der TPRL durch das Oval und Linkerbereiche und der C-Terminus durch die schmalen, rechteckigen Abschnitte. Die Darstellung ist maßstabsgetreu.

4.9.1.3 Chimären zwischen pAC und pIAC

Ausgehend von den cytosolischen Proteinabschnitten der beiden Enzyme (pAC: AS 530-865 und pIAC: AS 526-884) konnten im Alignment der Sequenzen zwei markante Unterschiede in den ansonsten stark konservierten Primärsequenzen festgestellt werden (vgl. *Abbildung 51*).

```

pAC : NKNIGDAFLLVWKINDSQWYEDG--NEIKWSNLTF-----INQLADCALLAFMKIYA : 628
pIAC : NKNIGDAFLLVWKYQKKE-YSNKKMMNMFKSPNNNYDEYSEKENINRIGDLAFLSTVQTLI : 633
      ==Block-II==

```

```

pAC : KINREPKILEYRNDERLSQRLPGYKVKMGFGLHICWGIEGA : 669
pIAC : KLRKSEKIHIIFLNENMDELTKNNILELSFGLHFCWALEGA : 674
      ==Block-III==

```

```

pAC : GLFTVEMEADDLPP--SKODYPQ----EEKQQVMYE---KKQIFLQQLESQDFNAELYI : 785
pIAC : NLYTFDICLNKITKKVNMENFDAKPHFDVKLLKVEDDIKKKAEKRRKRKKEVLNLSYNLYE : 800
      kat. ←          +++  ++++++

```

```

pAC : K--RNKDLGLITKNVNQEFLEHOF : 806
pIAC : EYAKNDIIFKFIKIHYPKDYLEOF : 823
      ↳TPRL

```

Abbildung 51: Bereichsalignments zwischen pAC und pIAC. Diese beiden Alignments zeigen die Abschnitte geringerer Konservativität in der katalytischen Domäne zwischen den ansonsten stark konservierten Sequenzen. Oben: Alignment im Linkerbereich zwischen Konsensusblock II und III; der saure Proteinabschnitt in pIAC ist mit „-“ gekennzeichnet. Unten: Linkerbereich zwischen katalytischer Domäne und TPRL; der stark basische Sequenzabschnitt in pIAC ist mit „+“ gekennzeichnet.

Linkerbereich zwischen katalytischer Domäne und TPRL:

pIAC besitzt einen um 12AS längeren Linkerbereich (AS 747-818) als pAC (AS 742-802). Der Linker zwischen katalytischer Domäne und TPRL der pAC ist bereits deutlich länger als der der verwandten ACn AnaCyaB1 und AnaCyaB2. In der AS-Komposition der zusätzlichen AS der pIAC ist ein kurzer, sehr basischer Bereich auffällig. Aus diesem Grund wurde am Ende des zwischen beiden Sequenzen konservierten Bereichs (bis 6AS *downstream* des Endes der katalytischen Domäne (pAC: AS 747, pIAC: AS 753)), ein Überkreuzungspunkt gewählt. Es entstand ein Konstrukt mit dem pAC-katalytischen Bereich+6AS (AS 530-747) und dem C-Terminus inklusive Linker-Bereich und TPRL der pIAC (AS 754-884) um zu überprüfen, ob dieser basische AS-Abschnitt und der pIAC-TPRL und -C-Terminus einen Einfluß auf die lösliche Expressierbarkeit der pAC-katalytischen Domäne besitzen. Als Kontrolle wurde das Gegenchimäre konstruiert: pIAC bis 6AS *downstream* des katalytischen Bereichs (AS 526-753) mit dem pAC-C-terminalen Abschnitt inklusive Linker und pTPRL (AS 748-865). Diese Kontrolle sollte Auskunft darüber geben, ob der entsprechende pAC-Abschnitt einen negativen Einfluß auf die funktionelle Expression der pIAC besitzt (vgl. *Abbildung 52*).

```

pAC      : GKRKW-----//-----LFTVEMEADDLPP--SKQDQ--// -GYRELTEK.
pIAC     : GEIVY-----//-----LYTFDICLNKITKKVNMENF--// -GYRKFLQKS.

```

```

pACpI TPRL: GKRKW-----//-----LFTVEMEADDLTKKVNMENF--// -GYRKFLQKS.
pIACp TPRL: GEIVY-----//-----LYTFDICLNKI PP--SKQDQ--// -GYRELTEK.

```

Abbildung 52: Übersichtsalignment im Bereich der Austauschpunkte der pAC-pIAC-Chimären mit ausgetauschten C-Termini. *pACpI TPRL* (pAC 530-747/pIAC 754-884), *pIACp TPRL* (pIAC 526-753/pAC 748-830). Unterstrichene AS: die korrespondierende DNA-Sequenz beinhaltet die für die Klonierung verwendeten bzw. *silent* eingeführten Schnittstellen.

Linkerbereich zwischen Konsensusblock II und III:

Dieser Abschnitt ist allgemein bei den (cyanobakteriellen) Klasse III-ACn nicht längenkonserviert. So auch zwischen den beiden konservierten Vertretern pAC und pIAC. Der verbindende Proteinabschnitt ist im pIAC-Enzym 9AS länger. In diesem Bereich ist die Konservierung zwischen beiden Proteinen für 20 bzw. 29AS etwas geringer (pAC: AS 592-611, pIAC: AS 534-563). Es war zu überprüfen, ob diese Längendifferenz einen Beitrag zu dem Unterschied in der Exprimierbarkeit der beiden Enzyme leistet, insbesondere, weil die zusätzlichen AS des pIAC-Linkers einen sauren Abschnitt beinhalten. Zu beachten ist, daß die Konzeption des Versuchs nur einen Anhaltspunkt darüber liefert, ob der Linkerbereich einen Einfluß besitzt, da der gesamte folgende Enzymabschnitt ausgetauscht wurde. Die hohe Konservierung zwischen beiden Primärsequenzen besteht bis pAC AS WK (590, 591) (pIAC WK (532, 533)); unmittelbar anschließend beginnt der Abschnitt schwächerer Ähnlichkeit. Zwischen den AS WK wurde ein Austausch zwischen den Enzymen vorgenommen. Es entstanden zwei Konstrukte, das eine mit pAC AS 530-590/pIAC 587-884, das andere pIAC 526-586/pAC AS 591-865 (vgl. *Abbildung 53*).

```
pAC      : GKRKW-//-NKNIGDAFLLVWKINDSQ-----//-----GYRELTEK.
pIAC     : GEIVY-//-NKNIGDAFLLVWKYQKKE-----//-----GYRKFLQKS.
-----
pACpIAC : GKRKW-//-NKNIGDAFLLVWKYQKKE-----//-----GYRKFLQKS.
pIACpAC : GEIVY-//-NKNIGDAFLLVWKINDSQ-----//-----GYRELTEK.
```

Abbildung 53: Übersichtsalignment zur Darstellung der *Cross-over*-Punkte der pAC-pIAC-Chimären innerhalb der katalytischen Domäne nach Konsensusblock II. *pACpIAC* (pAC 530-590/pIAC 533-830), *pIACpAC* (pIAC 472-532/pAC 591-865)

Klonierung:*pACpITPRL:*

An der Austauschstelle konnte keine Schnittstelle durch silent Mutation eingeführt werden. Statt dessen wurde 3AS downstream auf VN (pIAC AS 756/757) eine Hpa I-Schnittstelle eingeführt: Das upstream liegende Fragment der pAC (530-747) wurde inklusive des kurzen pITPRL-Fragments bis Hpa I durch PCR mit den Primern ACeV1s (von Jürgen Linder) und pACpIHpa-as gewonnen. Der 5'-Überhang des sense-Primers führte eine BamH I-Schnittstelle ein. Von dem 5'-Überhang des antisense-Primers wurden die ersten 5AS des pITPRL inklusive VN (Hpa I) codiert.

Das pITPRL-Fragment wurde mittels PCR mit dem Primerpaar HpapIAC-s / PIACsyntKat-as amplifiziert. Der sense-Primer führte durch silent Mutation eine Hpa I-Schnittstelle auf VN ein, der antisense-Primer, welcher von Jost Weber zur Verfügung gestellt wurde, trug downstream des pIAC-Stopcodons eine Not I-Schnittstelle. Die Klonierung erfolgte in pBluescript II SK(-) durch Tripelligation (PCR-Matrizen: pACsyn bzw. pIACsyn⁴⁵).

pIACpTPRL:

Auch bei diesem Konstrukt konnte keine Schnittstelle an der Nahtstelle zwischen pIAC und pTPRL geschaffen werden. Es wurde die Sfu I-Schnittstelle von pACsyn (bp 2260) verwendet.

⁴⁵ Synthetisches Gen der pIAC von Jost Weber.

Für die Amplifikation des pIAC-Fragments (AS 526-752) inklusive der ersten 4AS des pTPRL-Fragments wurde eine PCR mit dem Primerpaar PIACsynKat-s / pIACpSfu-as durchgeführt, wobei der sense-Primer (von Jost Weber) die benötigte 5'-BamH I-Schnittstelle einführte, während der antisense-Primer im Überhang für die 4AS PPSK des pTPRL-Anteils kodierte. Die Klonierung erfolgte durch Tripelligation in pBluescript II SK(-).

pACpIAC und pIACpAC:

Die chimäre Übergangsstelle zwischen pAC und pIAC (und umgekehrt) lag zwischen den AS W und K. Hier konnten für die Klonierung zwei geeignete blunt-cutter Schnittstellen eingeführt werden. W wird kodiert durch das erste Basentriplett der Msc I-Erkennungssequenz, das Lys-Codon ist Bestandteil der Dra I-Schnittstelle (zweites Basentriplett der Erkennungsstelle). Die N-terminalen Fragmente der beiden Chimären wurden mittels PCR inklusive einer BamH I-Schnittstelle am 5'-Ende und einer das W beinhaltenden Msc I-Schnittstelle am 3'-Ende amplifiziert. Die C-terminalen Fragmente der Chimären wurden mit einer 5'-Dra I-Schnittstelle, deren zweite Hälfte für K codiert und einer 3'-Not I-Schnittstelle downstream des Stopcodons erzeugt (s. *Abbildung 54*). Die entsprechenden Konstrukte der pAC konnten von Jürgen Linder übernommen werden. Sie waren beide auf Basis der Stopcodon-Mutanten (s. Abschnitt 4.3.4) hergestellt worden. Die Fragmente der pIAC wurden mit den Primerpaaren PIACsyntKat-s / PlasmACMsc-as und PlasmDraDramut-s / PIACsynKat-as amplifiziert. Das verwendete synthetische Gen der pIAC von Jost Weber besaß bereits eine Dra I-Schnittstelle 45bp downstream des 5'-Endes des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts (pIAC-N-terminaler Abschnitt). Diese Erkennungssequenz mußte silent entfernt werden, was durch eine entsprechende Länge des sense-Primers PlasmDraDramut-s, welcher eine Mutation einführte, erreicht wurde. Die endgültige Klonierung der beiden Chimäre erfolgte durch Tripelligation in pBluescript II SK(-).

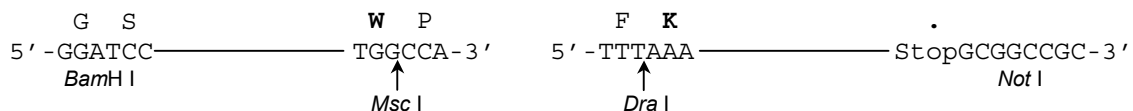


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Chimäre pACpIAC und pIACpAC.

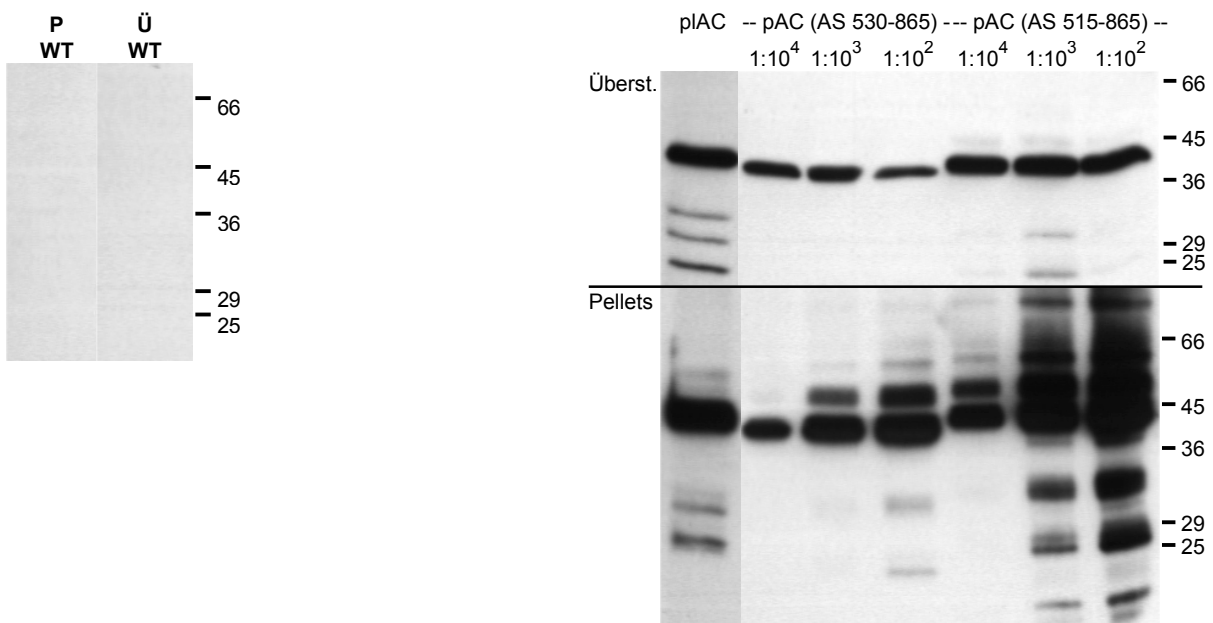
4.9.2 Expression von Verkürzungen und Chimären

Sowohl die Bacmid-Herstellung aus den in das Donorplasmid *pFastBachHis* klonierten Konstrukte als auch die Primärvirusgewinnung gelang ohne Probleme. Die Entstehung von Primärviren wurde indirekt an den Zellrückständen der Lipo-Transfektion nach Abnahme des Medienüberstandes (Primärvirusstock) überprüft. Es wurde ein Western Blot mit anti-RGS(His)₄-Antikörper durchgeführt, welcher die Expressionsprodukte der Gene als Marker der Virusamplifikation nutzte. Sämtliche Genprodukte inklusive der Positivkontrolle pIAC (AS 526-884) konnten nachgewiesen werden. Das bedeutete, daß die transfizierten Bacmide rekombinant waren und eine Virusamplifikation stattgefunden hatte an deren Ende die Virusausschleusung durch Zelllyse steht. Die Sekundärvirusherstellung wurde ohne Titerung mit 300µl Primärvirus durchgeführt. Anhand der Zellmorphologie war die Virusinfektion der Zellen ersichtlich.

Es folgte die transiente Transfektion der Konstrukte. Zunächst wurde jedes Konstrukt einzeln parallel zu der Transfektion der Positivkontrolle pIAC (AS 526-884) und der Negativkontrolle Wildtyp-Virus in einer Infektionsreihe von 1:10⁵, 1:10⁴, 1:10³ und 1:100 auf 15ml Sf9-Schüttelkultur transfiziert, um die optimale Transfektionsrate festzustellen. Anhand der Zellmorphologie kann gesagt werden, daß generell die 1:10⁵ Infektionsrate zu gering war. Die höchste Infektionsrate von 1:100 ergab nach 72Std. vollständig infizierte Kulturen, in denen der größte Teil der Zellen lysiert war. Die aufbereiteten Zellhomogenate der Kulturen wurden in Western Blots eingesetzt (s. *Abbildung 55*).

Die Western Blots der Zentrifugations-Überstände und Pellets wiesen für sämtliche Konstrukte neben einer unlöslichen auch eine lösliche Expression nach. Die Expressionslevel schwankten jedoch stark. Der Konstrukt pAC (AS 515-865) erreichte eine vergleichbare lösliche Expression wie das aktive pIAC-Fragment (AS 526-884). Auch das pAC-Fragment ab Beginn der katalytischen Domäne (AS 530-865) wird mit ca. der halben löslichen Expressionsrate des pIAC-Fragments gut exprimiert. Die lösliche Expression der pAC-pIAC-Chimären erreicht zum Teil die Hälfte des pIAC-Fragments, ist meist aber geringer. Sehr wenig Expression zeigt das Konstrukt mit der pIAC-katalytischen Domäne und dem pTPRL (pIACpTPRL).

Im Vergleich der löslichen Proteinmenge zu den unlöslichen Rückständen im Pellet kann allgemein festgehalten werden, daß die Infektionsrate von 1:10³ für alle getesteten Konstrukte optimal war. Hier war die höchste Ausbeute an löslichem Protein erreicht. Bei Erhöhung der Infektionsrate trat in den meisten Fällen eine Verminderung der löslichen Proteinexpression zugunsten des unlöslich anfallenden Proteins auf. Eine Steigerung der löslichen Proteinmenge wurde durch die erhöhte Infektionsrate in keinem Fall erreicht, z.T. jedoch eine Erhöhung der exprimierten Gesamtproteinmenge.



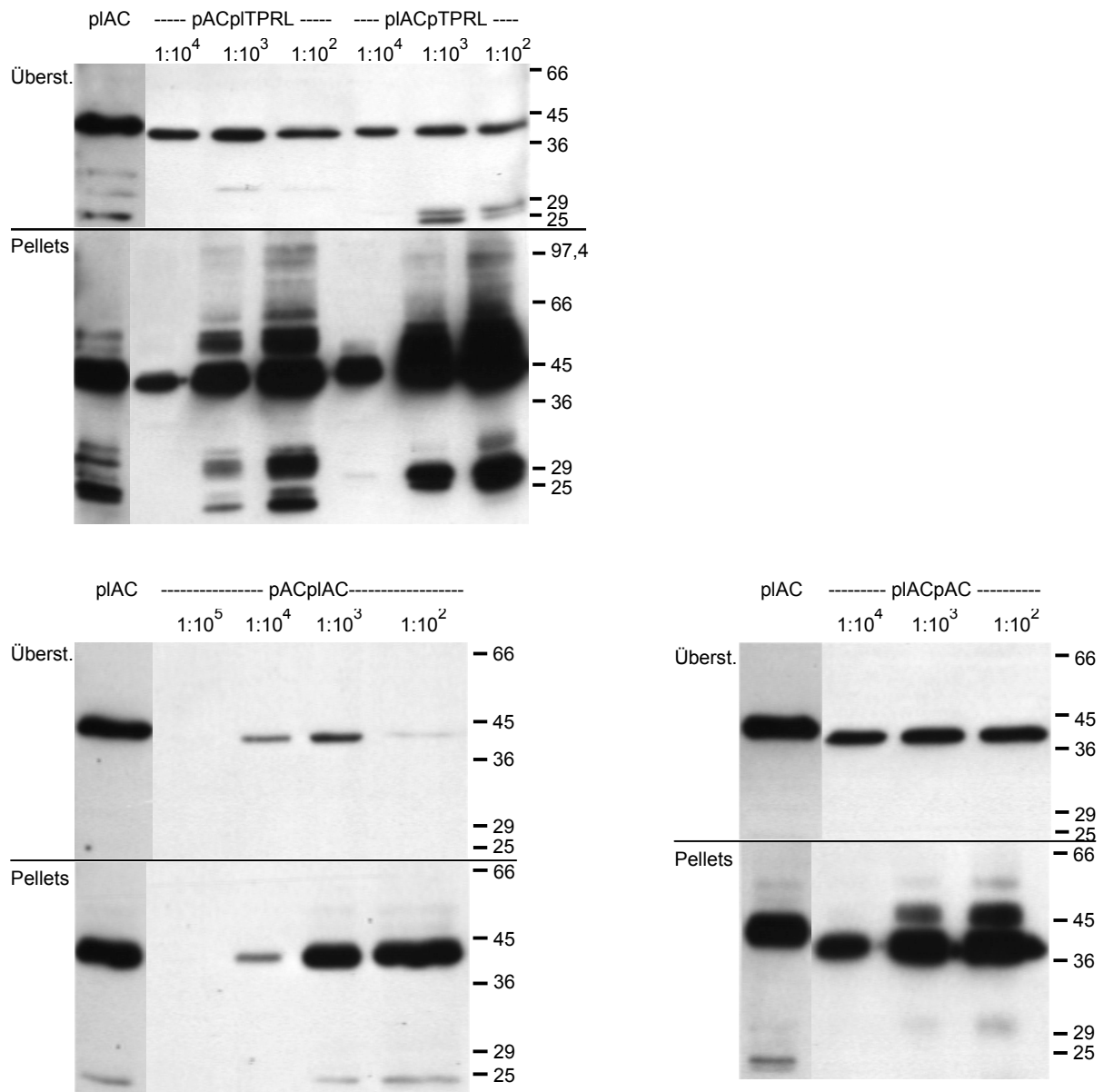


Abbildung 55: Western Blot der *Sf9*-Expression sämtlicher Konstrukte. Gezeigt sind jeweils die Überstände und die Pellets unterschiedlicher Infektionsraten jedes Konstrukts im direkten Vergleich mit pIAC (AS 526-884). *P WT*: Wildtyp-Virus Infektion, Pellet; *Ü WT*: Wildtyp-Virus Infektion, Überstand. *pIAC*: pIAC-Fragment AS 526-884 1:10⁴.

Für die AC-Tests wurden sämtliche Konstrukte mit der optimalen Infektionsrate von 1:10³ auf eine 50ml *Sf9*-Schüttelkultur transfiziert. Nach Ernte wurden die Zentrifugations-Überstände (Lysate) in den AC-Test eingesetzt. Bei erwartungsgemäß aktiver Positivkontrolle zeigte keines der anderen Expressionsprodukte katalytische Aktivität über Kontrollwert (s. *Tabelle 24*). Darüber hinaus wurden sämtliche Lysate in eine native Reinigung eingesetzt, um eine Anreicherung des löslich exprimierten Proteins zu erreichen (ca. 500µl Lysat von ursprünglich ca. 600µl). Die Analyse der Eluate mittels SDS-PAGE ergab, daß mit Ausnahme der Positivkontrolle (pIAC (526-884)) keines der Expressionsprodukte nativ reinigbar war.

Tabelle 24: Ergebnisse des Enzymtests der *Sf9*-Expression der pAC-Verkürzungen und Chimären. Jeweils die beiden übereinanderstehenden Tabellen entstammen einem Versuch. Sowohl die Expressionsrate als auch die Reinigungseffizienz der Positivkontrolle pIAC (AS 526-884) war an beiden Tagen vergleichbar (Abschätzung anhand eines SDS-PAGE-Gels). Die Proteinkonzentration im Eluat wurde anhand des Gels auf 0,01µg/µl geschätzt.

Probe (Überstand)	Aktivität [pmol/mg/min]
Kontrolle (WT)	0,1
pIAC (AS 526-884)	2,0
pAC-Frag. e+f Stopmut	0,1
pAC (AS 515-865)	0,1

Probe (Überstand)	Aktivität [pmol/mg/min]
Kontrolle (WT)	0,2
pIAC (AS 526-884)	2,2
pACpIAC	0,1
pIACpAC	0
pACpITPRL	0,3
pIACpTPRL	0

Probe (Eluat der Reinigung)	Aktivität [cpm/40µl]
Kontrolle (WT)	183
pIAC (AS 526-884)	1390*
pAC-Frag. e+f Stopmut	189
pAC (AS 515-865)	195
* entspricht 3053,17pmol/mg/min bei einer abgeschätzten Proteinkonz. von 0,01µg/µl	

Probe (Eluat der Reinigung)	Aktivität [cpm/40µl]
Kontrolle (WT)	320
pIAC (AS 526-884)	1384*
pACpIAC	77
pIACpAC	104
pACpITPRL	94
pIACpTPRL	89
* entspricht 3284,91pmol/mg/min bei einer abgeschätzten Proteinkonz. von 0,01µg/µl	

4.10 Antikörper – Gewinnung, Reinigung, Charakterisierung

Der spezifische Nachweis der pAC im Western Blot unabhängig von der Fusion an *tags* verlangte nach Antikörpern, die spezifisch gegen Bereiche der pAC gerichtet waren. Von primärer Bedeutung war die Nachweisbarkeit der AC-katalytischen Domäne. Für die Detektion der N-terminalen K⁺-Kanal-Domäne wurden die Anti-pAC-NT-Antiseren in Auftrag gegeben.

Proteinspezifische, *tag*-unabhängige Antikörper sollten auch immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation des Enzyms in Paramecium ermöglichen.

4.10.1 Antiseren für den Nachweis der katalytischen Domäne

4.10.1.1 Gewinnung der Antiseren

Für die Herstellung eines Antikörpers zum Nachweis der AC-katalytischen Domäne wurde Frag. e (AS 524-751) als **Antigen** gewählt. Der C-Terminus (Frag. f) weist im Antigenizitätsblot (*DNAstar*TM, *Protean*, Antigenizitätsindex nach Jameson-Wolf) ein hohes antigenes Potential auf. Die Überlegung, den gesamten cytosolischen Bereich inklusive C-Terminus zu verwenden, wurde verworfen, weil Frag. e (27,3kDa) nahe der optimalen Größe von 25kDa für Antigene zur Immunisierung liegt. Das Antigenexpression in *E.coli* (s. S.) führte zu einer Überexpression. Das SDS-PAGE-Gel der lysierten Zellen zeigte eine starke Produktbande (s.

Abbildung 56). Für die Proteinreinigung des Antigens unter denaturierenden Bedingungen wurden 20ml *E.coli*-Kultur mit 3ml Puffer A unter Zusatz entsprechender Mengen β -Mercaptoethanol und Tween 20 lysiert, der Überstand mit 40 μ l *Ni-NTA-Agarose* inkubiert und mit je 1ml Puffer A, B und 2x C gewaschen. Die Elution erfolgte mit 200 μ l Puffer E. Bei Vergrößerung des Ansatzes mußten die Verhältnisse von *Ni-NTA-Agarose*-Menge, Wasch- und Elutionspuffervolumen zum *E.coli*-Kulturvolumen genau eingehalten werden, um keine Reinheitsverluste zu erleiden. Die SDS-PAGE-Analyse des Durchlaufs der Reinigung zeigte, daß große Mengen Antigen nicht an das Affinitätschromatographie-Material banden, so daß der Durchlauf routinemäßig einer zweiten Reinigungsprozedur unterzogen wurde. Weitere Optimierungsversuche führten zur Erhöhung des *Ni-NTA-Agarose*-Volumens auf 550 μ l/200ml Kultur bei gleichzeitiger Erhöhung der Waschpuffervolumina auf 14ml. Die Ausbeute bei der Elution konnte durch sehr langsame Durchführung gesteigert werden (z.T. über Nacht). Darüber hinaus stellte sich ein zweiter Elutionsschritt mit dem gleichen Puffervolumen als erfolgreich (2x 2ml Elutionspuffer/200ml Kultur) heraus. Trotz dieser Bemühungen schwankten die Antigenkonzentrationen in den Eluaten zwischen 0,5 und 2mg/ml.

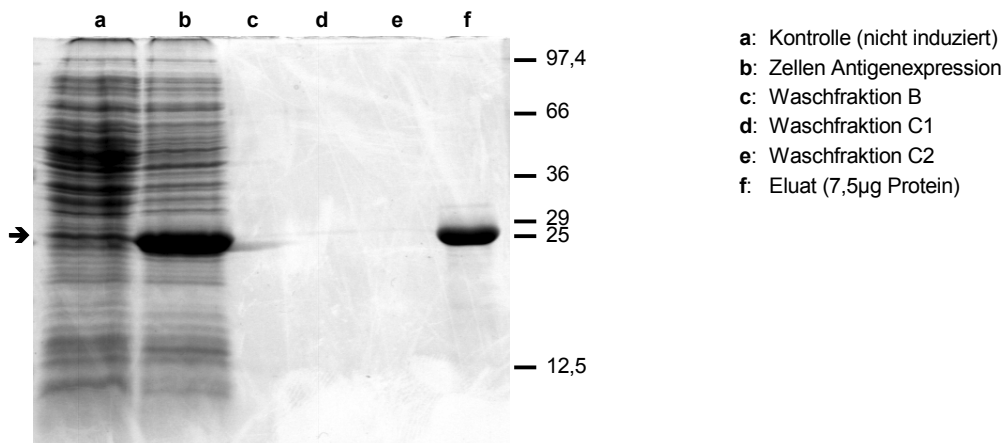


Abbildung 56: SDS-PAGE-Gel einer Antigenreinigung. Aufgetragen wurden die in Probenpuffer aufgenommene(n) (s.u.), nicht-induzierten Zellen (Kontrolle) und die Zellen der Antigenexpressions-Kultur, je 5 μ l Waschfraktion B, C1 und C2 und 5 μ l Eluat (1,5 μ g/ μ l). Für die Probenaufbereitung der *E.coli*-Zellen wurde nach Expression 1ml Kultur pelletiert und in 100 μ l Probenpuffer resuspendiert. Auf Höhe des Antigens ist in der Spur der Kontrollzellen eine leicht verstärkt erscheinende Bande erkennbar, welche als Hintergrundexpressionsprodukt gedeutet wurde.

Die **Immunisierung der Kaninchen** mit dem Antigen erfolgte im Haus (39). Es wurden zwei Tiere immunisiert. Beiden Tieren wurde vor Immunisierung eine Blutprobe als Nullkontrolle abgenommen (Präimmunseren Anti-pAC-1.0 und -2.0). Die Präimmunseren zeigten keine Reaktivität gegen das Antigen (Dot Blot mit 1 μ g Antigen). Jeweils 4 Wochen nach jeder (Auffrischungs-)Immunisierung wurde eine weitere Blutprobe genommen (Anti-pAC-1.1 und -2.1, Anti-pAC-1.2 und -2.2), die den Verlauf der Immunreaktion wiedergaben. Bei Kaninchen 1 wurde aufgrund einer ausreichend hohen Empfindlichkeit des Antiserums Anti-pAC-1.2 (abgenommen 4 Wochen nach dem ersten *Boostern*) auf das zweite *Boostern* verzichtet und das Tier ausgeblutet (Anti-pAC-1.3). Kaninchen 2 wurde ein drittes Mal Antigen injiziert (zweites *Boostern*) und vier Wochen später ausgeblutet (Antiserum Anti-pAC-2.3).

4.10.1.2 Empfindlichkeit und Spezifität der Antiseren

Die **Empfindlichkeit der Antiseren** wurde mit Hilfe von Dot Blots (s. *Abbildung 57*) getestet. Bei Kaninchen 1 konnte eine deutliche Steigerung in der Reaktivität von Antiserum-1.1 zu Antiserum-1.2 gefunden werden. In einer 1:5000-Verdünnung ist mit Antiserum-1.2 im Dot Blot der Nachweis von 0,5ng Antigen möglich. Antiserum Anti-pAC-1.3 wurde selbst nicht noch einmal auf Empfindlichkeit getestet, da es qualitativ Anti-pAC-1.2 entsprechen sollte. Die Antiseren von Kaninchen 2 sind in ihrer Signalstärke jeweils um ca. die Hälfte bis ein fünftel schwächer als die von Kaninchen 1. Auch das Antiserum Anti-pAC-2.3 erreicht nicht die Empfindlichkeit von Antiserum Anti-pAC-1.2 (entsprechend Anti-pAC-1.3). Aus diesem Grund wurden die weiteren Schritte mit dem Antiserum Anti-pAC-1.3 von Kaninchen 1 durchgeführt.

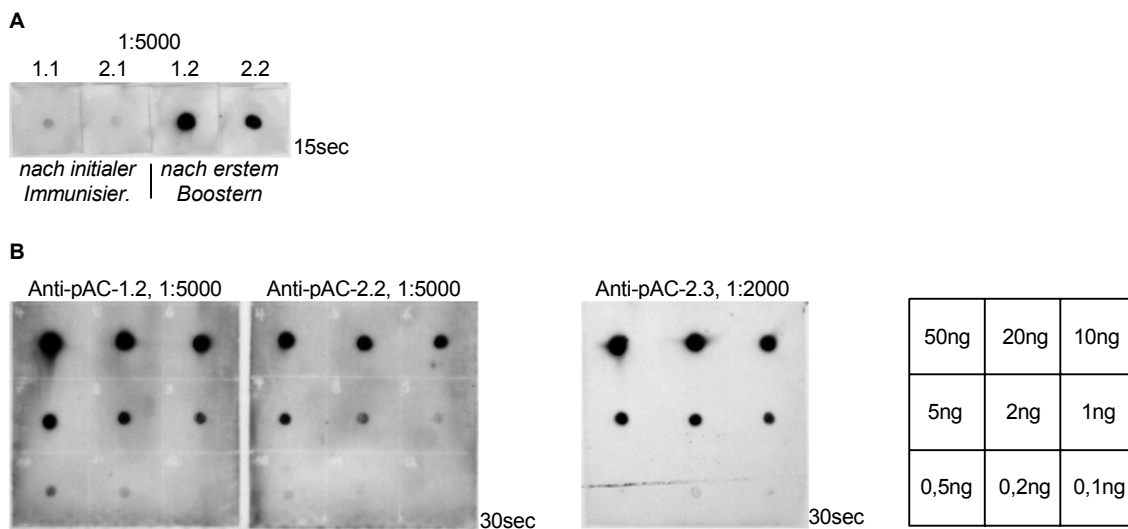


Abbildung 57: Dot Blots (*Anti-pAC-1.1*, *Anti-pAC-1.2* Antiseren von Kaninchen 1 nach der ersten Immunisierung und nach dem Boostern (*Anti-pAC-1.2* gibt die Qualität des endgültigen Antiserums *Anti-pAC-1.3* wieder); *Anti-pAC-2.1*, *Anti-pAC-2.2* und *Anti-pAC-2.3*: Antiseren von Kaninchen 2 nach der ersten Immunisierung, dem ersten und dem zweiten Boostern (*Anti-pAC-2.3* wurde durch Ausblutung von Kaninchen 2 gewonnen)) **A:** Vergleich der Antiseren von Kaninchen 1 und 2 nach der ersten Immunisierung und nach dem ersten Boostern. Alle Antiseren waren 1:5000 verdünnt. Es wurde je 1µg Antigen auf die Membran aufgetragen. **B:** Vergleich der Empfindlichkeit der Antiseren *Anti-pAC-1.2* (1:5000), *Anti-pAC-2.2* (1:5000) und *Anti-pAC-2.3* (1:2000). Es wurden absteigende Mengen Antigen auf die Membranen aufgetragen, die dem Schema rechts entnommen werden können.

Die **Spezifität des Antiserums Anti-pAC-1.3** wurde in Western Blots mit Proben drei unterschiedlicher Zellkulturen getestet (s. *Abbildung 58*).

In Probenpuffer lysierte *E.coli*-Zellen zeigten einige schwache Hintergrundbanden.

Im Western Blot mit *HEK293*-Homogenaten wurde eine Reihe *HEK293*-eigener Proteine erkannt. Die Empfindlichkeit des Antiserums ist zu gering, um die pAC-Holoenzym-Expressionsprodukte in den *HEK293*-Homogenaten nachweisen zu können, deren Expression für die *hexamyc*-fusionierten pAC-Konstrukten nachgewiesen worden ist (vgl. *Abbildung 35*). Ausnahme bildet möglicherweise die pAC vom synthetischen Gen Variante II. Ebenfalls nachweisbar waren die Konstrukte der pAC-katalytischen Schleifen im Hintergrund der Säuger-AC Typ VII (vgl. Abschn. 4.5.2). Der immunchemische Nachweis des *hexamyc*-getaggtten AC VII-pAC-Chimärs

mit dem Anti-myc-Antikörper zeigte, daß die Expressionsrate mit der der exprimierten *hexamyc-getaggen* pAC-Holoenzyme übereinstimmt (vgl. *Abbildung 35*). Daß die Chimären im Gegensatz zu den pAC-Holoenzym-Konstrukten oberhalb der Nachweisgrenze lagen, war damit zu erklären, daß die antigene Determinante (katalytischer Bereich AS 524-751) 2x pro Proteinmolekül vorkommt. Eine ausreichend hohe Spezifität zeigt das Antiserum in der Anwendung mit *Sf9-Homogenaten*⁴⁶. In den Homogenaten exprimierten pAC-Holoenzymen ist der Expressionsspiegel ausreichend für eine Detektion (Doppelbande) des pAC-Proteins mit dem Antiserum Anti-pAC-1.3. Diese Proben fanden in weiteren Tests Anwendung als „Positivproben“.

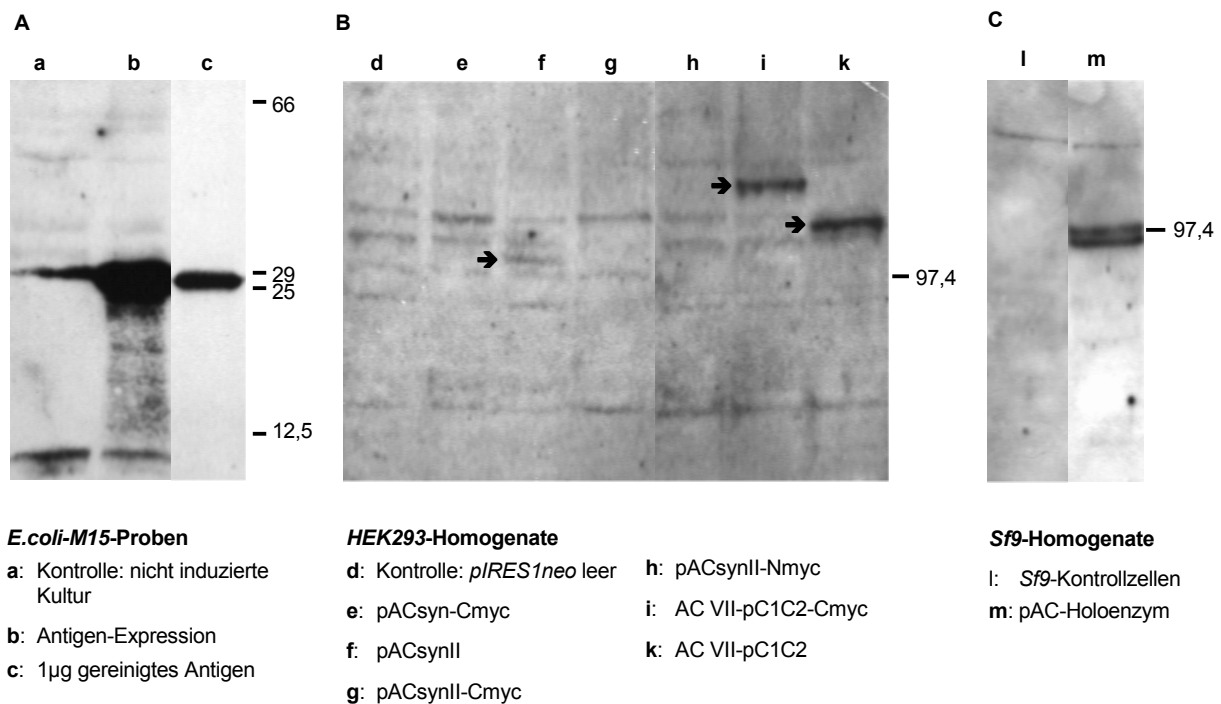


Abbildung 58: Western Blots mit Proben dreier Zellkulturen. **A:** *E.coli*-Zelllysate (a, b): Für die Probenaufbereitung wurden pelletierte Zellen in 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumens aufgenommen und je 5µl aufgetragen. Bei der Kontrolle handelt es sich um eine nicht-induzierte Kultur. Das Vorkommen der Antigenbande in der Kontrolle wurde mit Hintergrundexpression erklärt (vgl. Abschn. 4.10.1.1). Gereinigtes Antigen (c): das Antigen wurde denaturierend gereinigt; aufgetragen ist 1µg Protein. **B:** *HEK293*-Homogenate (je 40µg): Die Kontrolle (d) enthält den leeren Expressionsvektor. pAC-Holoenzym (e-h): es handelt sich um Expressionen von den beiden Varianten des synthetischen Gens (pACsyn und pACsynII), welche zum Teil zusätzlich einen N- oder C-terminalen *Hexamyc-tag* tragen. AC VII-pAC-Chimäre (i, k): der pAC-katalytische Bereich ersetzt die C_{1a}- und C_{2a}-Schleife der Säuger-AC VII (s. Kapitel 4.5). **C:** *Sf9*-Homogenate: Dieser Blot wurde von Jürgen Linder als Expressionskontrolle seiner *Sf9*-Versuche angefertigt. Als Kontrolle (l) dienen nicht infizierte *Sf9*-Zellen (17,5µg). Das pAC-Holoenzym (m) wurde vom synthetischen Gen (erste Variante) exprimiert⁴⁷ (15µg).

⁴⁶ Diese Homogenate wurden mir für die Antikörpercharakterisierung von Jürgen Linder zur Verfügung gestellt.

⁴⁷ Jürgen Linder: Die Probe des pAC-Holoenzymen entstand durch Transfektion einer *Sf9*-Kultur mit der höchsten angewendeten Viruskonzentration (1:100). Die Kontrollzellen sind nicht mit Wildtyp-Virus infiziert. Eine entsprechende Negativkontrolle ist in *Abbildung 59* gezeigt.

Wie sich später herausstellte waren diese Ergebnisse nicht auf Dauer reproduzierbar. In Western Blots, die 1 bis 2 Monate später durchgeführt wurden, konnten keine Proteinbanden mehr detektiert werden. Dies läßt eine Instabilität des Antikörpers bei Lagerung vermuten. Das Phänomen wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da letztendlich die erzielten Ergebnisse mit diesem Antiserum auch nach Reinigung (s.u.) den routinemäßigen Einsatz zur Expressionskontrolle nicht zuließen.

4.10.1.3 Reinigung des Antiserums Anti-pAC-1.3

Vorgesehen war eine chromatografische Reinigung der Antiseren an spezifischem Affinitäts-säulenmaterial. Zur Herstellung eines solchen Materials sollte das Antigen an *Affi Gel 10* (Bio-Rad) gekoppelt werden. Denaturierend gereinigtes Antigen lag gelöst in Elutionspuffer E vor, welcher aufgrund seiner Harnstoffhaltigkeit nicht für die Kopplungsreaktion geeignet war, da Aminogruppenfreie Puffer oder Lösungsmittel notwendig sind. Das Antigen wurde mittels Ethanol-fällung präzipitiert, bei RT getrocknet und in Lösungsversuche eingesetzt. Für die Antigenkopplung an 1ml Säulenmaterial sind 25mg Protein in einem Reaktionsvolumen von 0,5-4ml notwendig. In den Lösungsversuchen wurde eine Konzentration von 25mg/4ml = 6,25mg/ml angestrebt. 98µg gefälltes Antigen sollten in 15,6µl eines Lösungsmittels gelöst werden. Alle Versuche waren erfolglos (s. *Tabelle 25*). Auch der Zusatz von 6% Triton 100 und mechanische Beanspruchung (Schütteln über Nacht bei RT) vermittelten keine Lösbarkeit. Ein Verzicht auf das Trocknen des Pellets änderte die Situation nicht, ebenso die Verringerung der angestrebten Proteinkonzentration auf 3,12mg/ml. Die Lösungskontrolle erfolgte visuell, da insbesondere die Detergenzzusätze durch Micellbildung keine reproduzierbaren Proteinbestimmungen zuließen. In der folgenden Tabelle findet sich eine Zusammenstellung der eingesetzten Lösungsmittel.

Tabelle 25: Durchgeführte Lösungsversuche mit ethanolgefälltem Antigen. Keiner der Ansätze führte zum Ziel, das Pellet blieb in allen Fällen ungelöst.

Lösungsmittel	Weiterer Zusatz zum Lösungsansatz	Bemerkung
DMSO	6% Triton 100	
Formamid	6% Triton 100	
Kopplungspuffer ⁴⁸	6% Triton 100 20% DMSO	
20% DMSO / 80% Formamid	6% Triton 100	
50% DMSO / 50% Formamid	6% Triton 100	
80% DMSO / 20% Formamid	6% Triton 100	
DMSO		2x Volumen Lösungsmittel
Kopplungspuffer		2x Volumen Lösungsmittel
Formamid		2x Volumen Lösungsmittel
Formamid + 15% Tween 20		2x Volumen Lösungsmittel
Dimethylformamid		2x Volumen Lösungsmittel

⁴⁸ Dieser Hochsalzpuffer findet Verwendung für Proteinkopplungen an CNBr-aktivierte Sepharose, ein alternatives, in wässrigem Milieu sehr effizientes Verfahren zur Herstellung von Affinitätsmaterialien.

Die gescheiterten Lösungsversuche des Antigens in wässrigen und nicht-wässrigen Lösungsmitteln machten die Herstellung des Affinitätsmaterials und damit die spezifische Antikörperreinigung zur Erhöhung der Spezifität unausführbar.

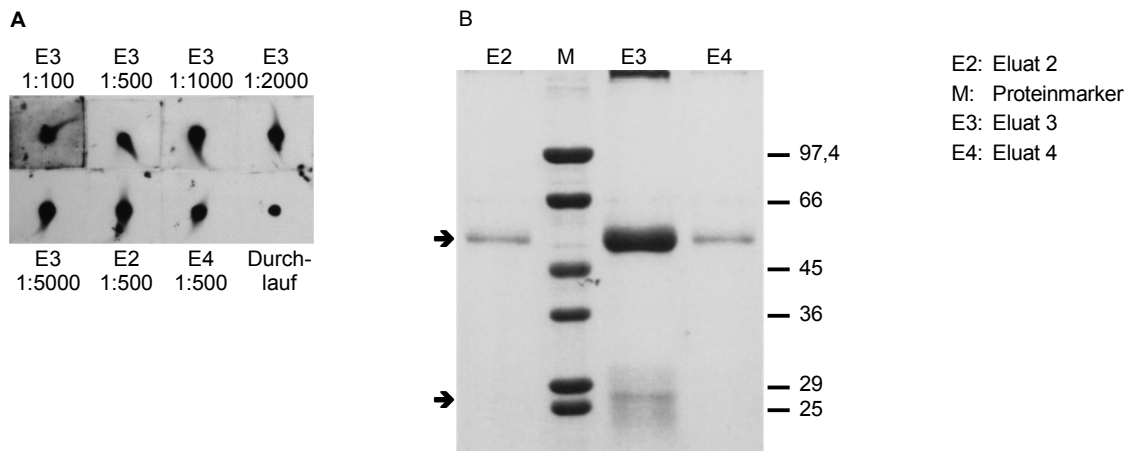


Abbildung 59: Dot Blot und SDS-PAGE-Gel der IgG-Reinigung über Protein A-Sepharose des Antiserums Anti-pAC-1.3. **A:** Dot Blot verschiedener Elutionsfraktionen. Es wurde je 1 µg Antigen auf die Membranen aufgetragen. Der Immunoblot wurde mit einer Verdünnungsreihe (1:100 bis 1:5000) der Elutionsfraktion 3, einer 1:500-Verdünnung der Fraktionen E2 und E4 und einer 1:500-Verdünnung des Durchlaufs durchgeführt. **B:** Ausschnitt des SDS-PAGE-Gels der Reinigungsfraktionen; gezeigt sind die Elutionsfraktionen E2, E3 und E4. Die schwere Kette von IgGs besitzt ein Molekulargewicht von 55kDa, die leichte von 25kDa.

Alternativ wurde eine Reinigung an *Protein A-Sepharose* (*Protein A-Sepharose™ for fast flow* von Pharmacia) durchgeführt, wodurch die IgG-Fraktion von anderen Antikörperklassen und den restlichen Serumbestandteilen abgetrennt werden konnte. Das Ergebnis wurde mittels SDS-PAGE und Dot Blot überprüft (*Abbildung 59*). Der Hauptanteil der IgG-Fraktion erscheint in Eluat 3, in Eluat 2 und 4 sind geringe Mengen vorhanden. Dies korreliert nicht mit schwächeren Signalstärken im Dot Blot.

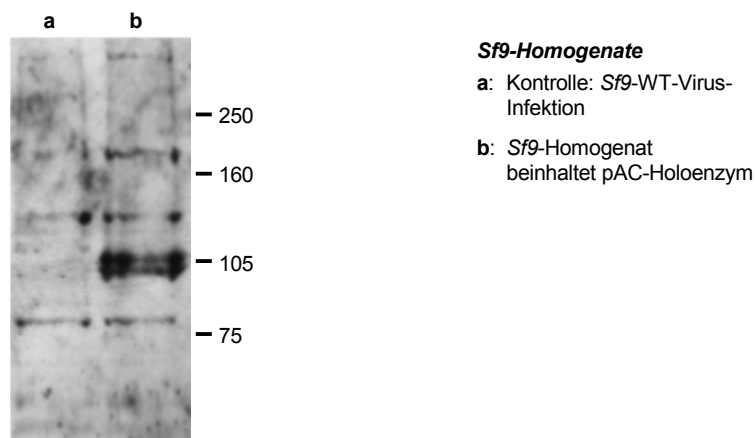


Abbildung 60: Western Blot mit der IgG-Fraktion von Anti-pAC-1.3. Als Testproben dienen Sf9-Homogenate. Kontrolle ist das Homogenat einer Wildtyp-Virus-Infektion, Positivprobe das Homogenat einer pAC-Holoenzym Expression (vgl. S. 155).

Die IgG-Fraktion von Anti-pAC-1.3 wurde in einem Western Blot (*Abbildung 60*) mit den erwähnten Proben der Zellkulturen *HEK293* und *Sf9* (s. S. 154) getestet. Eluat 3 wurde in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt. Der Nachweis des pAC-Holoenzym (pACsynII) und des AC VII-pAC-Chimärs exprimiert in *HEK293* gelang nicht mehr (nicht abgebildet), während die Doppelbande des Holoenzym aus der *Sf9*-Expression ein deutliches Signal ergab. Die Spezifität konnte in beiden Fällen nicht gesteigert werden. Die unzureichende Empfindlichkeit und Spezifität sowohl des Antiserums als auch der IgG-Fraktion von Anti-pAC-1.3 führten zur Einstellung der Arbeiten mit diesem Antikörper.

4.10.2 Antiseren für den Nachweis des N-Terminus

Die Anti-pAC-NT-Antiseren wurden von Biogenes, Berlin, hergestellt. Als Antigen wählte Jürgen Linder das Peptid EVDNQSVISEDSDNED (AS 9-24) aus dem N-terminalen, cytosolischen Bereich der pAC, welches synthetisch von der Firma Echaz microcollections, Tübingen, hergestellt wurde. Es wurden zwei Kaninchen immunisiert. Die Antiseren wurden mit Anti-pAC-NT #2573 und #2574 bezeichnet. Die Charakterisierung und Reinigung der Antikörper war Gegenstand dieser Arbeit.

4.10.2.1 Empfindlichkeit und Spezifität der Antiseren

Die Titerbestimmung der Antiseren wurde von Biogenes durchgeführt und folgendermaßen angegeben:

Anti-pAC-NT #2573	> 1:10000
Anti-pAC-NT #2574	> 1:70000

Dies bedeutet, daß 1µg Antigen mit einer 1:70000-Verdünnung von Anti-pAC-NT #2574 noch innerhalb der Nachweisgrenze liegt. Die 7x höhere Empfindlichkeit des Antiserum von Tier #2574 favorisierte die Weiterarbeit mit diesem Antiserum. Dies bestätigte sich im Western Blot:

Die Antiseren wurden in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt. Als Positivprobe wurden *Sf9*-Homogenate von Jürgen Linder verwendet, welche exprimiertes pAC-Holoenzym beinhalten. Als Negativkontrolle diente das Homogenat einer *Sf9*-Wildtyp-Virus-Infektion. Das Antiserum Anti-pAC-NT #2573 zeigte eine große Anzahl unspezifischer Banden von *Sf9*-Proteinen sowohl in der Spur der Negativkontrolle als auch in den beiden Expressionskultur-Homogenaten. Das Antiserum besaß außerdem keine ausreichende Empfindlichkeit, um die Expressionsprodukte in den *Sf9*-Homogenaten nachzuweisen. Diese geringe Empfindlichkeit, die noch unter der von Antiserum Anti-pAC-1.3 lag (vgl. *Abbildung 58*), machte das Antiserum Anti-pAC-NT #2573 unbrauchbar für Routinearbeiten. Die mit Anti-pAC-NT #2574 entwickelten Proben zeigten ebenfalls eine Anzahl von *Sf9*-Hintergrundbanden, wie in der Wildtyp-Virus-Spur erkennbar. Die Empfindlichkeit dieses Antiserums ist jedoch hoch genug, um die Holoenzym-Expressionsprodukte in beiden *Sf9*-Homogenaten als nachweisen zu können. Auf eine Überprüfung der Spezifität des Antikörpers durch *preblocking*-Versuche wurde verzichtet, da zunächst versucht werden sollte, die Anzahl der Hintergrundbanden durch eine Antikörperreinigung zu minimieren.

Der Test des Antiserums Anti-pAC-NT #2574 (1:1000) in einem Western Blot mit *HEK293*-Homogenaten⁴⁹ fiel negativ aus. Es wurde ein enormes Spektrum an *HEK293*-eigenen Proteinen erkannt (vgl. *Abbildung 61*), so daß die Spezifität des Antiserums bezüglich *HEK293* unzureichend war. Die Empfindlichkeit des Antiserums war zu gering, um das pAC-Holoenzym zu detektieren.

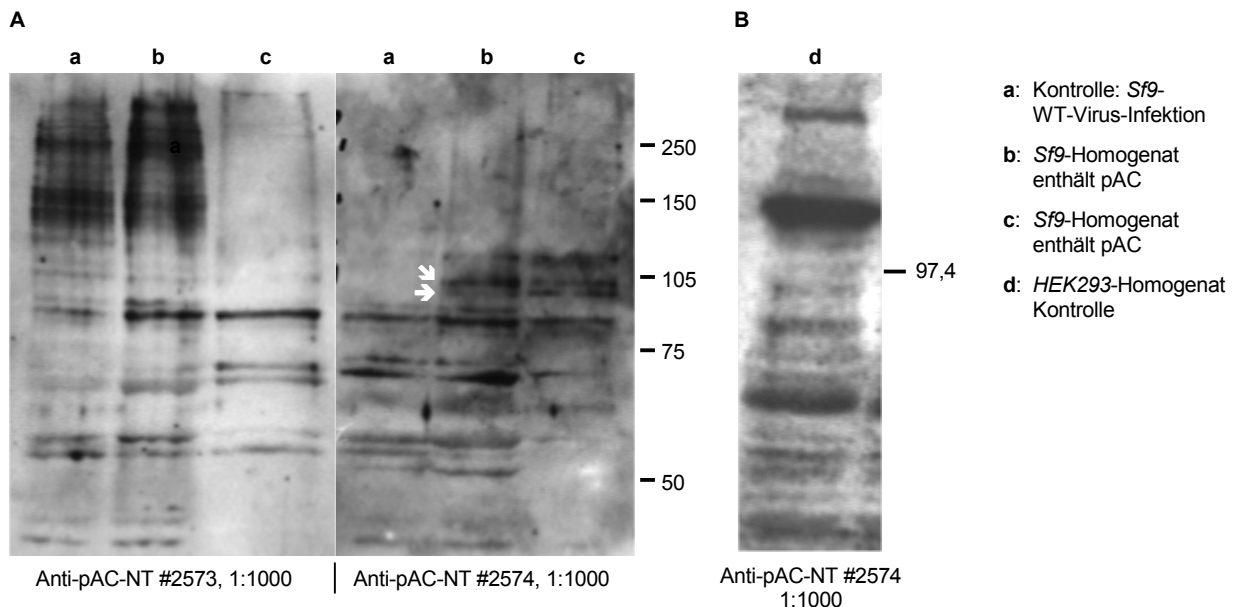


Abbildung 61: Western Blots zur Spezifitätsbestimmung der Antiseren Anti-pAC-NT #2573 und #2574. **A:** *Sf9*-Homogenate: Als Kontrolle wurde das Homogenat einer Wildtyp-Virus Infektion von *Sf9* verwendet. Positivproben sind Homogenate von *Sf9*-Kulturen, welche das pAC-Antigen exprimiert haben. Es handelt sich um verschiedene Infektionen. Die Proben wurden gemeinsam auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet, welche für die Entwicklung mit unterschiedlichen Antiseren auseinandergeschnitten wurde. **B:** *HEK293*-Homogenate: gezeigt ist lediglich die Spur der Negativkontrolle (*HEK293* transfiziert mit *pIRES1neo* Leervektor).

4.10.2.2 Affinitätsreinigung des Antiserums Anti-pAC-NT #2574

Die Affinitätsreinigung des Antiserums sollte eine Erhöhung der Spezifität durch Abtrennung von der restlichen IgG- Serumfraktion bewirken.

Die **Herstellung des spezifischen Affinitätsmaterials** durch Kopplung des Antigen-Peptids an *Affi Gel 10* bereitete Schwierigkeiten und war im Endeffekt nicht erfolgreich. Für die Kopplung an die aktivierten Ester des *Affi Gels* sind primäre Alkyl- oder Arylaminogruppen notwendig. Auch Kopplung an Mercaptogruppen kann stattfinden. Das als Antigen verwendete Peptid (s.o.) enthielt keine entsprechenden AS, so daß eine Kopplung nur über die Aminogruppe des N-Terminus stattfinden konnte. Ob eine Kopplung an die Aminogruppen der Amide Q und N stattfinden kann bzw. ob das Produkt in wässriger Lösung stabil ist, ist fraglich. Die Löslichkeit

⁴⁹ Aufgrund immunchemischer Nachweise mit dem monoklonalen anti-myc-Antikörper war bekannt, daß das C- wie N-terminal *myc-getaggte* Holoenzym in den Homogenaten exprimiert vorlag (s. *Abbildung 35*), und diese als Positivprobe eingesetzt werden konnten. Als Negativkontrolle diente das *HEK293*-Homogenat mit dem Leervektor *pIRES1neo*.

des Peptid-Antigens in DMSO ermöglichte die Durchführung der Kopplung nach dem effizienteren Verfahren in wasserfreiem Milieu (Herstellung der Säule s. Abschn. 3.4.2.2).

Die Bestimmung der Kopplungseffizienz durch Vergleich der Proteinkonzentration in der Reaktionslösung vor und nach Reaktion gestaltete sich schwierig. Die Anwendung von Routineproteinbestimmungs-Methoden wie *BioRad* (Bestimmung basischer und aromatischer AS), *Lowry* (Y, W, (C, H)) oder die direkte *photometrische Vermessung bei 280nm* (aromatische AS) waren bei dem Peptid-Antigen nicht möglich, da die diversen Verfahren auf AS-Resten beruhen, welche in der Primärsequenz des Peptids nicht vorhanden waren. Auch die semiquantitative Bestimmung über SDS-PAGE-Analyse stand nicht zur Verfügung, weil das Peptid mit 1,8kDa zu klein für die elektrophoretische Auftrennung war. Die Durchführung eines Dot Blots, die ebenfalls eine semiquantitative Bestimmung ermöglicht hätte, war bedingt durch das Lösungsmittel DMSO nicht möglich. Nitrocellulose wird durch DMSO aufgelöst, PVDF wird angegriffen und stark deformiert, was zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führt. Letztendlich wurde eine Ninhydrinreaktion angewendet, um das Ausmaß der Kopplung zu bestimmen. Von der Reaktionslösung vor Reaktion wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe (mit Wasser) hergestellt und je 1µl jeder Verdünnung in Punkten auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Von der unverdünnten Reaktionslösung wurden mehrere Punkte à 1µl aufgetragen und die Platte nach Trocknen mit 0,1% Ninhydrinreagenz besprüht und bei 100°C entwickelt (s. *Abbildung 62*).

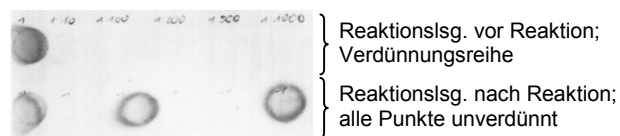


Abbildung 62: Versuch der semiquantitativen Bestimmung der Kopplungseffizienz mit Ninhydrinreagenz. In der oberen Reihe wurde von rechts nach links die Reaktionslösung vor Reaktion in den folgenden Verdünnungen aufgetragen: unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000. In der unteren Reihe wurde die Reaktionslösung 3 mal unverdünnt auf die Kieselgelplatte pipettiert.

Das Ergebnis war wenig aussagekräftig, da bereits der 1:10-Verdünnungspunkt der Ausgangslösung unterhalb der Nachweisgrenze lag. Der Fleck der Reaktionslösung wies eine etwas weniger intensive Färbung auf, als der unverdünnte Fleck der Referenzlösung vor Reaktion. Es wurde davon ausgegangen, daß eine geringe Menge Antigen gekoppelt hatte. Auch bei einer niedrigen Kopplungseffizienz sollte eine Antikörperreinigung an dem entstandenen Säulenmaterial möglich sein.

Für die **Reinigung** (s. Abschn. 3.4.2.2) wurde aufgrund der höheren Spezifität und Empfindlichkeit Anti-pAC-NT #2574 ausgewählt. Für die Überprüfung des Reinigungserfolgs wurden die Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE untersucht. In keiner Fraktion waren Proteinbanden von IgGs nachweisbar. Das Scheitern der Reinigung ließ darauf schließen, daß bei der Herstellung des Chromatographiematerials vermutlich kein Antigen gekoppelt hatte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß keines der Antiseren ausreichende Spezifität und Empfindlichkeit zeigte, um routinemäßig für den spezifischen immunchemischen Nachweis der pAC verwendet werden zu können, so daß für die Expressionskontrolle auf die Fusion der Proteine mit *Hexahis*- oder *Hexamyc*-tags zurückgegriffen werden mußte.

5 Diskussion

5.1 Homologieklonierung, Etablierung des Gens und Topologievorschläge

Die proteinchemischen Arbeiten dieses Labors mit einer AC aus *Paramecium* (12) bildeten die Grundlage für diese Arbeit. Anhand von Homologieüberlegungen konnte ein Gen aus den zur Verfügung stehenden Genbanken (cDNA und genomisch) von *Paramecium tet.* gefischt werden, welches im Aufbau der bearbeiteten AC entsprach: N-terminal befindet sich ein mutmaßlicher K⁺-Kanal, welcher gleichzeitig die Membranverankerung des Enzyms bildet. C-terminal findet man eine bakterielle Klasse III-AC, welche nach heutiger Vorstellung als Homodimer arbeitet. Für den Nachweis der enzymatischen Aktivität der AC durch heterologe Expression wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, die sowohl die Expression des Holoenzym als auch des C-terminalen, cytosolischen Teils des Proteins beinhalteten. Es wurden Versuche in *E.coli*, *HEK293*, *CHO*- und *OK*-Zellen, *Streptomyces lividans*, *RTS500* -*in vitro* Expression mit *E.coli*-Lysat und in *Sf9*-Insektenzellkultur durchgeführt. Keine der Methoden führte zum gewünschten Erfolg. Die Sequenz des gefundenen Gens wurde durch eine Genbanksuche von Jost Weber bestätigt, welcher eine zweite cDNA mit identischer Sequenz fand, welche wenige Basen *upstream* des postulierten Startcodons beginnt.

5.1.1 Homologieklonierung

Die Homologieklonierung machte sich Konsensussequenzen bekannter ACn zunutze. Aufgrund von Sequenz- und Strukturähnlichkeiten werden 4 Klassen von Adenylatcyclasen unterschieden (74):

Klasse I beinhaltet die ACn einiger gram-negativer Bakterien (Enterobakterien), deren bekanntester Vertreter die AC von *E.coli* ist. Die ACn sind Teil der Katabolitrepression in diesen Organismen. Sie besitzen C-terminal der AC-Domäne eine Regulator-domäne, welche glucosevermittelt als Inhibitor der AC-Aktivität wirkt. Die Primärstruktur der einzelnen Vertreter ist stark konserviert.

Klasse II faßt die Adenylatcyclasen der Pathogene *Bacillus anthracis* (EF), *Bordetella pertussis* (CyaA) und *Pseudomonas aeruginosa* (ExoY) (75) zusammen. Diese Adenylatcyclasen werden exportiert und wirken in eukaryotischen Wirtszellen als Toxine. Alle drei benötigen für ihre Stimulation einen eukaryotischen Faktor. Bei *B.anthraxis* und *B.pertussis* dient hierfür Calmodulin, bei *P.aeruginosa* ist der Faktor unbekannt.

Klasse III ist die größte Cyclase-Klasse. Sie umfaßt Adenylat- und Guanylatcyclasen phylogenetisch weit entfernter Arten, welche Ähnlichkeiten in ihren Cyclase-katalytischen Domänen aufweisen, in ihrem topologischen Aufbau und dem Vorhandensein weiterer Domänen jedoch stark divergent sind. Anhand der Sequenzähnlichkeiten der Cyclase-Domänen lassen sich 5 Gruppen unterscheiden (vgl. Alignment Abschn. 7.2.1): a) bakterielle, homodimere ACn vom cyanobakteriellen Typ; b) „kurze“ ACn vom *Bre.li.*-Typ (ebenfalls Homodimere); c) ACn vom Hefe-Typ (Homodimere); d) ACn vom 2x 6TM-Typ, welche Pseudoheterodimere aus ihren

cytosolischen Schleifen C₁ und C₂ bilden (Säuger: 9 Isoformen; *Dro.me*); e) Guanylatcyclasen, welche sich in den spezifitätsbestimmenden AS von den Säuger-ACn unterscheiden; GCn vom Rezeptortyp bilden Homodimere, GCn vom löslichen Typ bilden Heterodimere. Insbesondere die Gruppen homodimerer ACn umfassen topologisch unterschiedliche Proteine: integrale Membranproteine (*Dic.di.CyaG*, *Try.br.ESAG*, *Ana.sp.CyaA* (putativ), *Sti.au.CyaA* (putativ))⁵⁰, periphere Membranproteine (Hefe: *Sch.po.*, *Sac.ce.*, *Sac.kl.*)⁵¹, sowie lösliche ACn (*Rhi.me.Cya1*, *Bre.li.Cya*)⁵². Es gibt vier konservierte Aminosäuremotive (Blöcke I-IV; vgl. 7.2.1 Klasse III-Cyclase Alignment, Abbildung 66), die an der Katalyse beteiligt sind. Die Cyclasen der Klasse III funktionieren als Dimere, d.h. zwei katalytische Domänen müssen sich in antiparalleler Orientierung zusammenlagern. Mit Ausnahme der löslichen GCn und der (natürlich verknüpften) C₁- und C₂-Schleifen der 2x 6TM-ACn, welche als Heterodimere ihre katalytische Aktivität entfalten, geht man davon aus, daß Klasse III-ACn Homodimere bilden.

Klasse IV ist der Adenylatcyclase 2 aus *Aeromonas hydrophila* (76) zugeordnet worden, eine AC, welche zu keiner der bisher bekannten ACn Ähnlichkeiten aufweist.

Die AC von *Prevotella ruminicola* (77) ist mangels Ähnlichkeiten ebenfalls keiner der bisherigen Gruppen zuzuordnen.

Die Homologieklonierung konzentrierte sich neben einem Ansatz zur Suche nach Proteinen der Klasse II-ACn auf Klasse III-ACn. In den Ansätzen zu Klasse III-ACn wurden zum einen zur ParaGC nahe verwandte Cyclasen gesucht, da es naheliegend war, daß Paramecium eine AC enthält, die durch wenige Punktmutationen einen Substratspezifitätswechsel zur bekannten GC mit Mammalia-AC-Topologie erfahren hatte. Die meisten Ansätze nach Klasse III-ACn zu suchen, gingen in der Evolutions-Hypothese weiter zurück. Sie befaßten sich mit homodimeren ACn von Prokaryoten und niederen Eukaryoten, den möglichen Vorläufern der 2x 6TM-ACn der Säuger (s. S. 72). Die verschiedenen Gruppen der homodimeren Klasse III-ACn sind in ihren Konsensusmotiven untereinander so divergent, daß die Suche erst erfolgreich sein konnte, als aufgrund des Fortschritts im Malaria-Genomprojekt der nächste Nachbar der gesuchten AC besser eingegrenzt werden konnte. Im Genomprojekt zeigte sich die Verwandtschaft von Plasmodium und Paramecium bezüglich ihrer Guanylatcyclasen (s. S. 76) (1), was auch eine Verwandtschaft ihrer ACn wahrscheinlich machte. Im Plasmodium-Genomprojekt konnten AC-Konsensusfragmente mit Ähnlichkeit zu ACn vom cyanobakteriellen Typ gefunden werden (Jürgen Linder), welche die Basis für den erfolgreichen PCR-Klonierungsansatz waren.

5.1.1.1 Paramecium-GC Isoformen

Als Nebenprodukte der Homologieklonierungsversuche von Klasse III-ACn konnten PCR-Fragmente von Isoformen der bekannten Paramecium-GC gefunden werden (s. Tabelle 13), da sich die Primersequenzen häufig nahe an der GC-Sequenz orientierten.

Es wurde ein Fragment der C_{2a-like}-Schleife gefunden (G-0), welches Konsensusblock IV mit seinen Purinring-bindenden AS-Positionen beinhaltet. Diese Positionen sind entsprechend der

⁵⁰ *Dic.di.*: *Dictyostelium discoideum*; *Try.br.*: *Trypanosoma brucei*; *Ana.sp.*: *Anabaena spirulina*; *Sti.au.*: *Stigmatella aurantiaca*

⁵¹ *Sch.po.*: *Schizosaccharomyces pombe*; *Sac.ce.*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Sac.kl.*: *Saccharomyces klyuyveri*

⁵² *Rhi.me.*: *Rhizobium meliloti*; *Bre.li.*: *Brevibacterium liquefaciens*

bekanntem Paramecium-GC identisch, so daß davon ausgegangen werden kann, daß es sich hierbei um eine GC-Isoform handelt.

Es wurden 13 verschiedene Sequenzen erhalten, die der GC-C_{1a-like} Schleife entsprechen (s. *Tabelle 13*; GC-Isol. *b-h, j-m, l', d'*). Diese Sequenzen unterscheiden sich zum Teil jedoch nur in einem AS-Austausch von der bekannten ParaGC-Sequenz. Es wurde eine Auswahl „echter Isoformen“ (G-1 bis G-10a, G-10b) getroffen, die in mehr als zwei Aminosäure- oder Basenaustauschen von der ParaGC differieren (s. *Abbildung 63*). Die AS-Austausche sind größtenteils konservierten Charakters. Die Klassifizierung der Fragmente als GC-Isoformen beruht auf der hohen Ähnlichkeit zur ParaGC, da die C_{1a-like} Schleife in diesem Bereich keine Substratspezifität vermittelnden AS trägt. Eine besondere Rolle spielt Isoform G-1, welche eher als Isogen bezeichnet werden kann. Auf Proteinebene finden sich lediglich zwei AS-Austausche, während auf DNA-Ebene 32 Basen (12%) verändert sind (diese Austausche erhöhen nicht den A/T-Gehalt). Fraglich ist, ob diese Isoform mit nur 2 AS-Austauschen (bezogen auf das amplifizierte Fragment) eine eigene Funktion übernimmt.

C_{1a-like} Schleife:

paraGC	FADIAGFTEYSSKVQPEQVVMMLRNLFTEFDKNSLLHNVFKLYTIGDCYVVMGMVDYGK	913
G-1	-----EYSSSVQPEQVVMMLRNLFTEFDKNCLLHNVFKLYTIGDCYVVMGMVDYGK	51
G-2	-----EYSSRVEPEQVVMNSRNLFTEFDXICLTQNAIXLYTIGDCYVAFGIVDV--	49
G-3	-----EYSSRVPPEQVVMMLRNLFTEFDKCCQEKSVYKLYTIGDCYVVMGMLDA--	49
G-4	-----EYSSKVPPEEVLVMLKNLFVEFDRKCCCLNVYKLYTIGDCYVAIGMIDY--	49
G-7	-----EYSSKVNPEEVLVMLKNLFVEFDRKCCDLNVYKLYTIGDCYVAIGMIDY--	49
G-5	-----EYSSRVTAEQVLLMXKNLFVEFDRKCYELNVYKLYTIGDCYVAIGMIDF--	49
G-6	-----EYSSKVTPEEVLVMLKNLFVEFDRKCYELNVYKLYTIGDCYVAFGMIDY--	49
G-10a	-----KYSGSVEPEQVVMMLRILXQQFDEECQRXQVYKLYTIGDCYVCMGIIDA--	49
G-10b	-----VCMGIIDA--	8
G-9	-----KYSSSVEPETVVDMLRNLFNFDQYCQKAEIYKLFITIGDCYVCMGVLDC--	49
G-8	-----KYSSSVQPEEVSMLKNLFDEFDTLTQVNNVFKLYTIGDCYVVGIVTDN--	49
paraGC	GIQRNPSQEAVNVVRMGFAMIDAIRRVRAHINHPTLDMRIGVHTGSIIGGVLGTELVRV	972
G-1	GIQRNPSQEAVNVVRMGFAMIDAIRRVRAHINHPTLDM	89
G-2	-TQRNPAQEAKNVVELGFKMIDIIRQVRSIIIGFDGLDR	86
G-3	-KDRNIAQEAKNTVELGFEMINIIKRVRDHINFQGLDMRIGIHTGSIIGGVLGTEIVRY	107
G-4	-NNRNPHQEAKNIVDLAFEMIKIITQVRKQINFQGLNMRIGIHTGSVFGGIMGTDIVRY	107
G-7	-HNRNPQEAKNIDLAFAEMIKIITQVRKQINFQGLNMRIGVHTGPFVFGGVMGTDIVRY	107
G-5	-NDRNPTEAKNIVDLAFEMIRIIEIVRKQIDFDGLDMRIGIHTGCVFGGVMGTEIVRY	107
G-6	-NERNPTEAKNIVDLAFEMIRIIEVVRKQINFQGLDM	86
G-10a	-NNRDPVGEAINVVLFGFKMIQIIQQINKDPQYQHLNM	86
G-10b	-NNRDPVGEAINVVLFGFKMIQIIQQINKDPQYQHLNMRIGAHTGRVIGGVVGTDVVRY	66
G-9	-KKRDPAGEAQVLAFFGFSMIEIINHYKKDPQYQHLNMRIGVHTGRVVGGVVGTDVVRY	107
G-8	-FKRDPIQEALNVVEMSLNMLEAITRVRNQIKYQDLHM	86

C_{2a-like} Schleife:

paraGC	KTYMAAAGLKIHVSKS-NPVNKVISLALDMKRYVMSN-----ETFQIKIGIHYGNVIA	361
G-0	AGLKNIVSQNSANPVLRAIQVAFEMRKFASQQDFCGSGEIIIVKIGVHYGNVIA	59
paraGC	GVIGHHKPQFSLIGDTINTASRICSTAES	390
G-0	GVIGYHKPQFSLIGDTVNTTSRV	88

Abbildung 63: Alignment der mutmaßlichen Paramecium-GC-Isoformen. Ausgetauschte AS sind grau hinterlegt, ohne die Konservativität der Austausche zu berücksichtigen. Im Alignment der C_{2a-like} Schleife sind die AS, welche an der Guaninring-Bindung beteiligt sind, unterstrichen.

5.1.1.2 Sonstige Nebenprodukte

Bei den PCR-Ansätzen der Homologieklonierung wurden neben GC-Isoformen die in *Tabelle 12* aufgelisteten Sequenzen gefunden, welche in einem ihrer Leserahmen signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen besitzen. Die hohe Ähnlichkeit der putativen Proteinkinasen von *Paramecium tet.* zu *Plasmodium falciparum* unterstreicht die Verwandtschaft dieser beiden Organismen (vgl. S. 76).

5.1.2 Analyse des gefundenen Proteins

5.1.2.1 Ionenpore

Der mutmaßliche K^+ -Kanal wurde durch seine Ähnlichkeit zu spannungs-gesteuerten K_v -Kanälen identifiziert. In der ersten Hälfte bis TM4 ist der Aufbau dieser Kanäle in der pAC-Kanaldomäne konserviert. Im Bereich von TM2 bis zum Spannungssensor (TM4) sind in der Primärstruktur Ähnlichkeiten von 60% zu $K_v1.1$ (Maus) vorhanden (vgl. *Abbildung 17*). Im Alignment über die gesamte pAC-Ionentransport-Domäne mit ähnlichen K^+ -Kanälen (vgl. 7.2.3 *K⁺-Kanal Alignment*), wird deutlich, daß sich die Konservierung in der AS-Sequenz auch auf die TM-Bereiche 1 und 5, in etwas geringerem Ausmaß auch auf TM6 erstreckt. Nicht konserviert sind im vorderen Kanal-Teil bis TM4 der N-Terminus und die lange cytosolische Schleife zwischen TM4 und TM5 der pAC. Der stark konservierte N-Terminus spannungsgesteuerter K_v -Kanäle (ca. 130AS direkt vor TM1) wird als T1-Domäne bezeichnet. Sie hängt gondelartig unterhalb des Kanals, tetramersiert für die Ausbildung intakter Ionenkanäle (78) und beinhaltet eventuell eine Bindestelle für β -Untereinheiten. Im pAC-Protein sind keine homologen Bereiche zu dieser Domäne vorhanden. Sterisch gesehen dürfte die lange cytosolische Schleife zwischen TM4/TM5 einen großen Raumbedarf unterhalb des Kanals besitzen.

Im zweiten Teil des Kanals ab TM5, welcher die eigentliche Ionenpore bildet, findet man einen völlig neuen Aufbau. Klassischerweise besteht der *Pore-Loop* aus einer α -Helix, die bis in die Mitte der Membran eintaucht, anschließend folgt ein *turn* und der *Loop* verläßt die Membran durch die Mitte des Kanals wieder. Auf diesem *Loop*, der die Mitte und hier die engste Stelle des Kanals bildet, liegt die Signatursequenz (Selektivitätsfilter), welche alle K^+ -Kanäle besitzen: (T/S)XXTXG(Y/F)G. G(Y/F)G sind für die K^+ -Selektivität unabdingbar, wobei es die Hauptketten-Carbonylgruppen sind, welche mit den dehydratisierten K^+ -Ionen in Wechselwirkung treten. Die Seitenketten zeigen in Richtung der *Pore*-Helix, und es sind wahrscheinlich aromatische Wechselwirkungen zwischen den zwei konservierten W der Helix (s. *Abbildung 64*) und der aromatischen AS des Selektivitätsfilters, welche die perfekte Öffnungsweite des Kanals und dadurch die K^+ -Selektivität bestimmen (79). Die große, extrazelluläre Proteinschleife zwischen TM5 und TM6 des pAC-Proteins trägt keinen hydrophoben Bereich, der eine Signatursequenz beinhaltet und einen *Pore-Loop* ausbilden könnte. Der von *TopPred2* als sicher membran-spannend aufgeführte Proteinabschnitt AS 498-518 *downstream* TM6 hingegen beinhaltet das Konsensusmotiv GFG. Die restlichen AS der Signatursequenz sind verändert (s. *Abbildung 64*): Position 1 und 4, welche gewöhnlich stark konserviert durch T eingenommen werden, sind nicht-konservativ gegen A ausgetauscht. Positionen 2, 3 und 5 werden durch L eingenommen, was teils konservativen, teils nicht-konservativen Austausch entspricht. Mutationsanalysen von Heginbotham *et. al.* (80) am *Shaker*-Kanal (ein K_v -Kanal aus *Drosophila melanogaster*) ergaben, daß an den Positionen 2, 3 und 4 einige konservative und auch nicht-konservative Austausche ohne Verlust der K^+ -Selektivität möglich sind. Position 5 erwies sich als empfindli-

cher bezüglich Mutationen, jedoch war der konservative Austausch zu L (V5L) ohne Selektivitätsverlust möglich. Der Austausch T1A führte bei *Shaker* zu nicht-aktiven Kanälen. An dieser Position scheint eine Hydroxyl-Funktion notwendig (T1S: K⁺-Selektivität bleibt erhalten). Diese Daten zeigen, daß eine gewisse Variabilität in den Positionen 1-5 ohne Verlust der selektiven K⁺-Leitfähigkeit möglich ist und es sich trotz eines A an Position 1 bei der 8AS-Sequenz ALLALGFG der pAC durchaus um einen Selektivitätsfilter eines *Pore-Loops* handeln kann. Dies wurde durch bioinformatische Untersuchungen des K⁺-Kanalspezialisten Robert Guy (81) bestätigt. Die Funktionalität dieser Sequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft. Ein erwägenswertes Experiment wäre, die Signatursequenz/den *Pore-Loop* eines aktiv exprimierbaren K⁺-Kanals gegen die Signatursequenz/den *Pore-Loop* dieses vermeintlichen K⁺-Kanals auszutauschen.

	— Pore-Helix —	
shaker Drome	: SIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMTPVG-----	: 452
K _v 1.1 hum	: SIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMYPVT-----	: 382
K _v 2.1 hum	: SIPASFWWATIIMTTVGYGDIYPKT-----	: 383
K _v 3.1 hum	: NIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPQT-----	: 410
K _v 4.1 hum	: NIPAAFWYTIIVTMTTLGYGDMVPST-----	: 382
mSlo mouse	: TYWECVYLLMVTMSTVGYGDVYAKT-----	: 324
AKT1 Arath	: RYVTSMYWSITTLTTVGYGDLHPVN-----	: 263
KAT1 Arath	: RYVTALYWSITTLTTLTYGYGDFHAEN-----	: 270
ParaKCh	: QYLHSLYWSIITMTTIIGYGDITPQN-----	: 351
eag Drome	: MYVTALYFTMTCMTSVGFGNVAAET-----	: 463
HERG hum	: KYVTALYFTFSSLTSVGFNVSPNT-----	: 634
K _v 3.1 GIRK hum	: NFPSAFLFFIETEATIGYGYRYITD-----	: 153
K _v 1.1 IRK1 rat	: GMTSAFLFSLETQVTIIGYGRFVTE-----	: 151
pAC	: TQIENAIIKIGALLALGFGDAGSAIIGTNM	: 518
Signatur-Pos.	: 12345678	

Abbildung 64: Alignment der *Pore-Loops* verschiedener K⁺-Kanäle. Die *Pore-Region* der pAC ist unterstrichen. K_v-Kanäle: *shaker Drome*: spannungs-gesteuertes K⁺-Kanal-Protein aus *Drosophila melanogaster* (CIKS)(P08510); *K_v1.1 hum*: spannungs-gesteuerter K⁺-Kanal (CIK1) *Homo sapiens* (Q09470); *K_v2.1 hum*: spannungs-gesteuerter K⁺-Kanal (CIKA) *Homo sapiens* (Q14721); *K_v3.1 hum*: spannungs-gesteuerter K⁺-Kanal (CIKD) *Homo sapiens* (P48547); *K_v4.1 hum*: shal-typ K⁺-Kanal (KCND1) *Homo sapiens* (BAA96454); *mSlo mouse*: Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanal *Mus musculus* (A48206); *AKT1 Arath*: K⁺-Kanal-Protein AKT1 *Arabidopsis thaliana* (S62694); *KAT1 Arath*: K⁺-Kanal-Protein KAT1 *Arabidopsis thaliana* (S32816); *ParaKCh*: *Paramecium tetraurelia* K⁺-Kanal (PaK2) Gen (U19908); *eag Drome*: ether-a-go-go K⁺-Kanal-Protein (CIKE) *Drosophila melanogaster* (Q02280); *HERG hum*: spannungsgesteuerter K⁺-Kanal, ether-a-go-go-verwandt *Homo sapiens* (Q12809). K_{ir}-Kanäle: *Kir3.1 GIRK hum*: G protein-aktivierter *inward rectifier* K⁺-Kanal1 (GIRK1)(IRK3) *Homo sapiens* (P48549); *Kir1.1 IRK1 rat*: ATP-sensitiver *inward rectifier* K⁺-Kanal1 (ROM-K) *Rattus norvegicus* (P35560); *Signatur-Pos.*: AS-Positionen der K⁺-Kanal-Signatursequenz.

Zieht man die gesamte hydrophobe, mutmaßliche *Pore-Region* von pAC in Betracht (IGALLALGFGDAGSAIIGTNM), fällt auf, daß sie mit der Signatursequenz beginnt, d.h. *up-stream* keine *Pore-Helix* ausgebildet werden kann. *Downstream* stünden AS hierfür zur Verfügung. Darüber hinaus fehlen in der *Pore-Region* der pAC die zwei konservierten aromatischen AS der *Pore-Helix*. Hier muß also ein anderer Mechanismus für die definierte Öffnungsweite des Kanals existieren. Beides ist nicht abwegig, berücksichtigt man, daß die *Pore-Region* der

pAC einen vollkommen anderen Aufbau besitzen muß. Im Gegensatz zur klassischen Bauweise, wo der *Pore-Loop* in der extrazellulären Membranhälfte angeordnet ist, muß die pAC-*Pore*-Region von intrazellulärer Seite eine Halb-TM bilden, da sie sich *downstream* der TM6 befindet. Bei ansonsten gleichem Aufbau der eigentlichen Pore würden sich vier TM6 zu einer Indinerzelt-Struktur mit dem weiten Ende nach innen zusammenlagern und der Selektivitätsfilter, aufgebaut aus den *Pore-Loops* der Kanaluntereinheiten, auf der Membraninnenseite zu liegen kommen. Die Dehydratisierung der K⁺-Ionen müßte direkt bei Eintritt in die Membranpore stattfinden. Nach dem klassischen Aufbau diffundieren K⁺-Ionen hydratisiert in eine wäßrige Höhle in der Membran ein und durchlaufen erst in der äußeren Membranhälfte den engen Selektivitätsfilter, der zur Ablage der Hydrathülle zwingt (79).

Bei der pAC-Ionenkanal-Domäne handelt es sich also um einen K⁺-Kanal dessen erste Hälfte entsprechend spannungs-gesteuerter K⁺-Kanäle konserviert ist, dessen *Pore*-bildende Einheit (TM5, TM6 und *Pore-Loop*) jedoch eine vollkommen andere Topologie aufweist. Denkbar ist auch, daß die Degeneration im hinteren, gewöhnlich die Ionenpore formenden Kanalabschnitt (TM5, TM6 und *Pore-Loop*) zu einem nicht mehr funktionsfähigen K⁺-Kanal geführt hat, dessen intakter, vorderer Teil mit dem Spannungssensor (TM4), eine spannungssensitive Membranverankerung darstellt, welche bei Spannungsänderungen und daraus resultierenden Konformationsänderungen im Proteinmolekül regulatorische Auswirkungen auf die AC-Aktivität besitzt, ohne daß intrinsische Ionenströme auftreten.

Der kurze Linker zwischen der AC-katalytischen Domäne und dem vermutlichen *Pore-Loop* läßt eine gegenseitige regulatorische Einflußnahme wahrscheinlich erscheinen. Eine Auswärtsbewegung des Spannungssensorelements TM4, wie sie bei Depolarisation der Zelle stattfinden soll (52), muß auf eine noch unbekannte Weise mit der *Pore*-Region koppeln, um zu einem *gating* des Ionenstroms zu führen. Eine Konformationsänderung im *Pore*-Bereich kann möglicherweise leicht über die kurzen Linker auf die katalytische Domäne übertragen werden und durch deren Lageveränderung eine Aktivierung bewirken. Die Tatsache, daß der Linker nicht die bei vielen Klasse III-ACn konservierte Region *upstream* der katalytischen Domäne besitzt (vgl. 7.2.1 Klasse III-Cyclase Alignment; vgl. Abbildung 37), unterstützt die Idee, daß er möglicherweise eine besondere Rolle übernimmt. Jost Weber klonierte neben der entsprechenden AC aus *Plasmodium falciparum* eine entsprechende AC aus *Tetrahymena pyriformis*. Im Linkerbereich der drei Vertreter besteht eine Konservierung in einigen hydrophoben AS (Abbildung 65).

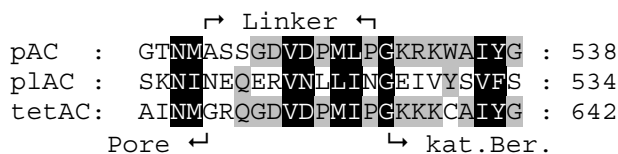


Abbildung 65: Alignment des Linkerbereichs zwischen *Pore-Loop* und AC-katalytischer Domäne. pAC: in dieser Arbeit beschriebene AC; plAC: pAC entsprechende AC aus *Plasmodium falciparum* (73); tetAC: pAC entsprechende AC aus *Tetrahymena pyriformis* (73).

Nicht in Einklang zu bringen ist eine Aktivierung der AC durch erhöhte K⁺-Konzentrationen, wie sie für die ciliäre Paramecium-AC beschrieben wird (8). Bei geöffnetem Kanal findet ein K⁺-

Ausstrom in Richtung des chemischen Gradienten statt, welcher zu einer lokalen K^+ -Erniedrigung und damit einer gewissen Hemmung der AC-Aktivität führen würde.

Im Hinblick auf die elektrophysiologischen Daten, welche *Schultz et al.* (12) durch Rekonstitution der ciliären Paramecium-AC in künstlichen Lipiddoppelschichten erhalten hatten, war es überraschend, einen Spannungssensor zu finden. In den benannten *in vitro* Versuchen konnte keine spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit gefunden werden. Dies rückt einen anderen Aspekt ins Licht, welcher bis dato nicht berücksichtigt wurde. Das S4-Segment wird auch bei K^+ -Kanälen gefunden, welche kein oder nur geringes spannungsabhängiges *gating* zeigen (52), jedoch wurden in den Proteinanalysen keine Bindungsstellen gefunden, die auf eine andere Steuerung hinweisen wie z.B. cyclische Nukleotide oder Ca^{2+} .

5.1.2.2 AC-katalytische Domäne

Nach einem kurzen Linker von nur 11AS (AS 519-529) schließt sich an den mutmaßlichen *Pore-Loop* die Klasse III-AC-Domäne an. Die pAC-katalytische Domäne ist ähnlich zu den cyanobakteriellen, homodimeren ACn. Diese Gruppe beinhaltet neben den bakteriellen ACn (*Anabaena sp.*, *Anabaena cy.*, *Stigmatella au.*, *Sinorhizobium me.* (= *Rhizobium me.*), u.a.) auch ACn niederer Eukaryoten (*Dictyostelium di.*) und die 1999 erstmals beschriebene lösliche Säuger-AC (sAC) aus Rattenhoden (82), deren zwei mutmaßliche katalytische Bereiche (C_1 und C_2) starke Ähnlichkeit zu verschiedenen ACn dieser Gruppe aufweisen. Die Existenz zweier katalytischer Zentren, welche vermuten läßt, daß die aktive Form Heterodimere bildet, verleiht dieser AC eine Exotenrolle in dieser Gruppe und bleibt deshalb im Folgenden außer Betracht. Im aktuell wiederholten *blastp-search* (vgl. *Abbildung 12*) wurden neben der bekannten *RhimeCya1* sieben weitere mutmaßliche ACn dieses Bakteriums gefunden, welche durch das *Sinorhizobium meliloti*-Genomprojekt entdeckt wurden.

Die Kristallstrukturen der Säuger-AC katalytischen Schleifen ((15): Struktur von IIC₂/IIC₂⁵³ und (14): Struktur von VC₁/IIC₂⁵⁴) ermöglichten die Bestimmung der AS des katalytischen Zentrums (s. *Abbildung 66*) (für *reviews* siehe (16, 83)). Zwei katalytische Schleifen lagern sich antiparallel zu einem Pseudoheterodimer (Säuger-ACn) zusammen, so daß sich an den Enden an der Schnittstelle zwischen beiden Monomeren Substrattaschen ausbilden, wobei bei Säuger-ACn nur eine katalytisch aktiv ist, während die achsensymmetrischen homodimeren ACn zwei katalytisch aktive Taschen besitzen. Dies wurde an *Rv1625c* aus *Mycobacterium tuberculosis* („MycoAC“) durch Mutationsanalysen bestätigt (68).

Die AS des katalytischen Zentrums rekrutieren sich aus beiden Schleifen. D310 (C_{1a}) und D354 (C_{1a}) (die Numerierung bezieht sich auf AC I⁵⁵) sind für die Mg^{2+} -Bindung verantwortlich, welche die Phosphatreste koordinieren. In den oben erwähnten Kristallstrukturen war nur ein Mg^{2+} zu erkennen. Tesmer *et al.* konnten, wie aufgrund kinetischer Daten und der Verwandtschaft in der katalysierten biochemischen Reaktion zur DNA-Polymerase I erwartet, die Bindung zweier Metallionen im katalytischen Zentrum zeigen, welche vermutlich beide an der Katalyse beteiligt sind (84). R398 (C_1) und K1049 (C_2) binden den γ -Phosphatrest. N1007 (C_2), dessen Funktion bisher unterschiedlich diskutiert wurde, soll in Wechselwirkung mit O4' der

⁵³ Säuger-AC Typ II C_1 und C_2

⁵⁴ Säuger-AC Typ V C_1 und Säuger-AC Typ II C_2

⁵⁵ Säuger-AC Typ I aus Rind

Ribose treten (84). R1011 (C₂) tritt mit der α -Phosphatgruppe in Wechselwirkung und soll als positiv geladene AS den Übergangszustand (nukleophiler Angriff der deprotonierten 3'-OH-Gruppe auf das α -Phosphoratom) bzw. die abgehende Gruppe (PP_i) stabilisieren. R398 (C₁) ist bei pAC und den meisten bakteriellen ACn⁵⁶ durch G (pAC: G657) ersetzt. Entweder reicht hier die Ausrichtung und Bindung des γ -Phosphatrests durch Mg²⁺ und K (pAC: K580) aus, oder es befindet sich in der durch das kleinere G gebildeten Lücke der AS-Rest einer anderen Position, der als H-Brücken-Donator für die Phosphat-Sauerstoffatome dienen kann. Die restlichen mit den Mg²⁺-Ionen und der Phosphatgruppen in Kontakt tretenden AS sind bei pAC und den bakteriellen ACn erwartungsgemäß konserviert, denn sie besitzen katalytische Relevanz. Die Bindung des Adeninrings erfolgt über die AS K923 (C₂) und QxDIW (998-1002) (C₂), wobei K923 und D1000 in Wechselwirkung mit N1 bzw. N6 treten, Q998 die Orientierung des K-Rests unterstützt und I1001 und W1002 eine hydrophobe Tasche bilden (AS-Reste beiderseits des aromatischen Purinringes angeordnet). Bei GCn sind K923 und D1000 gegen E und C (S) ersetzt. C kann mit O6 H-Brücken bilden und E mit N1 und N2 in Wechselwirkung treten. An die Stelle von Q tritt R, an die Stelle von I und W treten L und F (zusammenfassend: E und RxCLF). R geht hier möglicherweise nicht nur Wechselwirkungen mit E ein, sondern wasser- vermittelt auch mit O6 (18). In der katalytischen Domäne der pAC und den homologen cyanobakteriellen ACn sind in diesem Bereich viele der konservierten AS ausgetauscht. K923 bleibt erhalten, QxDIW wird jedoch ersetzt durch (E/D)x(T/S)(A/V/Y)(I/L) (die häufiger vorkommende AS ist unterstrichen, die pAC-AS sind fett gedruckt). Der Austausch des H-Brücken-Akzeptors D1000 zu den Hydroxyl-Gruppen haltigen AS S bzw. T (pAC: S679) (H-Brücken-Donatoren oder -Akzeptoren, je nach Orientierung) erinnert an GCn (C als H-Brücken-Donator für O6; bei ParaGC S). Für eine Adeninbindung muß S/T als H-Brücken-Akzeptor fungieren. Der H-Brücken-Donator K923 für die Wechselwirkung mit N1 bleibt jedoch vorhanden (pAC: K580), im Gegensatz zu GCn, welche hier ein E tragen für die Wechselwirkung mit der im Adeninring nicht vorhandenen NH₂-Gruppe an C2 (und Wechselwirkungen mit N1). Dies verbunden mit der Tatsache, daß von bakteriellen ACn bekannt war, daß sie als ACn funktionieren, führte zu der Annahme, daß es sich um eine Cyclase mit AC-Spezifität handelt. Später wurde diese Annahme durch experimentelle Daten zusätzlich unterstützt:

Experimente von Tobias Kanacher bestätigten für die AnaCyaB1 die ATP-Substratspezifität. Cyclase-Tests mit GTP erbrachten blank-Werte.

Jost Weber konnte durch heterologe Expression eines zur pAC ähnlichen Proteins aus Plasmodium falciparum (pIAC) zeigen, daß dieses ausschließlich AC-Spezifität besitzt.

⁵⁶ ACn, welche anstelle des Adeninringkoordinierenden D (Wechselwirkung mit N6) ein T tragen.

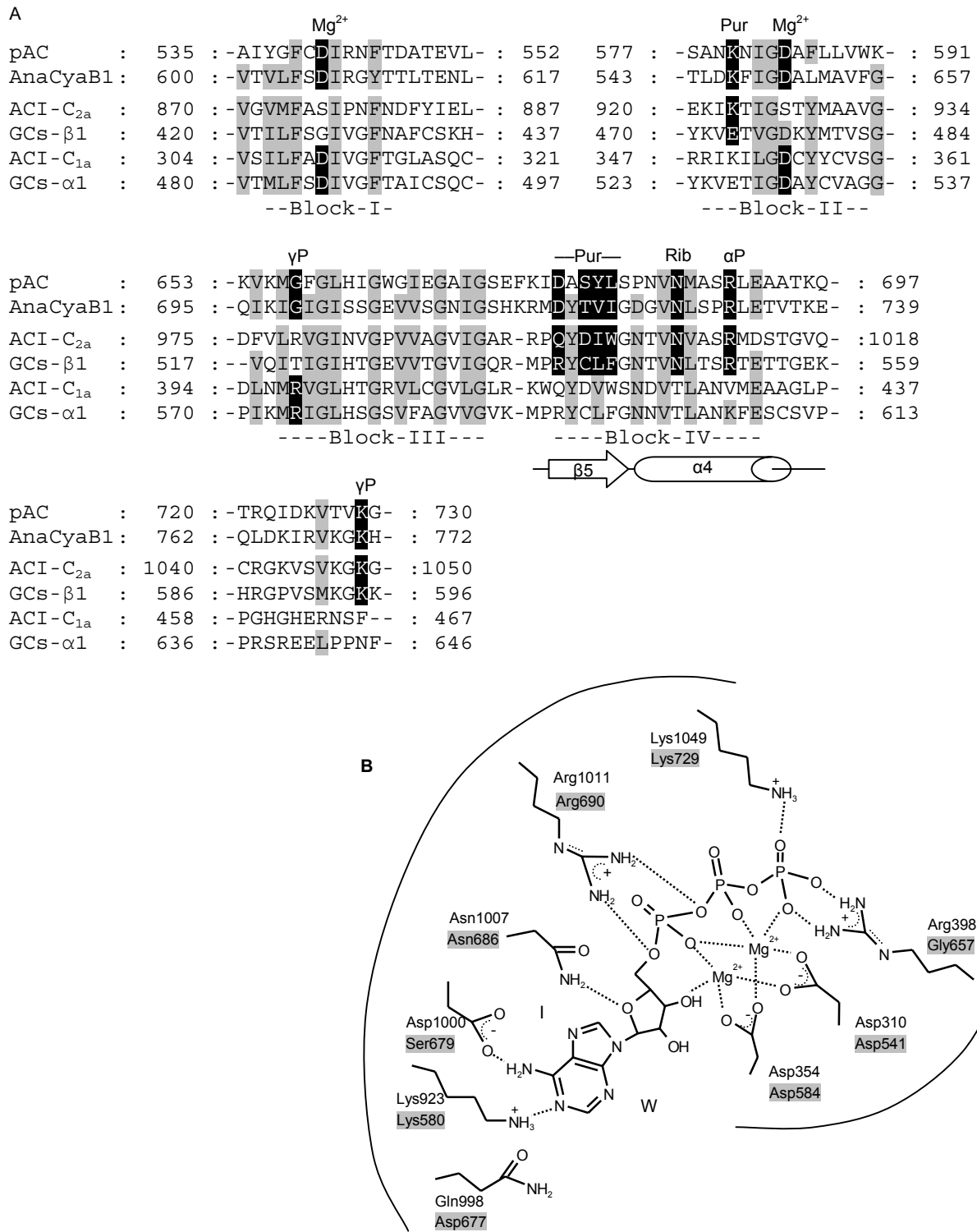


Abbildung 66: **A:** Alignment von pAC und AnaCyaB1 mit der Säuger-AC Typ I (P19754) C_{1a} und C_{2a} und den heteromeren, löslichen Säuger-GCn GCs-α1 (Q02108) und GCs-β1 (Q02153). Gezeigt sind 4 Ausschnitte der katalytischen Domäne im Bereich der Konsensusblöcke I-IV und des Endes der Schleifen. Zu ≥ 80% konservierte Positionen sind hellgrau hinterlegt. Für die Substratbindung und die Katalyse wichtige AS sind schwarz markiert. Für den Konsensusblock IV ist die Sekundärstruktur angegeben. **B:** Schematische Darstellung der Substratbindung in der katalytischen Tasche. Die Numerierung entspricht Säuger-AC I (Rind). Grau hinterlegt sind die entsprechenden pAC-Aminosäuren.

Eine mögliche Erklärung für die Austauschbarkeit des in anderen Klasse III-ACn hochkonservierten D1000 zu S/T (pAC: S679) ohne Verlust der AC-Spezifität, könnte in der Tatsache verborgen sein, daß die Gruppe der cyanobakteriellen ACn in diesem Bereich eine AS länger sind als die Säuger-ACn (s. *Abbildung 66, 7.2.1 Klasse III-Cyclase Alignment*) und anstelle des konservierten Q998 saure AS tragen. Legt man die Kristallstruktur der Säuger-ACn zugrunde, liegen die zu QxDIW positionentsprechende AS (pAC: DxSYL 677-681) auf einer gemeinsamen β -Faltblattstruktur ($\beta 5$). Eine Verlängerung 3 AS *upstream* dieser Sequenz um eine AS sollte also eine räumliche Verschiebung der entscheidenden AS-Reste in der Purinbindenden Tasche zur Folge haben, sofern die zusätzliche AS nicht von dem wenig *upstream* liegenden *Loop* geschluckt wird. Es drängt sich die Hypothese auf, durch diese Verschiebung könnte die saure AS D/E (pAC: D677), welche bei den cyanobakteriellen ACn an der Position des konservierten Q998 sitzt, in die Nähe der exocyclischen NH₂-Gruppe an C6 des Adenins gelangen und für diese direkt als H-Brücken-Akzeptor fungieren, oder eine H-Brücke mit S/T ausbilden, so daß diese wiederum zum H-Brücken-Akzeptor für die NH₂-Gruppe werden könnte. Dies wurde jedoch durch eine Mutationsanalyse von Tobias Kanacher an der AnaCyaB1 widerlegt. Es konnte gezeigt werden, daß die Mutation von D719A nur geringe Auswirkungen auf die AC-Aktivität besaß. Hingegen scheint der Beitrag von T721 in der Substratbindung entscheidend zu sein. Die Mutation nach A reduziert die AC-Aktivität auf 5% (85).

Es bleibt zu beachten, daß die bisherigen Kristallstrukturen mit ATP-Analoga durchgeführt wurden und keine die tatsächliche ATP-Bindung zeigte. Die verschiedenen auf den Kristallstrukturen beruhenden Nukleosidtriphosphat-Bindungsmodelle sowohl für Adenylatcyclasen als auch für Guanylatcyclasen änderten sich häufig (14-18, 83, 84, 86). Innerhalb der Klasse III-ACn bestehen Differenzen in den konservierten AS des katalytischen Zentrums (D310, D354: Metallionenbindung; K923, QxDIW998-1002: Substratbindung; N1007: Ribosebindung; R1011, K1049, R398: Phosphatgruppenbindung, z.T. Katalyse)⁵⁷ (vgl. *7.2.1 Klasse III-Cyclase Alignment*). Dies zeigt sich auch innerhalb der 15 ACn aus *Mycobacterium tuberculosis* (87). In unserem Labor konnte von ACn mit den Austauschen in den konservierten AS K923Q und D1000N bzw. K923N und N1007H bzw. D1000T experimentell AC-Aktivität nachgewiesen werden (88). Daneben lassen sich zwischen den verschiedenen Klasse III-ACn Längenunterschiede insbesondere im Bereich von Konsensusblock II und III (Beteiligung an Substratbindung) feststellen. Die cyanobakteriellen ACn sind in diesem Bereich wie erwähnt 1AS länger, während die ACn vom Hefe-Typ 1AS und die „kurzen“ ACn vom *Bre.li.*-Typ 6AS kürzer sind als die C_{2a}-Schleife der Säuger-ACn. In Anbetracht dieser Tatsachen ist es fraglich, ob die Kristallstruktur der Säuger-ACn auf die ACn anderer Gruppen der Klasse III-ACn übertragen werden kann. Es ist eher wahrscheinlich, daß die einzelnen Gruppen dieser ACn gewisse Unterschiede in der Anordnung der AS-Reste in den katalytischen Taschen besitzen.

5.1.2.3 Tetratricopeptid-repeat-ähnliche Domäne (TPRL)

Mit dem C-terminalen, TPR-ähnlichen Motiv (AS 802-835) besitzt die Paramecium-AC eine potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungsdomäne. Obwohl es keine invarianten AS in diesem 34AS-Motiv gibt, findet man an einigen Stellen charakteristische AS:

---W(4)--L(7)**G**(8)--Y(11)-...-**A**(20)---F(24)--**A**(27)----P(32)-

Die kleinen (hydrophoben) AS an den Positionen 8, 20, 27 (fett gedruckt) zeigen die stärkste

⁵⁷ Die Numerierung bezieht sich auf Säuger-AC Typ I (Rind).

Konservierung. Mit Ausnahme der zwei aromatischen AS an Pos.4 (W) und 11 (Y) und der hydrophoben AS an Pos.7 (L) ist dieses Muster im pAC-TPRL konserviert. Die Kristallstruktur des dreifach TPR der Proteinphosphatase 5 (89) eröffnete, daß eine TPR-Einheit zwei α -Helices A und B (AS 1-13; AS 17-30) ausbildet, welche sich in einem Winkel von 24° antiparallel zueinander anordnen. Diese charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur setzt sich in der Aneinanderlagerung sich wiederholender TPR-Motive fort, so daß benachbarte α -Helices immer antiparallel in einem Winkel von 24° zueinander zu liegen kommen.

Für Wechselwirkungen zwischen den TPR-Helices wird das sogenannte „Knopf und Loch Modell“ angenommen (90, 91). Hierbei bilden die konservierten AS W-LG-Y die auf einer Seite der Helix A zu liegen kommen, eine hydrophobe Tasche aus, in welche sich die Phenylalanin-Seitenkette des Helix B-Musters A-F-A einlagern kann. Betrachtet man die Helix-Wheel-Modelle des pAC-TPRL (Abbildung 67), so läßt sich vermuten, daß die hydrophobe Tasche in Helix A mangels großer, aromatischer/hydrophober AS an dieser Stelle möglicherweise nur schwach ausgebildet wird.

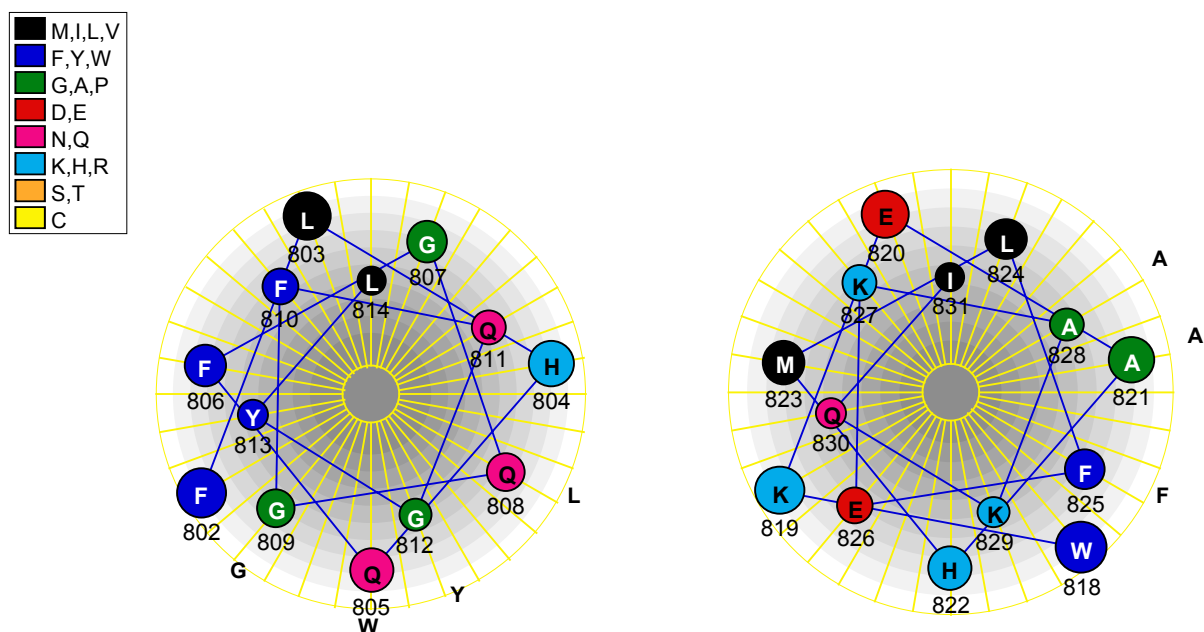


Abbildung 67: Helices A und B des TPRL. Die konservierten Positionen sind außerhalb des Rades bezeichnet. W-LG-Y zeigen den Bereich für die Ausbildung der Tasche, A-F-A auf Helix B bilden den Knopf aus.

Durch die Aneinanderlagerung aufeinanderfolgender TPR-Motive resultiert eine helicale Überstruktur (rechtshändig), die einen amphipathischen Kanal ausbildet. Dieser Kanal kann optimal einzelne α -Helices aufnehmen und so für unterschiedliche Protein-Protein-Wechselwirkungen sorgen, wie z.B. die Zusammensetzung von Multiproteinkomplexen. Es werden sowohl TPR-TPR-, als auch TPR-nonTPR-Interaktionen diskutiert. Auch die Anlagerung mehrfach ungesättigter Fettsäuren ist bekannt. Es wird angenommen, daß die spezifischen Substratbindungen trotz dieser konservierten räumlichen Proteinstruktur durch Spezialisierung der einzelnen TPRs in ihren nicht-konservierten AS zustande kommt. Zwischen den TPRL der pAC und der AnaCyaB1 können vor allem in Helix A konservierte AS gefunden werden (vgl. Abbildung 68), wel-

che auf einer Seite der Helix zu liegen kommen. Dies deutet darauf hin, daß beide TPRL die gleiche Funktion erfüllen, was mit dem experimentellen Befund der Austauschbarkeit des TPRL in AnaCyaB1 gegen den pAC-TPRL in Einklang steht (s. S. 111 und 112).

	α-Helix A	α-Helix B	
pAC-TPR	: FLHQFGQCFQGYLLGNWKEAHMLFEKAKQIRPND	: 802-835	
Ana-TPR	: FLFHYHNGRTAYLVRDFTQAIACFNSAKHIRPTD	: 795-828	
IEFS HUMAN	: VNELKEKGNKALSVGNIDDALQCYSEAIKLDPHN	: 4-37	
IEFS HUMAN	: ALKEKELGNDAYKKKDFDTALKHYDKAKELDPTN	: 225-258	
IEFS HUMAN	: ALEEKKNKNECFQKGDYPOAMKHYTEAIKRNPKD	: 360-393	
PPP5 HUMAN	: AEELKTCANDYFKAKDYENAIKFYSQAIELNPSN	: 28-61	
CYA3 RHIME	: ANAYTALGTIRDFQGRHEEALALYTRAHRLDPQF	: 454-487	
CYA3 RHIME	: PQGHYTLALALSWMRRLDLAEHAAERAIELDPNS	: 420-453	
NUC2 SCHPO	: YNAWYGLGMVYLKTGRNDQADFHFQRAEINPNN	: 499-532	
SSN6 YEAST	: AKALTSLAHLYSRDMFQRAAELYERALLVNPEL	: 80-113	
SSN6 YEAST	: PKLWHGITGILYDRYGSLDYAEAEFAKVLELDPHF	: 150-183	
PPP5 HUMAN	: IKGYRRAASNMALGKFRALRDYETVVVKVPHD	: 96-129	
CC16 YEAST	: SEIHCSLGYLYLKTKKLQKAIIDLHLKSLYLKPNP	: 708-741	
PEX5 YEAST	: ELMWNRLGASLANSNRSEBAIQAYHRALQLKPSF	: 491-524	
SSN6 YEAST	: SDVWATLGHCYLMLDDLQRAYNAYQQALYHLSNP	: 114-147	
NUC2 SCHPO	: PESWCILANCFSLQREHSQALKCINRAIQLDPTF	: 431-464	
PEX5 YEAST	: PEIQQLCLGLLFYTKDDFDKTIIDCFESALRVNPN	: 457-490	
SSN6 YEAST	: PIFWCSTIGVLYYQISQYRDALDAYTRAIRLNPI	: 330-363	
CC23 YEAST	: TNAWTLMGHEFVELSNSHAAIECYRRAVDICPRD	: 431-464	
LGN HUMAN	: RRAYSNLGNAYIFLGEFETASEYYKKTLLLLARQL	: 235-268	
LGN HUMAN	: AKASGNLGNLTKVLGNFDEAIVCCQRHLDISREL	: 95-128	
LGN HUMAN	: AQSCYSLGNTYTLQDYEKAIIDYHLKHLAIAQEL	: 275-308	
IEFS HUMAN	: AKAYARIGNSYFKEEKYKDAIHFYNKSLAEHRTP	: 300-333	
CC16 YEAST	: SSLCFLRGKIYFAQNNFNKARDAFREAILVDIKN	: 359-392	
NUC2 SCHPO	: SVLITCICMIYERCKDYKKALDFYDRACKLDEKS	: 533-566	
CC16 YEAST	: PLVLNEMGVMYFKKNEFVKAKKYLKKALEVVKDL	: 633-666	
SSN6 YEAST	: WDIWFQLGSVLESMGEWQGAKEAYEHVLAQNQHH	: 224-257	
IEFS HUMAN	: IKGYTRKAAALEAMKDYTKAMDVYQKALDLDSSC	: 428-461	
NCF2 HUMAN	: AVAYFQRGMLYYQTEKYDLAIKDLKEALIQLRGN	: 71-104	
CC16 YEAST	: ISIQNLNGHTYRKLNENEIAIKCFRCVLEKNDKN	: 674-707	
IEFS HUMAN	: AKLYSNRAACYTKLLEFQLALKDCEECIQLEPTF	: 394-427	
	W LG Y	A F A P	

Abbildung 68: Alignment einiger TPR-Motive. Das Alignment wurde auf Basis des *Pfam-Familien-alignments* erstellt. Die Sequenzen des pAC- und AnaCyaB1-TPR (Ana-TPR) wurden zum Vergleich hinzugefügt. Zwischen diesen beiden TPRL konservierte AS sind unterstrichen. IEFS (*H.sapiens*): Hsp90/Hsp70 organising protein (ST11)(P31948); PPP5 (*H.sapiens*): Proteinphosphatase 5 (P53041); CYA3 (*R.meliloti*): Adenylatcyclase3, putativ (Q9Z3Q0); NUC2 (*S.pombe*): Nuclear scaffold-like protein p76 (cdc27-Analagon) (P10505); SSN6 (*S.cerevisiae*): Glucose repression mediator protein (repressor of transcription) (P14922); CC16 (*S.cerevisiae*): cell division control protein 16 (cdc16) (P09798); PEX5 (*S.cerevisiae*): Peroxisomal targeting signal receptor (P35056); CC23 (*S.cerevisiae*): cell division control protein 23 (cdc23) (P16522); LGN (*H.sapiens*): Mosaik protein (P81274); NCF2 (*H.sapiens*): Neutrophil NADPH oxidase factor 2 (p67-phox) (P19878)

Sowohl TPR-präsentierende Proteine als auch die mit ihnen in Wechselwirkung tretenden Partner sind Proteine unterschiedlicher biochemischer und biologischer Wirkung, so daß keine Voraussage getroffen werden kann, wofür die TPR-Einheit der Paramecium-AC dient, noch dazu als daß bisher nur Proteine mit sich wiederholenden TPR-Motiven diskutiert wurden (3-16

TPR). Es existieren isoliert liegende einzelne TPR-Einheiten auf Proteinen, die an anderer Stelle zusätzliche TPR-*repeats* besitzen; häufig scheinen sich aber auch diese TPR-Domänen aneinanderzulagern, so daß die verbindende Peptidkette „nach hinten wegsteht“ und andere Aufgaben erfüllen kann. Es wurden neben heterotypen Protein-Protein-Wechselwirkungen auch homotype Wechselwirkungen beschrieben, so daß die TPR-Domäne möglicherweise als Homodimerisierungsdomäne wirkt. Auch die Interaktion mit einem Regulatorprotein kann nicht ausgeschlossen werden. Mutationsanalysen an einigen TPR-*repeats* aufweisenden Proteinen in den konservierten, kleinen AS an den Positionen 8 und 20 zeigten, daß der Austausch dieser AS zu Störungen in der Proteinfunktion führen (92-95). Entsprechende Mutationen im TPR der modellhaften AnaCyaB1 könnten Aussagen zur Notwendigkeit eines funktionellen TPR und über dessen Funktion als mögliche Homodimerisierungsdomäne geben.

Bekannt ist, daß das Fehlen dieser Domäne sowohl am Holoenzym als auch an der katalytischen Domäne von AnaCyaB1 bei Expression in *E.coli* zu Proteinmißfaltungen führt (s. S. 111).

Weitere Beachtung muß dem absoluten C-Terminus (pAC AS 852-865) geschenkt werden, welcher zwischen den TPRL-tragenden ACn stark konserviert ist (pAC, AnaCyaB1 und -CyaB2 und entsprechende ACn aus *Plasmodium falciparum* und *Tetrahymena pyriformis* (73)) (s. *Abbildung 69*), was vermuten läßt, daß dieser Proteinabschnitt eine Funktion erfüllt. Möglicherweise steht diese mit dem TPRL in Zusammenhang. Nahe liegend wäre, daß dieser Abschnitt Wechselwirkungen mit dem TPRL bei der Homodimerisierung eingeht. Eine Funktionsanalyse durch C-terminale Proteinverkürzungen und Mutationen könnte interessante Aufschlüsse geben.

pAC	:	APSDWK-GYRELTEK	:	865
tetAC	:	APSDWV-GFRELPEK	:	979
AnaCyaB1	:	PPPQWD-GVWTIFTK	:	859
AnaCyaB2	:	TDSEWDECVWTFQEK	:	860

Abbildung 69: C-Terminus der TPRL-tragenden ACn. pAC: in dieser Arbeit beschriebene Paramecium-AC; tetAC: AC aus *Tetrahymena pyriformis*; AnaCyaB1 und AnaCyaB2 aus *Ana.sp.*

5.2 Heterologe Expression und mögliche Ursachen für deren Erfolglosigkeit

5.2.1 Proteinfaltung

5.2.1.1 Expression des löslichen Proteinabschnitts

Zunächst wurden als Hauptursache der nicht-aktiven Exprimierbarkeit der pAC Löslichkeitsprobleme angesehen. Diese traten bei Expression des verkürzten Proteins (cytosolischer Bereich) in *E.coli* auf, was hier nicht überraschend war, da die Ablagerung exprimierten Fremdproteins in *inclusion bodies* ein häufig auftretendes Phänomen ist. Der Schluß, daß die Inaktivität in den Zentrifugations-Überständen auf unzureichende Löslichkeit des Enzyms zurückzuführen ist, wurde aufgrund von SDS-PAGE-Gelen getroffen. Zeitweise stand noch kein

Antikörper zur Verfügung oder auf den Aufwand von Western Blots wurde verzichtet. Es wurden viele Versuche unternommen, die Löslichkeit zu verbessern (zum Teil von Jürgen Linder), hierunter verschieden starke Verkürzungen des cytosolischen Bereichs bzw. die Expression der katalytischen Domäne ohne TPRL und C-Terminus, Chimäre mit der verwandten, aktiv exprimierbaren AnaCyaB1 (AS 595-859), eine Mutation im Linkerbereich zwischen Konsensusblock I und II zur Längenanpassung an verwandte ACn und die Expression der Stopcodon-Mutante (suboptimale Codonusage). Keiner dieser Versuche führte zur funktionellen Exprimierbarkeit. Löslichkeitsprobleme sind in der Regel auf eine fehlerhafte Proteinfaltung rückführbar. Die folgenden Versuche standen im Sinne einer Verbesserung der Löslichkeit. So wurden Zellkulturen gesucht, die möglicherweise die korrekte Faltung des Proteins bewerkstelligen konnten. *HEK293* war die Zellkultur der Wahl für die Expression des Gesamtproteins (s.u.), da es mit dieser Kultur gelungen war, die Paramecium-GC und einige Säuger-ACn zu exprimieren (1, 55, 56). Der cytosolische Bereich der pAC (Frag. e+f) konnte mit dieser Zellkultur nur in sehr geringen Mengen im Zentrifugationsüberstand erhalten werden. Die Alternative, im zellfreien System (*RTS500 in vitro* Expressionssystem mit *E.coli*-Lysat) zu arbeiten, um Regulationsmechanismen des lebenden Organismus zu umgehen, erwies sich ebenfalls als nicht erfolgreich. Die Expression des löslichen pAC-Proteinabschnitts führte zu unlöslichem Produkt. Durch den Zusatz von Paramecienlysat in die *in vitro* Expressionsreaktion wurde versucht, den Proteinsyntheseapparat mit Paramecium-eigenen Proteinfaltungskomponenten zu ergänzen. Der Zusatz hemmte jedoch das gesamte System. Erst die prokaryotische Zellkultur *S.lividans* 1326, welche ebenfalls eine homodimere Klasse III-AC besitzt, ergab zu 50% Expressionsprodukt in der löslichen Lysatfraktion (pAC Frag. e+f), die Gesamtexpressionsrate schien jedoch zu gering, um AC-Aktivität messen zu können. Es wurde davon ausgegangen, daß möglicherweise Proteinmengen im 0,5µg-Bereich notwendig sind, um eine ausreichende Dimerisierung des Proteins zu erreichen. In der *Sf9*-Insektenzellkultur konnte bei Anwendung der optimalen Infektionsstärke für einige Konstrukte eine ausreichend hoch erscheinende, „lösliche“ Expressionsrate erreicht werden. pAC (AS 515-865) (*Pore-Loop* und gesamter cytosolischer Bereich) wurde in vergleichbaren Mengen wie die aktiv exprimierbare plAC (AS 526-884) (katalytische Domäne mit gesamtem C-Terminus) im Zentrifugationsüberstand gefunden, jedoch war sie nicht funktionell und nicht zugänglich für eine native Reinigung (im Gegensatz zum entsprechenden plAC-Abschnitt (73)). Gleiches gilt für pAC (AS 530-865), welche ca. halb so stark in der löslichen Lysatfraktion wie der entsprechende Abschnitt der plAC (AS 526-884) erschien.

Das Kriterium für die Löslichkeit des Expressionsprodukts war dessen Nachweis im Zentrifugationsüberstand. Mikroaggregate können bis zu einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 100000xg, 1Std. im Überstand verbleiben, so daß dieses Kriterium nicht als absolut anzusehen ist. Die immunchemische Detektion, wie sie in dieser Arbeit für den löslichen Expressionsnachweis angewendet wurde, ist ein sehr empfindliches Verfahren. Auch kleine Mengen verschleppten Zentrifugationspellets sind nachweisbar. Diese Aspekte stellen in Frage, ob bei der Expression in *S.lividans* und *Sf9* tatsächlich lösliches Produkt erhalten wurde, wie im Ergebnisteil beschrieben. Unterstützung findet der Gedanke an fehlgefaltetes Protein in Form von Mikroaggregaten in der Tatsache, daß sämtliche vermeintlich löslichen Expressionsprodukte nicht für die native Reinigung zugänglich waren, während die funktionell exprimierten, gleichartigen ACn AnaCyaB1 (AS 530-859) und plAC (AS 526-884) nativ reinigbar waren. Der Schluß liegt nahe, daß in keinem Fall eine lösliche Expression erreicht wurde.

Anhand verschiedener Chimären der pAC mit den funktionell exprimierbaren, homologen ACn AnaCyaB1 und pIAC (s. Abschn. 4.4.2.2 und 4.9.1.3) wurde versucht, den „Problembereich“ des cytosolischen pAC-Fragments einzugrenzen, welcher im Vergleich zu diesen beiden ACn zu dem unterschiedlichen Expressionsverhalten führt. Es konnte aber kein lösliches Expressionsprodukt als Ausgangssituation für mögliche weitere Eingrenzungen erhalten werden.

5.2.1.2 Expression des Gesamtproteins

Auch die funktionelle Expression des Holoenzym mit seinen 6TM erwies sich als unmöglich in den angewendeten Zellkulturen (*HEK293*, *Sf9* (Jürgen Linder) und *Xenopus-Oozyten* (Jürgen Linder in Zusammenarbeit mit AG Fakler)). In *HEK293* und *Sf9* (51) wurde die Membranlokalisierung nicht überprüft, jedoch zeigte sich bei Lokalisationsuntersuchungen in den eukaryotischen Zellen *CHO* (*chinese hamster ovary cells*) und *OK* (*opossum kidney cells*), daß offenbar kein Export vom ER bzw. anderen intrazellulären Kompartimenten in die Plasmamembran stattfand, auch bei Fusion mit dem ER-Export-Signal FCYENE nicht (vgl. *Abbildung 41*). Die Retention des Proteins im ER spricht sehr stark für eine Proteinmißfaltung, welche zum nicht Bestehen der Qualitätskontrolle führt. Ein weiterer Grund für die Unwirksamkeit des ER-Exportsignals wäre durch die Anwesenheit eines noch unbekanntes Retentionssignals gegeben, welches das vorwärts-*trafficking*-Signal „überstimmt“ (66). Versuchsergebnisse von Jürgen Linder schließen das Vorkommen eines solchen Motivs im C-Terminus aus. Er konnte bei Fusion des cytosolischen Bereichs an CD4-Reporterprotein eine Oberflächenexpression beobachten (51). Die aufgetretene Fehllokalisierung der pAC oder deren Mißfaltung machten die Messung von AC-Aktivität (*HEK293*) bzw. die elektrophysiologische Untersuchung des mutmaßlichen K⁺-Kanals (*Xenopus-Oozyten*; Jürgen Linder) unmöglich.

5.2.2 Isoenzyme

Eine mögliche Erklärung für das Scheitern der Expressionsversuche, sowohl des cytosolischen Proteinabschnitts als auch des Holoenzym, ist die Existenz von Isoenzymen. Arne Hammer konnte mehrere PCR-Fragmente von Isoenzymen der pAC-Sequenz finden (96). Es ist denkbar, daß die gefundene cDNA der pAC nicht zu einem (funktionellen) Protein translatiert wird, sondern es sich hierbei um ein redundantes Gen handelt.

5.2.3 Funktionalität als Homodimer?

Andere Überlegungen ließen die Frage nach der Notwendigkeit einer zweiten Untereinheit aufkommen, sei sie katalytischer oder regulatorischer Art. Es gibt mehrer Anhaltspunkte, die auf eine mögliche zusätzliche Untereinheit hinweisen:

- a) K⁺-Ionenkanäle bilden *in vivo* auch Heteromere. Hierdurch könnte eine weitere Untereinheit zur katalytischen Domäne für die Ausbildung eines Heterodimers bereitgestellt werden. Für die Ausbildung heteromerer K⁺-Kanäle in *Paramecium* spricht auch ein als post-translationales *Silencing* bezeichneter Effekt, wie ihn Ling *et al.* (97) diskutieren: nach Transformation von *Paramecium* mit *PKA11* entstehen Zellen, welche einen Defekt in zwei Ca²⁺-aktivierten K⁺-Strömen zeigen; sie führen diesen Effekt, welcher nicht durch Gen-*silencing* zustande kommt, auf die stöchiometrische Fehlzusammensetzung von heteromeren K⁺-Kanälen durch die Überexpression der Untereinheit *PKA11* zurück.

- b) Einige K^+ -Kanäle binden β -Untereinheiten. Möglicherweise fehlt für die Funktionalität der pAC die entsprechende β -Untereinheit.
- c) Die Paramecium-Mutante *restless*, welche ihre K^+ -Leitfähigkeit in Nieder- K^+ -Puffer nicht kontrollieren kann, kann durch eine zusätzliche, extragene Mutation (Paramecium-*restless*-Mutante *manxA*) repariert werden. Dies spricht für die Existenz einer weiteren Untereinheit, welche in der Regulation des Enzyms eine Rolle spielt.
- d) K^+ -Kanäle bilden Tetramere mit einer 4fachen Punktsymmetrie. Klasse III-ACn lagern sich für die Ausbildung des katalytischen Zentrums als Dimere in einer antiparallelen Orientierung zusammen. Für das Zusammenkommen der cytosolischen Schleifen in einer solchen Anordnung müssen entweder die Linkerbereiche hochflexibel sein, so daß die Schleifen benachbarter pAC-Monomere dimerisieren können, wobei sich dabei eine Schleife in Bezug auf den Membrananker in die entgegengesetzte Richtung verglichen mit der anderen orientieren muß. Diese freie Beweglichkeit der Aufhängung erscheint unwahrscheinlich, noch dazu in Anbetracht des kurzen Linkers zwischen dem Membranaustritt und der katalytischen Domäne. Die zweite Möglichkeit ist die Dimerisierung der cytosolischen Schleifen zweier gegenüberliegender pAC-Monomere unterhalb der Ionenpore. Auch dies scheint unwahrscheinlich, da es zwei von vier katalytischen Domänen überflüssig macht, die Natur jedoch selten verschwenderisch agiert. Dieser Aspekt wird durch die Ergebnisse von Higgins *et al.* (98) in einer neuen Veröffentlichung in Frage gestellt, welche das Arrangement der vier cyclischen Nukleotidbindungsstellen des tetrameren CNG-Kanals (cyclisch Nukleotid-gesteuerter Kanal) als zwei unabhängig Dimere vorschlägt.
- e) Die von Linder *et al.* (1) aufgestellte Hypothese zur Entstehung der 2x 6TM Säuger-ACn (s. S. 72), sieht eine Mutation der katalytischen Bereiche von homodimeren zu heterodimeren Funktionseinheiten wahrscheinlich vor Fusion der verdoppelten Gene vor. Wenn es sich bei der gefundenen AC um einen membranverankerten Vorläufer von 2x 6TM-ACn bzw. der Paramecium-GC handelt, könnte bereits die Mutation zu zwei unterschiedlichen Funktionseinheiten stattgefunden haben, welche als Dimere katalytische Aktivität entwickeln.

Die Problematik einer eventuell fehlenden zusätzlichen Untereinheit wurde in Versuchen mit dem Zusatz von verschiedenartig aufbereiteten Paramecienlysaten zu HEK293-Homogenaten adressiert, es konnte jedoch keine „Aktivierung“ der pAC beobachtet werden. Dieser Versuch kann keinesfalls dem Anspruch auf die erschöpfende Untersuchung dieses Problems gerecht werden. Der Zusatz der Paramecienlysate zu den Homogenaten mit idealerweise membranständigem Expressionsprodukt kann lediglich lösliche Parameciumkomponenten für die Wechselwirkung mit pAC bereitstellen. Die Wechselwirkung von zusätzlichen Membrankomponenten mit den vorhandenen TMs der pAC ist äußerst unwahrscheinlich.

Ein weiteres aufschlußreiches Experiment bezüglich der Ausbildung heterodimerer katalytischer Zentren könnte die Kombination des pAC cytosolischen Bereichs (AS 530-865) mit einem entsprechenden, mutationsinaktivierten AnaCyaB1-Proteinabschnitt (AS 595-859) sein:

Tobias Kanacher führte Mutationsanalysen der AnaCyaB1 durch, in welchen er katalytisch notwendige Positionen mutierte. Es resultierten als Homodimer inaktive Konstrukte, deren AC-

Aktivität in Heterodimeren mit unterschiedlichen Mutationen durch Ausbildung einer katalytisch funktionellen Tasche rekonstituiert werden konnte (69).

Möglicherweise kann eine Heterodimerisierung mit pAC zu einer aktiven katalytischen Tasche stattfinden.

5.2.4 Etablierung der T7-*Streptomyces lividans* Zellkultur

Die Einführung von T7-*S.lividans* als Expressionskultur war nicht geglückt. Die Entstehung einer Eintrübung durch einzellerartige Partikel blieb ungeklärt. Der Verdacht, regelmäßig eine Kontamination in die Kulturen eingeschleppt zu haben, konnte nicht bestätigt, aber auch nicht vollständig entkräftet werden. In den durchgeführten Kontrollen konnte weder eine Kontaminationsquelle (z.B. Arbeitsgeräte, Medien, AB) noch ein kontaminierender Fremdorganismus gefunden werden. Die Untersuchungen bezüglich eines kontaminierenden Keims waren sehr simpel aufgebaut, bei Anwesenheit eines zweiten Mikroorganismus hätte man jedoch erwarten können, diesen durch die Verdünnungsausstriche der potentiell kontaminierten Kulturen auf R5-Agarplatten zu entdecken, da die Eintrübung u.a. in R5-Flüssigmedium auftauchte.

Eine Kontamination kann durch die angewendeten Verfahren auch nicht sicher ausgeschlossen werden. Hierfür wären genaue mikrobiologische Untersuchungen nötig. Allein die stete Regelmäßigkeit des Auftretens machen sie jedoch unwahrscheinlich.

Es machte den Anschein, die Mycelien seine „zerfallen“. Bei Actinomyceten existiert eine Neigung zur Fragmentation. Hierbei brechen die Hyphen auf in Einzelzellen, die als Sporen (Fragmentationssporen) dienen. In der Familie der Streptomycetaceae ist die Fragmentation wenig ausgeprägt. Jedoch konnten mikroskopisch vereinzelt an den Enden verdickte Filamente gefunden werden, ein Phänomen welches bei der Fragmentation von Filamenten auftritt. Die Beschreibungen zur Fragmentation sind dem „Wörterbuch der Biologie: Mikrobiologie“ entnommen (99). Rueda *et al.* (100) beschreibt die Sporulation von *Streptomyces brasiliensis* unter bestimmten Bedingungen in Flüssigkultur. Ob diese Sporulation mit dem beobachteten Phänomen vergleichbar ist und ob eine Fragmentation unter Flüssigkulturbedingungen bei *S.lividans* auftreten kann, z.B. aufgrund bestimmter Verunreinigungen in Mediumbestandteilen⁵⁸, ist mir nicht bekannt, es wurden auch keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Die Beschreibung der Fragmentation trifft gut auf das Erscheinungsbild der Eintrübung zu und wäre diskutierenswert bei einer weiteren Auseinandersetzung mit dieser Kultur.

⁵⁸ An erster Stelle ist hier die Saccharose zu nennen. Es wurde *Südzucker* verwendet, welcher in seiner Reinheit sicherlich größeren Schwankungen unterliegt.

6 Zusammenfassung

Die Arbeit beschäftigte sich mit der Klonierung einer Paramecium-AC, von der bekannt war, daß es sich um ein membranständiges Protein von 96kDa handelt, das potentiell eine Ionenpore besitzt.

Aus der Genbanksuche ging eine 2668bp lange cDNA hervor. Diese wurde durch eine Sequenz genomischer DNA, die aus der Durchmusterung einer entsprechenden Genbibliothek erhalten wurde, am 5'-Ende um 4bp bis zum Startcodon ergänzt. Der ORF des gefundenen Gens ist 2595bp lang und codiert für ein 97.9kDa, 865AS langes Protein.

Aufgrund von Proteinanalysen konnte dem Protein ein Aufbau zugewiesen werden, der dem gesuchten Protein entsprach: Das Multidomänenprotein besitzt eine mutmaßliche Klasse III-AC-Domäne im C-terminalen, cytosolischen Bereich, welche der Gruppe der cyanobakteriellen, homodimeren ACn angehört. Der N-terminale Bereich besitzt Ähnlichkeit zu K_v -Kanälen, wobei der spannungssensorische Kanalabschnitt von TM1-TM4 strukturell und sequenziell konserviert ist, während sich im Ionenpore-formenden Abschnitt strukturelle Unterschiede ergeben: der mutmaßliche *Pore-Loop* befindet sich *downstream* von TM6. *Downstream* der AC-katalytischen Domäne werden Ähnlichkeiten zu einer einzelnen Tetratricopeptidrepeateinheit gefunden.

Die Abweichungen des Ciliatencodes vom universellen genomischen Code machten die Synthese des vollständigen Gens für die Expression in heterologen Systemen notwendig. Dabei wurde die Codonusage auf Säuger-Codonusage optimiert. Die heterologe Expression sowohl des Holoenzym als auch des C-terminalen cytosolischen Bereichs zum experimentellen Nachweis der AC-katalytischen Funktion scheiterten:

Es wurde versucht den C-terminalen, cytosolischen Proteinabschnitt in *E.coli*, *HEK293*, *RTS500-in vitro* Expressionssystem, *Streptomyces lividans* 1326 und *T7-S.lividans* und *Sf9* zu exprimieren. Dabei wurde in der Länge des zu exprimierenden Proteinfragments N- und C-terminal variiert und Versuche mit einer in Teilbereichen suboptimalen Codonusage (mutierte pAC-Originalsequenz) durchgeführt. Versuche, den zu exprimierenden Bereich durch Übertragung von Expressionsdaten der homologen AnaCyaB1 zu optimieren, brachten keinen Erfolg. Auch Versuche, den zur nicht-funktionellen Expression führenden Bereich einzugrenzen durch a) eine Mutation *downstream* des AC-Konsensusblocks I zur Längenanpassung an die entsprechenden ACn des cyanobakteriellen Typs und b) Herstellung von Chimären mit den aktiv exprimierbaren, homologen Enzymen AnaCyaB1 und pIAC, scheiterten.

Die Expression des Holoenzym wurde in *HEK293* und in *CHO*- und *OK*-Zellen versucht. Trotz einer Verbesserung in einem Abschnitt des synthetischen Gens und verschiedener Optimierungsversuche wurde kein funktionelles Expressionsprodukt erhalten. Fluoreszenzlokalisationsuntersuchungen in *CHO*-Zellen zeigten keine Oberflächenexpression. Die Fehllokalisierung konnte auch durch Fusionen mit den N-Termini der K^+ -Kanäle rSK und Kir2.1 und mit dem ER-Export-Signal „FCYENE“ (*OK*-Zellen) nicht aufgehoben werden.

Für den spezifischen (Expressions-)Nachweis des Enzyms wurden Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen mit der denaturierend gewonnenen katalytischen Domäne hergestellt.

Die Charakterisierung der erhaltenen Antiseren und der durch Sepharose A-Reinigung gewonnenen IgG-Fraktion zeigte jedoch eine eingeschränkte Spezifität und Empfindlichkeit. Eine spezifische Affinitätsreinigung, welche eine Spezifitätserhöhung hätte herbeiführen können, war wegen der Unlöslichkeit des Antigens unmöglich.

Die Charakterisierung kommerziell hergestellter Antiseren gegen ein N-terminales 16AS-Peptid ergab ebenfalls eine eingeschränkte Spezifität und Empfindlichkeit. Die Kopplung des Antigens an ein Chromatographiesäulenmaterial war erfolglos, so daß auch hier die Affinitätsreinigung nicht durchgeführt werden konnte.

7 Anhang

7.1 Homologieklonierung und Proteinanalyse: Ergebnisse der Datenbanksuche

Die vollständigen Ergebnisse der *blastx*-Datenbanksuchen und sonstigen Proteinanalysen folgender Klone sind auf der beiliegenden CD gespeichert oder können in der *online*-Version an der Universitätsbibliothek Tübingen nachgesehen werden.

blastx-searches: hy-1_r43a18006, hy-2_r43a30007, hy-3_11a245004, hy-4_11b250001, hy-5_11b250002, hy-6_11b250005, hy-7_11b235002, hy-8_13a250005, hy-9_13b236005, hy-10_15b145025, hy-11_16b50013, hy-12_17a150017, hy-13_20235003, hy-14_20240016, hy-15_20240017, hy-16_12169804, hy-17_lf1-1a, 04199901 (*upstream-message*).

Proteinanalysen mit der pAC: *balstp*, *Pfam-search*, *Smith/Waterman*-Suche, *TopPred2*.

7.2 Alignments

Zur Verdeutlichung einiger Sachverhalte der Arbeit sind die folgenden Alignments abgedruckt:

Klasse III-Cyclasen Alignment (Abschnitt 7.2.1)

In das Alignment wurden Vertreter der Klasse III aufgenommen, auf welche in dieser Arbeit Bezug genommen wird. Aligned wurden die katalytischen Domänen. Die im Homologieklonierungsverfahren gefundene pAC ist an oberster Stelle im Alignment aufgeführt.

a) ACn vom cyanobakteriellen Typ⁵⁹: *RhimeCya1*: *Rhizobium meliloti* (P19485), *StiauCyaB*: *Stigmatella aurantiaca* (P40138), *AnaspCyaB1*: *Anabaena spirulina* (BAA13998), *DicdiCyaG*⁶⁰: *Dictyostelium discoideum* (Q03101); b) „kurze“ ACn vom *Bre.li.*-Typ: *BreliCya*: *Brevibacterium liquefaciens* (CAA40760), *StrcoeCyaA*: *Streptomyces coelicolor* (P40135); c) ACn vom Hefe-Typ: *YeastCyaA*: *Saccharomyces cerevisiae* (P08678), *NeucrCyaA*: *Neurospora crassa* (Q01631), *TrybrAC*: *Trypanosoma brucei* (CAA09952); d) ACn vom 2x 6TM-Typ: *Drome_C2a/Drome_C1a*: *Cya1* aus *Drosophila melanogaster* (P32870), *ACIbov_C2a/ACIbov_C1a*: Rinder AC Typ I (P19754), *ACIXmou_C2a/ACIXmou_C1a*: Mäuse AC Typ IX (P51830), *ACIirat_C2a/ACIirat_C1a*: Ratten AC Typ II (P26769), *ACVirat_C2a/ACVirat_C1a*: Ratten AC Typ VI (Q03343), *ACVrat_C2a/ACVrat_C1a*: Ratten AC Typ V (Q04400); e) GCn: *GCSbet1_hum*: humane, lösliche GC β 1 (Q02153), *GCSalp1_hum*: humane, lösliche GC α 1 (Q02108), *paraGC_C2a-lik/paraGC_C1a-lik*: Paramecium-GC (CAB44361).

⁵⁹ Erweitertes Alignment von ACn dieser Gruppe siehe 7.2.2 *Alignment der Klasse III-ACn vom cyanobakteriellen Typ*

⁶⁰ *DicdiCyaG* ist als bakterielle, homodimere AC, welche zwischen Konsensusblock III und IV eine AS mehr besitzt beim cyanobakteriellen Typ eingeordnet. Das Konservierungsmuster dieser AC entspricht jedoch mehr den Säuger-ACn. Auch ist die Positionentsprechende AS zu D1000 (Numerierung AC Typ I) ein D und nicht wie bei den cyanobakteriellen ACn ein T (S).

Alignment der Klasse III-ACn vom cyanobakteriellen Typ (Abschnitt 7.2.2)

AnaspCyaB1: *Anabaena spirulina* (BAA13998), *AnaspCyaB2*: *Anabaena spirulina* (BAA13999), *SpiplCyaC*: *Spirulina platensis* (BAA22997), *AnaspCyaA*: *Anabaena spirulina* (BAA13997), *AnacyCyaA*: *Anabaena cylindrica* (P43524), *TrepaAC*: *Treponema pallidum* (AAC65466), *StiauCyaA*: *Stigmatella aurantiaca* (P40137), *StiauCyaB*: *Stigmatella aurantiaca* (P40138), *SpiplAC1*: *Spirulina platensis* (BAA22996), *RhimeCya1*: *Rhizobium meliloti* (P19485), *SynspAC*: *Synechocystis spirulina* (BAA17880).

K⁺-Kanal Alignment (Abschnitt 7.2.3)

Aligned sind einige zur pAC-Ionenpore ähnliche K_v-Kanäle. Sämtliche aufgenommenen Vertreter sind im Ergebnis des *blast-search* der pAC N-terminalen Domäne (AS 1-521) erschienen. *shaker*: *Drosophila melanogaster* (P08510), *K_v1.1-mou*: Maus (CIK1) (P16388), *Xenla*: K⁺-Kanal *Xenopus laevis* (Q91781), *Frag.1-rab*: Fragment eines Kanals, Hase (Q9xsq0), *K_v1.2-mou*: Maus (CIK2) (P15386), *Frag2-rab*: Fragment eines Kanals, Hase (Q9tuk7), *Frag4-rab*: Fragment eines Kanals, Hase (Q9xsp9), *K_v1.4-mou*: Maus (CIK4) (Q61423), *KCN1-hum*: humaner, cGMP-gesteuerter K_v-Kanal (Q16322), *KCN1-rab*: cGMP-gesteuerter K_v-Kanal, Hase (Q28649), *SKV1.1*: *Schistosoma mansoni* K⁺-Kanal (Q26597), *K_v2.1-hum*: human (CIKA) (Q14721), *K_v3.1-hum*: human (CIKD) (P48547), *K_v4.1-hum*: human (KCND1) (BAA96454). Oberhalb der Sequenzen ist die Lage der Elemente der pAC-Ionenpore eingezeichnet (TM wie in *Topred2*-Analyse vorhergesagt), unterhalb die Elemente der K⁺-Kanäle (entsprechend *shaker*-Kanal (101))

7.2.1 Klasse III-Cyclase Alignment

```

pAC : ----- : -
RhimeCya1 : -----DAIFTFALYVPKELVVRKGIESGHF----- : 460
StiauCyaB : -----VVEEILKSPDT----- : 155
AnaspCyaB1 : -----VAEQVMALGED----- : 590
BrelICYA : ----- : -
StrcoeCyaA : -----VWRRQLAASAGRVI----- : 177
YeastCyaA : -----QQNRFTLNKNSLMTRRSTFFEDTTLRR----- : 1655
NeucrCyaA : -----QQFKGQLNATFSMPQDDPSHVPPSGNKRKRKVRRAEGPLDSNL----- : 1877
TrybrAC : -----TGSRLTVFLCCI---MR-NKRDNDNA----- : 260
DicdiCyaG : -----EKNLILNKILPLEVSVKLENGED----- : 386
Drome_C2a : -----SNKRILHNLLPAHVAAHFLDAQFRN----- : 950
ACIbov_C2a : -----DNKRILFNLLPAHVAQHFLMSNPRN----- : 859
ACIXmou_C2a : -----QADWLLRNIIIPYHVAEQLKVS----- : 1047
ACIIrat_C2a : -----LNRVLLENVLPAHVAEHFLARSLKN----- : 874
ACVrat_C2a : -----YNRLLHNILPKDVAAHFLARERRN----- : 965
ACVrat_C2a : -----YNRLLHNILPKDVAAHFLARERRN----- : 1060
GCSbet1_hum : -----KTDTLLYSVLPSPVANE-LRHKRPVPA----- : 414
pGC_C2a-lik : -----IMSDILSILLPQFIRDRINKAG----- : 249
Drome_C1a : -----KLERLLSVLPQHVAMQ-MKNDILSPVAG----- : 261
ACIbov_C1a : -----KQERLLMSLLPRNVAME-MKEDFLKPPE----- : 290
ACIXmou_C1a : -----LKERMIHSMVPRIIADDLMKQGDEESESVKRHATSSPKNRKKKSSIQ : 376
ACIIrat_C1a : -----QQERLLSLLPAHIAME-MKAEIIQRLOG-----PKAGQM : 271
ACVrat_C1a : -----QQERLLSVLPQHVAME-MKEDINTKKE----- : 361
ACVrat_C1a : -----QQERLLSVLPRHVAMEMKADINAKQE----- : 454
GCSalp1_hum : -----QQLWQG-QVVQA----- : 474
pGC_C1a-lik : -----KYQYLLNYLLPKNVLEE-FFRPNEEK----- : 841

```

```

pAC : ASSGDVDPMLPGKRKWAII-YGFCDIRNFT-DATEVL----QKDVMLFVNNIAEI : 566
RhimeCya1 : -----GGRAAWRQEVV-AMFTDIYDFT-TISEGR---SPEEVVAMLSEYFDL : 502
StiauCyaB : -----VVLVTGKREVT-VLFADIRNFT-GLAESL---PPEQVVGVLNQVLGR : 197
AnaspCyaB1 : -----ALMVGERKEVT-VLFSDIRGYT-TLTENL---GAAEVVSLLNQYFET : 632
BrelICYA : -----GEDDGGTPLPLARA-VGFADIVSYT-SLSRRM---NERTLAQLVQRFQEK : 269
StrcoeCyaA : -----QAGDDEEMVDRRIA-VGFADIVGFT-RLTRRM---EEEEELGELVEAFETT : 222
YeastCyaA : -----LQPEISPTGNLA-MVFTDIKSST-FLWELF----PNAMRTAIKTHNDI : 1698
NeucrCyaA : ---MRLNAEVPPPTGQLS-IVFTDIKNST-QLWENY----PEAMRLAIKLNHEV : 1922
TrybrAC : -----PKELADPVT-LIFTDIESST-AQWATQ---PELMPDAVATHHSM : 299
DicdiCyaG : -----VVAERSNNAC-VFFLDIAGFT-RFSSIH---SPEQVIQVLIKIFNS : 427
Drome_C2a : -----NMELYHQSYAKVG-VIFASVPNFN-EFYTEMDSGSDQGLECLRLLEIAD : 998
ACIbov_C2a : -----MDLYYQSYSQVG-VMFASIPNFN-DFYIELDGNMGMVECLRLLEIAD : 906
ACIXmou_C2a : -----QTYSKNHDSGG-VIFASIVNFS-EFYEEN--YEGGKECYRVLNELIGD : 1091
ACIIrat_C2a : -----EELYHQSYDCVC-VMFASIPDFK-EFYTESDVNKEGLECLRLLEIAD : 921
ACVrat_C2a : -----DELYYQSECEVA-VMFASIANFS-EFYVELEANNEGVECLRLLEIAD : 1012
ACVrat_C2a : -----DELYYQSECEVA-VMFASIANFS-EFYVELEANNEGVECLRLLEIAD : 1107
GCSbet1_hum : -----KRYDNVT-ILFSGIVGFN-AFCSKHASGEGAMKIVNLENDLYTR : 456
pGC_C2a-lik : -----QYDIQEDQGMVA-VLFCDIIDFD-QLIKNE---QSNVVDIIDLKLFRR : 291
Drome_C1a : -----QFHRIYIQKHENVV-ILFADIVGFT-VLSSQC---SAQELVRLLELFGFR : 306
ACIbov_C1a : ---RIFHKIYIQRHDNVS-ILFADIVGFT-GLASQC---TAQELVKLLELFGK : 336
ACIXmou_C1a : KAPIAFRPFKMQQIEEVS-ILFADIVGFT-KMSANK---SAHALVGLLELDFGR : 425
ACIIrat_C1a : ENTNNFHNLVYVVRHTNVS-ILYADIVGFT-RLASDC---SPGELVHMLNELFGK : 320
ACVrat_C1a : --DMMFHKIYIQKHDNVS-ILFADIEGFT-SLASQC---TAQELVMTLNEFAR : 408
ACVrat_C1a : --DMMFHKIYIQKHDNVS-ILFADIEGFT-SLASQC---TAQELVMTLNEFAR : 501
GCSalp1_hum : -----KKFSNVT-MLFSDIVGFT-AICSCQ---SPLQVITMLNLYTR : 512
pGC_C1a-lik : -----RVLREQADEVT-LLFADIAGFT-EYSSKV---QPEQVVMRLNLFTE : 883

```

--Block-I-

```

pAC      : VHSMVDR---YQGSA-NKNIIGDAFLLVWK-INDSQWYE-----DGNEIKWS- : 607
RhimeCya1 : FSEVVAA---HDGTI-IQFHGDSVVFAMWN-----APVADTR- : 534
StiauCyaB : LSDAVLT---CGGTL-DKFLGDGLMAVWG-----APVHRTDD : 230
AnaspCyaB1 : MVEAVFN---YEGTL-DKFIGDALMAVFG-----APLPLTEN : 665
BreliCYA : CAEIIISV---GGGRL-VKTIIGDEVLYVAE-----TPQAGAQ- : 301
StrcoeCyaA : SADLVAA---RGGRL-VKTLGDEVLYAAD-----DAGTAAE- : 254
YeastCyaA : MRRQLRI---YGGYE-VKTEGDAFMVAFP-----TPTSGLTW : 1731
NeucrCyaA : MRRQLRM---IGGFE-VKTEGDAFMVSFP-----TATSALLW : 1955
TrybrAC : VRSLIEN---YDCYE-VKTVGDSFMIACK-----SPFAAVQL : 332
DicdiCyaG : MDLLCAK---HGIEK-IKTIIGDAYMATCG-----IFPKCDDI : 460
Drome_C2a : FDELLKEDRFRGIDK-IKTVGSTYMAVVG-----LIPEYKI- : 1033
ACIbov_C2a : FDELMKDFYKLEK-IKTIIGSTYMAAVG-----LAPTAGT- : 941
ACIXmou_C2a : FDELLSKPDYNSIEK-IKTIIGATYMAASG-----LNTAQCC- : 1126
ACIIrat_C2a : FDDLKSKPKFSGVEK-IKTIIGSTYMAATG-----LSAIPSQ- : 956
ACVrat_C2a : FDEIISEERFRQLEK-IKTIIGSTYMAASG-----LNASTYD- : 1047
ACVrat_C2a : FDEIISED RFRQLEK-IKTIIGSTYMAASG-----LNDSTYD- : 1142
GCSbet1_hum : FDTLTDSRKNPFVYK-VETVGD KYMTVSG-----LPEPCIH- : 491
pGC_C2a-lik : FDL L C Q Q ---HEVQK-IETV GKTYMAAAG-----LKIHV SQ- : 323
Drome_C1a : FDQLAHD---NHCLR-IKILGDCY YCVSG-----LPEPRKD- : 338
ACIbov_C1a : FDELATE---NHCRRL-IKILGDCY YCVSG-----LTQPKTD- : 368
ACIXmou_C1a : FDR L C E Q ---TKCEK-I S T L G D C Y Y C V A G -----CPEPRAD- : 457
ACIIrat_C1a : F D Q I A K E ---NECMR-IKILGDCY YCVSG-----L P I S L P N - : 352
ACVrat_C1a : F D K L A A E ---NHCLR-IKILGDCY YCVSG-----L P E A R A D - : 440
ACVrat_C1a : F D K L A A E ---NHCLR-IKILGDCY YCVSG-----L P E A R A D - : 533
GCSalp1_hum : F D Q Q C G E ---LDVYK-VETI G D A Y C V A G G -----L H K E S D T - : 544
pGC_C1a-lik : F D K N S L L ---HNVFK-L Y T I G D C Y V V M G M - V D Y G K G -----I Q R N P S Q - : 921
---Block-II---

```

```

pAC      : --NLTFINQLADC---ALIAFMKIYAKINREP K I L E Y R N D E R L S Q R L P G Y ---- : 652
RhimeCya1 : --HAEH-----ACRCALAVEERLEAFNSAQRASGLP----- : 563
StiauCyaB : ALRALQ-----AAKMMMTAMVELRQAAQAEWAANERLGRPL---- : 266
AnaspCyaB1 : --HAWQ-----AVQSALDMRQRLEKFNQRRIIQPOP----- : 694
BreliCYA : --IALS-----LSRELAKDEL----- : 315
StrcoeCyaA : --IALL-----LVETMAHDET----- : 268
YeastCyaA : C-LSVQ-----LKL L D A Q W P E E I T S V Q D G C Q V T D R N G N I I Y Q ----- : 1767
NeucrCyaA : C-FAVQ-----MKLLTVDWPPEVLSNSSCQPIYDRN N N L I T R ----- : 1991
TrybrAC : A-QELQ-----LRFLRLDWGTTVFDEFYREFEERHAEEGDGKYKPP TAR : 375
DicdiCyaG : R-HNTY-----KMLGFAM-DVLEFIPKEMS FHL----- : 486
Drome_C2a : --QPNDPNSVRRHMTA-LIEYVKAMRHS L Q E I N S H S Y N ----- : 1068
ACIbov_C2a : --KAKKCISSHLST---LADF A I E M F D V L D E I N Y Q S Y N ----- : 974
ACIXmou_C2a : --EGGHPQEHLRI---LFEFAKEMMRVDDFN N N M L W F ----- : 1159
ACIIrat_C2a : --EHAQEPERQYMHIGTMVEFAYALVGK L D A I N K H S F N ----- : 992
ACVrat_C2a : --QVGR-----SHITALADYAMRLMEQMKHINEHSFN----- : 1077
ACVrat_C2a : --KAGK-----THIKALADFAMK L M D Q M K Y I N E H S F N ----- : 1172
GCSbet1_hum : --HARS-----I C H L A L D M M E I A G Q V Q V D G E S ----- : 516
pGC_C2a-lik : --KSNP-----V N K V I S L A L D M K R Y V M S N E ----- : 346
Drome_C1a : --HAKC-----A V E M G L D M I D A I A T V V E A T D V ----- : 363
ACIbov_C1a : --HAHC-----C V E M G L D M I D T I T S V A E A T E V ----- : 393
ACIXmou_C1a : --HAYC-----C I E M G L G M I K A I E Q F C Q E K K E ----- : 482
ACIIrat_C1a : --HAKN-----C V K M G L D M C E A I K K V R D A T G V ----- : 377
ACVrat_C1a : --HAHC-----C V E M G V D M I E A I S L V R E V T G V ----- : 465
ACVrat_C1a : --HAHC-----C V E M G M D M I E A I S S V R E V T G V ----- : 558
GCSalp1_hum : --HAVQ-----I A L M A L K M M E L S D E V M S P H G E ----- : 569
pGC_C1a-lik : --EAVN-----V V R M G F A M I D A I R R V R A H I N H P ----- : 947

```

pAC : -----KV-KMGFGLHIGWGIEGAIG-SEFKID-ASYLSPNVNMAARLE- : 692
 RhimeCya1 : -----EF-RTRFGIHTGTAVVGSVG-AKERLQ-YTAMGDTVNVASRLE- : 603
 StiauCyaB : -----VL-ELGIGINSGLAVAGNIG-GSMRTE-YTCIGDAVNVAARLC- : 306
 AnaspCyaB1 : -----QI-KIGIGISSGEVVSGNIG-SHKRMD-YTVIGDGVNLSRLE- : 734
 BreliCYA : -----FP-QTRGAVVWGRLLSRLG-----DIYGPTVNMARLT- : 347
 StrcoeCyaA : -----MP-ELRVGIAFGTVTTRMG-----DVFGTTVNLSRLE- : 300
 YeastCyaA : -----GL-SVRMGIHWGCPVPELDL-V--TQR-MDYLGPMVNKAARVQ- : 1805
 NeucrCyaA : -----GL-SVRMGAHWGEPLAERDP-V--TRR-MDYYGPMVNKASRIS- : 2029
 TrybrAC : LDPEVYRQLWNGL-RVRVGIHTGLCDIRYDE-V--TKG-YDYYGQTANTAARTE- : 424
 DicdiCyaG : -----GL-QVRVGIHCGPVISGVIS-GYAKPH-FDVWGDVNVASRME- : 526
 Drome_C2a : -----NF-MLRVGINIGPVVAGVIG-AR-KPQ-YDIWGTVNVASRMD- : 1107
 ACIbov_C2a : -----DF-MLRVGINIGPVVAGVIG-AR-RPQ-YDIWGTVNVASRMD- : 1013
 ACIXmou_C2a : -----NF-KLRVGFNHGPLTAGVIG-TT-KLL-YDIWGTVNVASRMD- : 1198
 ACIIrat_C2a : -----DF-KLRVGINHGPVIAGVIG-AQ-KPQ-YDIWGTVNVASRMD- : 1031
 ACVIrat_C2a : -----NF-QMKIGLNMGPVVAGVIG-AR-KPQ-YDIWGTVNVSSRMD- : 1116
 ACVrat_C2a : -----NF-QMKIGLNIQPVVAGVIG-AR-KPQ-YDIWGTVNVASRMD- : 1211
 GCSbet1_hum : -----V-QITIGIHTGEVVTVGIG-QR-MPR-YCLFGNTVNLTSRTE- : 554
 pGC_C2a-lik : -----TF-QIKIGIHYGNVIAGVIG-HH-KPQ-FSLIGDTINTASRIC- : 385
 Drome_C1a : -----IL-NMRVGIHTGRVLCGVLG-LR-KWQ-FDVWSNDVTLANHME- : 402
 ACIbov_C1a : -----DL-NMRVGLHTGRVLCGVLG-LR-KWQ-YDVWSNDVTLANVME- : 432
 ACIXmou_C1a : -----MV-NMRVGVHTGTVLCGILG-MR-RFK-FDVWSNDVNLANLME- : 521
 ACIIrat_C1a : -----DI-NMRVGVHSGNVLCGVIG-LQ-KWQ-YDVWSHDVTLANHME- : 416
 ACVIrat_C1a : -----NV-NMRVGIHSGRVHCGVIG-LR-KWQ-FDVWSNDVTLANHME- : 504
 ACVrat_C1a : -----NV-NMRVGIHSGRVHCGVIG-LR-KWQ-FDVWSNDVTLANHME- : 597
 GCSalp1_hum : -----PI-KMRIGLHSGSVFAGVVG-VK-MPR-YCLFGNNVTLANKFE- : 608
 pGC_C1a-lik : -----TL-DMRIGVHTGSIIGGVIG-TE-LVR-YDIYGPVTLANKME- : 986
 -----Block-III-----

pAC : AATKQYGVAVLISSELHQYFSNEVKKY----TRQIDKVTVKG : 730
 RhimeCya1 : GMNKDYGTSLASGAVVAQCKDMVKFR----PLGTAKAKGRS : 641
 StiauCyaB : ALAGPGETLAGERTRELVSH-REMPFE----DLPPVRLKKGKQ : 343
 AnaspCyaB1 : TVTKEYGCDIILSEFTYQLCSDRIWVR----QLDKIRVKKGK : 772
 BreliCYA : SLAEPGTVLTDAITANTLRNDARFVLT----AQEITAVRGFG : 385
 StrcoeCyaA : SIAPKDAVLVDTAFABEELIRTRDAPAS----EAAAAEAAAA : 338
 YeastCyaA : GVADGGQIAMSSDFYSE----FNKIMK----YHERV-VKGKE : 1838
 NeucrCyaA : AVADGGQITASSDFITEI----HRCLET----YKESVDVDEDS : 2064
 TrybrAC : SVNGGQVLMTCETYHSLSTAERSQFD----VTPLGGVPLRG : 462
 DicdiCyaG : STGIAGQIHVSDRVYQLGKE-DFNFSE----RCDI IHVKGKG : 563
 Drome_C2a : STGVPGYSQVTQEVVDSL VG-SHF EFR----CRGTIKVKGKG : 1144
 ACIbov_C2a : STGVQGRIQVTEEVHRLLR-GSYRFV----CRGKVSVKGKG : 1050
 ACIXmou_C2a : TTGVECRIQVSEESYRVLSK-MGYDFD----YRGTVNVKKGK : 1235
 ACIIrat_C2a : STGVLDKIQVTEETSLILQT-LGYTCT----CRGI INVKGKG : 1068
 ACVIrat_C2a : STGVPDRIQVTTDLYQVLA A-KGYQLE----CRGVVKVKGKG : 1153
 ACVrat_C2a : STGVPDRIQVTTDMYQVLA A-NTYQLE----CRGVVKVKGKG : 1248
 GCSbet1_hum : TTGEKGGKINVSEYTYRCLMSPENSDPQFHLEHRGPVSMKGGK : 596
 pGC_C2a-lik : STAESWDVAISEQAYRQTNK-YELVYV----QRDVV-AKGKG : 421
 Drome_C1a : SGGEPGRVHVTRATLDSLS--GEYEVE----AGHGDERSSY- : 437
 ACIbov_C1a : AAGLPGKVHITKTTLACLN--GDYEVE----PGHGHERNSF- : 467
 ACIXmou_C1a : QLG VAGKVHISEATAKYLD--DRYEME----DGRVIERLGQS : 557
 ACIIrat_C1a : AGGVPGRVHISSVTLEHLN--GAYKVE----EGDGEIRD PY- : 451
 ACVIrat_C1a : AGGRAGRIHITRATLQYLN--GDYEVE----PGRGGERNGY- : 539
 ACVrat_C1a : AGGKAGRIHITKATLNYLN--GDYEVE----PGCGGERNAYL : 633
 GCSalp1_hum : SCSVPRKINVSPTTYRLLKDCPGFVFT----PRSREELPPNF : 646
 pGC_C1a-lik : SKGAKGFVQVSQETKDI IEREF PDLFR----FEYKQSIEFES : 1024

7.2.2 Alignment der Klasse III-ACn vom cyanobakteriellen Typ

↓ Beginn katal.Domäne

```
pAC      : GDVDPMLPGKRKWAIIYGFCDIRNFTDATEVVLQK-DVMLFVNNIAEIVHSMVDRYQGS : 576
AnaspCyaB1: GEDALM-VGERKEVTVLFSDIRGYTTLTENLGAAEVVSLLNQYFETMVEAVFNYEGT : 642
AnaspCayB2: -DDAKLG-GDRKEVSIILFSDIRGYTTLTENLEAAEVVSMLENYFESMVEAVFKHKGT : 642
SiplCyaC  : GDLTDLRPEPRLITILFSDIVGFTRMSNALQSQGAELLLNEYLGEMTRAVFENQGT :1053
AnaspCyaA : -SGLKLG-GERRKVTLFSDLRGFSAMSEQLSPEQVVQILNLYLGVMTDVINQYKGT : 484
AnacyCyaA : -ENIEVGAASRRMTILFCDIRGYTSMSEAMEPIEIFRFLNDYLACMGKAIDEAGGF : 361
TropaAC   : -GELALG-GERKTATIFFSDVRSFTEMSEKLPPEDVVEFLNEYMSCMVDCIEQTGVV : 434
StiauCyaA : -DRSETS-PELREVTLLFADIRDFTSLSERLRPEQVVTLLENYYGRMVEVVFRRHGGT : 270
StiauCyaB : -DTVVLT-GEKREVTVLFADIRNFTGLAESLPPEQVVGVLNQVLRGRLSDAVLTCGGT : 207
SiplAC1   : --DVNLGDYTEQEMSIMFSDIRDFTSISERISPODNFNLIINAYLSRMAPLINEHYGF : 297
RhimeCya1 : -----MFTDIYDFTTISEGRSPEEVVAMLSEYFDLSEVVAHDGT : 513
SynspAC   : -DTQTNVLHERRLITVLVADMRNFTGMAQQVEEELLSMLIGNWFRQAGHILREAGSW : 173
--Block-I-
```

```
pAC      : ANKNIGDAFLLVWKINDSQWYED--GNEIKWSNLTFINQLADCALIAFMKIYAKINR : 632
AnaspCyaB1: LDKFIGDALMAVF-----GAPLPLTENH--AWQAVQSALDMRQRLKEFN- : 685
AnaspCayB2: LDKYIGDAIMAVF-----GSPLPL-EEH--AWMAVKTSIEMRHRLQEFN- : 684
SiplCyaC  : VDKFVGDAIMALY-----GAPEEMSPSE-QVRRAIATARQMLVALEKLN- :1097
AnaspCyaA : INEFIGDGIFIMF-----GAPICRPD---DSQRAIACAIAAMQRAMQQVN- : 526
AnacyCyaA : IDKYIGDAIMALF-----DDG-----NTDCALHAAIILMQQALDKFN- : 398
TropaAC   : VDKFIGDAIMAIW-----GAPVSLGSARLDALQSMKAVFLMRESLIQLN- : 479
StiauCyaA : LDKFIGDALMVYF-----GAPIAD-PAH--ARRGVQCALDMVQELTVN- : 312
StiauCyaB : LDKFLGDGLMAVW-----GAPVHRTD---DALRALQAAKMMMTAMVELR- : 249
SiplAC1   : IDKYIGDGIMALF-----GRSP-----DD-AVQAAISMLSSLEKEYN- : 333
RhimeCya1 : IIQFHGDSVFAMW-----NAPVA-DTRH--AEHACRCALAVEERLEAFN- : 554
SynspAC   : VDKYIGDAVMAIW-----FHGYNEATPAEIIQILHAVNRLQAMTA----- : 214
--Block-II--
```

```
pAC      : EPKILEYRNDERLSQRLPGYKVKMGFGLHICWGIEGATGSEF-KIDASYSNPNVMA : 688
AnaspCyaB1: QRRIIQ-----PQPQIKIGIGISSGEVVSIGNIGSHK-RMDYTVIGDGVNLS : 730
AnaspCayB2: QKRYAA-----NKPRINIGIGINSDTVISIGNIGSSK-RMEFTAIIGDGVNIG : 729
SiplCyaC  : QGWQER-----GLVGRNEVPPVFRFCGIHQGMVAVGLFGSQ-ERSDFTAIIGPSVNI :1148
AnaspCyaA : AKTHQM-----NLPQLEMIGIGINTGEVVACNIGSQK-RAQYTVIGSHVNL : 571
AnacyCyaA : DERSMQ-----TGKTGLPRISVIGIHRGTVVVMGTVG-FTSRIDSTVIGDAVNVA : 447
TropaAC   : EKRIVAC-----SKPRIGIGCCVNTGSCVAGQIGSSK-RMEYTVIGDAVNVA : 524
StiauCyaA : ALRSAR-----GEPCLRIGVGVHTGPAVLCNIGSATRRLEYSATIGDVTNVA : 358
StiauCyaB : QAAQAE---WAANERLGRPLVLELIGIGINSLAVAGNIGGSM-RTEYTCIGDAVNVA : 302
SiplAC1   : KLRNES-----GYIPLKIGIGINTGKLLIGTVG-YHNHIEGTVIGSDAVNVA : 378
RhimeCya1 : SAQRAS-----GLPEFRTRFGIHTGTAVVGSVG-AKERLQYTAIGDVTNVA : 599
SynspAC   : -----KLNQKYELPFPRLRIGTGINTGYAMVGNIGS-GDHPDYTAIGDVTNVA : 260
--Block-III----- --Block-IV-
```

Ende katal.Domäne ↓

```
pAC      : SRLEAATKQYGVAVLISSELHQYFSNEVKKYTRQIDK-VTVKGSVKPIGLFTVEMEA : 744
AnaspCyaB1: PRLETVTKEYGCDIILSEFTYQL--CSDRIWVRQLDK-IRVKGKHQAVNIYELIS-- : 782
AnaspCayB2: SRLESVSKQYGCDIILSDNTFKP--CQENIWARELDF-IRVKGGRNEPVSIIYELIGL- : 782
SiplCyaC  : ARLQEATAP--NSIMVSAMVAQY--VPDEEII----- :1176
AnaspCyaA : ARIETYTV--GGQILISENTRQD--ANTDLQIAGQMQ-TEPKGIKEPTIYIETSGIG : 623
AnacyCyaA : SRIEGLTKQYGCNIIITESVVRNLSCPESFSLRLIDKSVKVKGKDEAISIYEVKA-- : 502
TropaAC   : SRIEALNKPFGTDFLISENTYEL--VKDMLIVEKMPPIITVKGKREPLNVYAA---- : 574
StiauCyaA : SRIESLTKTRDVPILASRATREQ--AGDTFLWNEMAP-ASVPGKSQPVALFTPRN-- : 410
StiauCyaB : ARLCALAGP--GEILAGERTRELVS----- : 325
SiplAC1   : SRIEQLTKVYRVPLIESTFVVKLKHPhNYGIRLVDK-VQVKGSRSEIVKVYEVFNHD : 434
RhimeCya1 : SRLEGMNKDYGTSVLASGAVVAQ--CKDMVKFRPLGT-AKAKGRSTALDIYEVVG-- : 651
SynspAC   : FRLESATKQAHFDLAMEKTFSYLQDLQWASATVQQHTIELKGYTNPITIIYGLPFAT : 317
-----
```

```

pAC      : DDLPPSKQDYPQEEKQQVMYEKKQIF-----LQQLESQDFNAELYIKRNKDLGL : 793
AnaspCyaB1 : ---DRSTPLDDNT----- : 792
AnaspCayB2 : ----RSVPIASEK----- : 791
SiplCyaC  : ----- :
AnaspCyaA : GAY---NLSLPEDNDLMVKLQSPVP-----VEYQVLQKQAVGVEVFRGEL : 665
AnacyCyaA : ----- :
TropaAC   : -----INLKGHDGPGQTLDEL----- : 589
StiauCyaA : ----- :
StiauCyaB : ----- :
SiplAC1   : F-----FPELSAKLSNL--SVF---SEGVSLYHQQNFQEAFFKA----- : 467
RhimeCya1 : ----- :
SynspAC   : LGTLLDHTSLEDTPASEGP----- : 337

```

↪ TPRL

←

```

pAC      : ITKNVNQEFLLHQFGQGFQGYLLGNWKEAHMLFEKAKQIRPNDGPISLTFNVMGETNF : 850
AnaspCyaB1 : -----QEFLFHYHNGRTAYLVRDFTQAIACFNSAKHIRPTDQAVNIHLERAYNYQQ : 843
AnaspCayB2 : -----LQVIEHYHKGREYYLQRFSLARAEFANVLAVDKHKDAAMLHLLRCQHWLQ : 842
SiplCyaC  : -----KREFLEL--KGIDEPVMTCVI-----NPNMLNQ----- : 1200
AnaspCyaA : VSVSEKKALLHSPHTLEKLANLKLKLLHKPELATADIYAKVMKQSDADLFVIRFTNI : 722
AnacyCyaA : ----- :
TropaAC   : -----RALLS-----IEKPGLSADPDFEE--KKCE----VI----- : 614
StiauCyaA : -----RTPA--QQAGAPAAA----- : 421
StiauCyaB : -----HREMPFEDLPPVRLKKGKQQPVPLYR----- : 345
SiplAC1   : -----FQDCYHQNPNDSSVVQVYLRRLKGD-----LLR----- : 491
RhimeCya1 : -----VVRAVNTTEAGTAA----- : 663
SynspAC   : ----- :

```

```

pAC      : --KAPSDWK-GYRELTEK : 865
AnaspCyaB1 : T-PPPPQWD-GVWTIFTK : 859
AnaspCayB2 : SPPTDSEWDEGVWTFQEK : 860
SiplCyaC  : ----- : 1202
AnaspCyaA : PPQAIASLNSLHQ----- : 735
AnacyCyaA : ----- :
TropaAC   : ----- :
StiauCyaA : ----- : 423
StiauCyaB : ----- : 350
SiplAC1   : ----- : 494
RhimeCya1 : ----- : 665
SynspAC   : ----- :

```

7.2.3 K⁺-Kanal Alignment

```

pAC      : ----- : -
shaker   : MAAVAGL-----YGLGEDRQHRKKQQ----- : 21
Kv1.1-mou : MTVM-----SGENADEAS : 13
Xenlae   : MTVI-----AGENMDETS : 13
Frag1-rab : ----- : -
Kv1.2-mou : MTVA-----TGDPVDEAA : 13
Frag2-rab : ----- : -
Frag4-rab : ----- : -
Kv1.4-mou : MEVAMVSAESSGCNSHMPYGYAAQARARERERLAHSRAAAAAAATAAVEGTGGSG : 58
KCN1-hum  : MDV-----CGWK-----EMEVALVNFDNSDEIQ : 23
KCN1-rab  : --IL-----VSDNTTTHET : 11
SKV1.1    : MSTLSGTAST----- : 10
Kv2.1-hum : MTKHGSRSTSSLPPEPME----- : 18
Kv3.1-hum : MGQGDE----- : 6
Kv4.1-hum : MAAGLATWLPFARAAAVGWLPLAQOPLPPAPGVKASR----- : 37

```

Anhang

pAC : ----- : -
shaker : -----QQQQHQKEQLEQKEEQKKIAERKLQLREQQLQR-NSLDGYGS--- : 62
Kv1.1-mou: TAPGHPQD--GSYPRQADHDDH----- : 33
Xenlae : VLPGHPQD---SYHP--DQDDH----- : 30
Frag1-rab: ----- : -
Kv1.2-mou: ALPGHPQD--TYDPEADH----- : 29
Frag2-rab: ----- : -
Frag4-rab: ----- : -
Kv1.4-mou: GGPHHHHQTRGAYSSHDPQGSRGRSRRRRRQRTEKKKLHHRQSSFPHCSDLMPGSEEK : 116
KCN1-hum : EEPGYATD---FDSTSPKGRPGG-----SSF-----SNGK : 50
KCN1-rab : TFSKLPGD--YTDPPGPEPVALN----- : 32
SKV1.1 : -----LLLPHGTLAYCNR-----K : 24
Kv2.1-hum: ----- : -
Kv3.1-hum: ----- : -
Kv4.1-hum: ----- : -

pAC : ----- : -
shaker : -LPKLSSQDEEG-----GAGHGF-----GGGPQHFEPIPHDH : 93
Kv1.1-mou: ----- : -
Xenlae : ----- : -
Frag1-rab: ----- : -
Kv1.2-mou: ----- : -
Frag2-rab: ----- : -
Frag4-rab: ----- : -
Kv1.4-mou: ILRELSEEEEEDEEEEEEEEEEGRFYYSEEDHGDGCSYTDLLPQEDGGGGYSSVRYS- : 173
KCN1-hum : ILISESTNHETA-----FSKL-PGDYADPPGPEPVLNE : 83
KCN1-rab : ----- : -
SKV1.1 : INQNLEEETGIDQLTSDE-----IFRPEIE----- : 49
Kv2.1-hum: -----IVRSK : 23
Kv3.1-hum: ----- : -
Kv4.1-hum: ----- : -

pAC : ----- : -
shaker : DFCERVVINVSGLRFETQLRRTLNQFPDITLLGD-----PARRLRYFDPLRNEYFF : 142
Kv1.1-mou: ECCERVVINISGLRFETQLKTLAQFPNTLLGN-----PKKRMRYFDPLRNEYFF : 82
Xenlae : ECCERVVINVSGLRFETQLKTLAQFPSTLLGN-----PKKRMRYFDPLRNEYFF : 79
Frag1-rab: ----- : -
Kv1.2-mou: ECCERVVINISGLRFETQLKTLAQFPETLLGD-----PKKRMRYFDPLRNEYFF : 78
Frag2-rab: ----- : -
Frag4-rab: ----- : -
Kv1.4-mou: DCCERVVINVSGLRFETQMKTLAQFPETLLGD-----PEKRTQYFDPLRNEYFF : 222
KCN1-hum : GN-QRVIINIAGLRFETQLRRTLSQFPETLLGD-----REKRMQFFDSMRNEYFF : 131
KCN1-rab : EGNQRVIINIAGLRFETQLRRTLNQFPETLLGA-----REKRMQFFDSMRNEYFF : 81
SKV1.1 : --SERLVINVSGLRFETQAQTVNQFPDITLLGN-----PNKRNHYYDPLRNEYFF : 96
Kv2.1-hum: ACSRRVRLNVGGLAHEVLWRTLDRLPRTLRGLKLRDCNTHDSLLEVCDDYSLDDNEYFF : 81
Kv3.1-hum: --SERIVINVGTRHQTYRSTLRTPGTRILAWLAEPDAHSH-----FDYDPRADFF : 57
Kv4.1-hum: -GDEVLVVNVSGRRFETWKNTLDRYPTLLGS-----SEK-EFFYDADSGEYFF : 84

pAC : -----MSEAQVNPEVDNQSV-IS : 17
shaker : DRSRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNPLDVFSEEIKFYELGDQAINKFREDEGFI-KE : 199
Kv1.1-mou: DRNRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNPLDMFSEEIKFYELGEEAMEKFREDEGFI-KE : 139
Xenlae : DRNRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNPLDMFSEEIKFYELGEEAMEKFREDEGFV-KE : 136
Frag1-rab: --NRPSFDAILYYYQSGGRLKRPVNVFDFIFTEEVKQFYQLGEEALLKFREDEGFV-RE : 55
Kv1.2-mou: DRNRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNPLDIFSEEIRFYELGEEAMEMFREDEGYI-KE : 135
Frag2-rab: --NRPSFDAILYYYLSSGRL-PPVNVPLDIFSEEIRFYELGEEAMEMFREDEGYI-KE : 54
Frag4-rab: --NRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNPLDMFSEEIKFYELGEEAMEKFREDEGFI-KE : 55
Kv1.4-mou: DRNRPSFDAILYYYQSGGRLKRPVNVFDFIFTEEVKQFYQLGEEALLKFREDEGFV-RE : 279
KCN1-hum : DRNRPSFDGILYYYQSGGKIRRPANVPIDIFADEISFYELGSEAMDQFREDEGFI-KD : 188
KCN1-rab : DRNRPSFDGILYYYQSGGKIRRPANVPIDVFADAEISFYELAVRPWTSSGKTKASS-KT : 138
SKV1.1 : DRNRSSFDGILYFYQSGGRLRRPVNVPIDVFNEEIKFYELGEEALAKYREEEGFI-KE : 153
Kv2.1-hum: DRHPGAFSTILNRYRTG-RLHMEEMCALSFQELDYWGIDEIYLESCCQARYHQ-KK : 137
Kv3.1-hum: DRHPGVFAHILNRYRTG-KLHCPADVCGPLYEEELAFWGIDEVDVEPCCWMTYRQHRD : 114
Kv4.1-hum: DRDPDMFRHVLNRYRTG-RLHCPROECTQAFDEELAFYGLVPEILVGDCCLEFYRDRKK : 141

pAC : ED-----SNNEDVD-V : 27
shaker : EE-----RPLPDNE-K : 209
Kv1.1-mou: EE-----RPLPEKE-Y : 149
Xenlae : EE-----RPLPDKE-F : 146
Frag1-rab: EED-----RALPENE-F : 66
Kv1.2-mou: EE-----RPLPENE-F : 145
Frag2-rab: EE-----RPLPENE-F : 64
Frag4-rab: EE-----RPLPEKE-Y : 65
Kv1.4-mou: EE-----DRALPENE-F : 290
KCN1-hum : PE-----TLLPTND-I : 198
KCN1-rab : LR-----IPLPTND-F : 148
SKV1.1 : EP-----KILPRNR-F : 163
Kv2.1-hum: EQ-----MNEELKRE-A : 148
Kv3.1-hum: AEEALDSFGGAPLDNSADDADADGPGDSGDGEDELEMTKRLALSDSPDGRPGGFWRW : 172
Kv4.1-hum: EN-----AERLAEDEEAEQAGD-----GPALPAGSSL : 168

-----pAC-TM1-----
pAC : FGQDQEIDKFPLLTSS---ILDSSWSQ-ILVNLITTYALFG----- : 63
shaker : QRKVWLLFEYPSSQA--ARVVAIISVVFVILLSIVIFCLETLPPEFK----- : 253
Kv1.1-mou: QRQVWLLFEYPSSGP--ARVIAIVSVMVILISIVIFCLETLPPELKDDK----DFTG- : 200
Xenlae : QRQVWLLFEFPSSGP--ARIIAIVSVMVILISIVIFCLETLPPELKDER----IFS-- : 196
Frag1-rab: KKQIWLLFEYPSSSA--ARAVAVSVLVVILISIVIFCLETLP----- : 107
Kv1.2-mou: QRQVWLLFEYPSSGP--ARIIAIVSVMVILISIVSFCLETLPFRDENE---DMHGG : 198
Frag2-rab: QRQVWLLSEYPSSGP--ARIIAIVSVMVILISIVSFCLETLPFRDENE---DMHGS : 117
Frag4-rab: QRQVWLLFEYPSSGP--ARVIAIVSVMVILISIVIFCLETLPPELKDDK----DLAG- : 116
Kv1.4-mou: KKQIWLLFEYPSSSP--ARGIAIVSVLVVILISIVIFCLETLPPEFRDDRDLIMALSAG : 346
KCN1-hum : HRQFWLLFEYPSSSA--ARAVAVSVLVVVISITIFCLETLPPEFRDREL----- : 247
KCN1-rab : HRQFWLLFEYPVKGAPHAARTVAVSVLVVVISITIFCLVTLARVPGGQ----GAEGS : 202
SKV1.1 : QRKVWLLFEYPSSLA--ARILAIISVVFVILLSIIIFCLETLPFRFRYKIINNLNSTL : 219
Kv2.1-hum: ETLREREGEEFDNTCC--AEKRKKLWDLLEKPNSSVAAKILAIISIM----FIVLSTI : 200
Kv3.1-hum: QPRIWALFEDPYSSRY--ARYVAFASLFFILVSIITFCLETFHERFN----PIVNKTE : 223
Kv4.1-hum: RQRLWRAFENPHTSTA--ALVFYYVTIGFFIAVSVIANVETIPCRGSA----- : 214

-----S1-----

```

-----pAC-TM2-----
pAC      : -----DDIRIIAFDKR--ADDGFDVITIIICMIIIFSIEIIIASLV---RTDYENS : 107
shaker   : -HYKVFNTTTNGTKIEEDEVDPDITDPFFLIETLCIIWFTEFELTVRFLACPNKLNFCRD : 310
Kv1.1-mou: --T--IHRIDNTTVIYTSNI--FTDPFFIVETLCIIWFSFELVVRFFACPSKTDFEFKN : 252
Xenlae   : -----RRVNNSTVFYKSNI--FTDPFFVIVETLCIIWFSFELVVRFFACPSKPEEFKN : 246
Frag1-rab: -----DNTTVVYSANI--FTDPFFIVETLCIIWFSFELVVRFFACPSKTDFEFKN : 154
Kv1.2-mou: GVT--FHTYSNSTIGYQQSTS--FTDPFFIVETLCIIWFSFELVVRFFACPSKAGFFTN : 253
Frag2-rab: GMT--FHTYSNSTAGYQQSTS--FTDPFFIVETLCIIWFSFELVVRFFACPSKAGFFTN : 172
Frag4-rab: --T--FRRVDNTTVVYSANI--FTDPFFIVETLCIIWFSFELVVRFFACPSKTDFEFKN : 168
Kv1.4-mou: GHSRLLNDSAPHLENSGHTI--FNDPFFIVETVCIWVWFSEFVVRFFACPSQALEFFKN : 403
KCN1-hum : KVVSRPNLNMSKTV-LSQTM--FTDPFFMVESTCIVWTFEELVLRVVCPSKTDFEFKN : 302
KCN1-rab : SET--PASATNKTA-FPQTM--FTDPFFMVESTCIVWTFLELVRVVCPSKTAFYRN : 255
SKV1.1   : CYEE-LTFEEDDLPT-----IDQPFPIIETFCIVWFSCELLVRFASSEPKKFEFFKV : 269
Kv2.1-hum: ALSLNTLPELQSLDEFGQST--DNPQLAHVEAVCIAWFTMEYLLRHLSSPKKWKFFKG : 256
Kv3.1-hum: IENV--RNGTQVRYREAET--EAFLTYIEGVCVWVTFEFLMRVIFCPNKVEEFTKN : 276
Kv4.1-hum: -----RRSSREQPCGER---FPQAFFCMDTACVLIIFTGEYLLRIFAAPSRCREFLRS : 262
-----S2-----

```

```

--pAC-TM3----- -pAC-Sp
pAC      : FFFWLDIISTVVSQILDITTSFNIAVGLQGSVAAKSASQLSQA--NKASKTSSKAIIRVVR : 163
shaker   : VMNVIDIIAIIIPYFITLAIIVVAEEEDTLNLPKAPVSPQDKSSNQAMSLAILRVIIRLVR : 368
Kv1.1-mou: IMNFIDIVAIIPYFITLGTETIAEQEG-----NQGGEQATSLAILRVIIRLVR : 298
Xenlae   : IMNFIDIVAIIPYFITLGTETIAEQEG-----PQKGEQATSLAILRVIIRLVR : 292
Frag1-rab: IMNFIDIVAIIPYFITLGTETIAEQEG-----NQGGEQATSLAILRVIIRLVR : 200
Kv1.2-mou: IMNIIIDIVAIIPYFITLGTETIAEKPED-----AQQGQQAMSLAILRVIIRLVR : 300
Frag2-rab: IMNIIIDIVAIIPYFITLGTETIAEKPED-----AQQGQQAMSLAILRVIIRLVR : 219
Frag4-rab: IMNIIIDIIISIIIPYLATLITELVQEDG-----AQR-QQNMSLAILRIIRLVR : 213
Kv1.4-mou: IMNIIIDIVSILPYFITLGTDLAQQQGG-----GNGQQQQAMSFALIRIIRLVR : 451
KCN1-hum : IMNIIIDIIISIIIPYFATLITELVQETEP-----SAQQNMSLAILRIIRLVR : 347
KCN1-rab : IMNIIIDIIISIIIPYFATLITELVQETEP-----SAQQNMSLAILRIIRLVR : 300
SKV1.1   : LMNVIDVVSIIIPYFITLGAVIDDPK-----QINQTTSLAVLRVIIRLVR : 313
Kv2.1-hum: PLNAIDLAILPYVYVIFLTSNKSVM-----LQFQNV-RRVQIFRIMR : 299
Kv3.1-hum: SLNIIIDFVAILPFYLEVGLSGLSSKA-----AKDVLGFLRVVRFVVR : 317
Kv4.1-hum: VMSLIDVVAILPYYIGLLVPKNDDVS-----GAFVTLRVR : 298
-----S3----- -S4-Span

```

```

annungssen.-
pAC      : LVRLIRIVKLYKAASY-SQEAFKRQPIRTQTTKSKATIYPSVYENINNGPVEQENL : 220
shaker   : VFRIFKLSRHSKGLQILGRTLKASMRE----- : 395
Kv1.1-mou: VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRE----- : 325
Xenlae   : VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRE----- : 319
Frag1-rab: VFRIFKLSRHSKGLQIVGQTLKASMRE----- : 227
Kv1.2-mou: VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRE----- : 327
Frag2-rab: VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRE----- : 246
Frag4-rab: VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRE----- : 240
Kv1.4-mou: VFRIFKLSRHSKGLQILGHTLRASMRE----- : 478
KCN1-hum : VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRE----- : 374
KCN1-rab : VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRE----- : 327
SKV1.1   : VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLRASVRE----- : 340
Kv2.1-hum: ILRILKLARHSTGLQSLGFTLRRSYNE----- : 326
Kv3.1-hum: ILRIFKLTRHFVGLRVLGHTLRASVRE----- : 344
Kv4.1-hum: VFRIFKFSRHSQGLRILGYTLKSCASE----- : 325
nungssen.--

```



```

pAC      : NKKENNTREQREGEDNANSQENRENQNMVAKQQQIDNSIPKVQQIRRQSMKEPSQVKAK : 278
shaker   : ----- : -
Kv1.1-mou : ----- : -
Xenlae   : ----- : -
Frag1-rab : ----- : -
Kv1.2-mou : ----- : -
Frag2-rab : ----- : -
Frag4-rab : ----- : -
Kv1.4-mou : ----- : -
KCN1-hum : ----- : -
KCN1-rab : ----- : -
SKV1.1   : ----- : -
Kv2.1-hum : ----- : -
Kv3.1-hum : ----- : -
Kv4.1-hum : ----- : -

```

```

-----pAC-TM5-----
pAC      : EKKE SRVSKRLSDSTTKKVIILIVIIILLIIMPLFSSDYFEPSSYSLAYAAEYVRVVAEI : 336
shaker   : -----LGLLIFFLFIGVV-LFSSAVYFAEAGSENSFFK-SIPDAFW : 434
Kv1.1-mou : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEAEAEAEESHFS-SIPDAFW : 364
Xenlae   : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEAEAEDESHFT-SIPDAFW : 358
Frag1-rab : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEAEAEAEESHFS-S : 260
Kv1.2-mou : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEADERDSQFP-SIPDAFW : 366
Frag2-rab : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEADERDSQFP-S : 279
Frag4-rab : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEVDEPESHFS-S : 273
Kv1.4-mou : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEAEDEPTTHFQ-SIPDAFW : 517
KCN1-hum : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEVDEPESHFS-SIPDGFW : 413
KCN1-rab : -----LGLLIFFLFIGVI-LFSSAVYFAEVDEPESHFS-SIPDGFW : 366
SKV1.1   : -----LGLLVFFLLIICVI-LFSSAVYFAEADADTSLFR-SIPDGFW : 379
Kv2.1-hum : -----LGLLILFLAMGIM-IFSSLVFFAEKDEDDTKFK-SIPASFW : 365
Kv3.1-hum : -----FLLLIIFLALCVL-IFATMIYYAERIGAQPNDP-SASEHTH : 383
Kv4.1-hum : -----LGFLLESITMAII-IFATVMFYAEKGTNKINFT-NIPAAFW : 364
-----S5-----

```

```

pAC      : PNTKLTEINQTIYFVIDQHKSFDTPVGYITNPFTEIENYETPSYQYLRESSKSYFEL : 394
shaker   : WAVVTMTTVGYGDMTPVGWVK----- : 456
Kv1.1-mou : WAVVSMTTVGYGDMYPVTIGGK----- : 386
Xenlae   : WAVVSMTTVGYGDMYPVTIGGK----- : 380
Frag1-rab : ----- : -
Kv1.2-mou : WAVVSMTTVGYGDMVPTTIGGK----- : 388
Frag2-rab : ----- : -
Frag4-rab : ----- : -
Kv1.4-mou : WAVVTMTTVGYGDMKPIITVGGK----- : 539
KCN1-hum : WAVVTMTTVGYGDMCPTTPGGK----- : 435
KCN1-rab : WAVVTMTTVGYGDMCPIITPGGK----- : 388
SKV1.1   : WAVVTMTTVGYGDMRPVTVWVK----- : 401
Kv2.1-hum : WATITMTTVGYGDIYPKTLGK----- : 387
Kv3.1-hum : FKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPQTSWGM----- : 414
Kv4.1-hum : YTIIVTMTTLGYGDMVPSTIAGK----- : 386
-Pore-Loop-----

```

```

-----pAC-TM6-----
pAC      : VDPVLVGLLEYIGDPVILFVSDNSDVESKNSIINIVNTLFFVSAVLLFGAIAFSNDANNV : 452
shaker   : -----IVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNF : 481
Kv1.1-mou: -----IVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNF : 411
Xenlae   : -----IVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNF : 405
Frag1-rab: ----- : -
Kv1.2-mou: -----IVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNF : 413
Frag2-rab: ----- : -
Frag4-rab: ----- : -
Kv1.4-mou: -----IVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNF : 564
KCN1-hum : -----IVGTLCAIAGVLTIALPVPVIVSNF : 460
KCN1-rab : -----IVGTLCAIAGVLTIALPVPVIVSNF : 413
SKV1.1   : -----LIGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNF : 426
Kv2.1-hum: -----IVGGLCCIAGVLTIALPIPIVIVNMF : 412
Kv3.1-hum: -----LVGALCALAGVLTIALPVPVIVNMF : 439
Kv4.1-hum: -----IFGSICSLSGVLTIALPVPVIVSNF : 411
-----S6-----

```

```

-----
pAC      : ALKPIDRMIVKVNLIAKN-----PQLAKEMK--LES DGTQKETTQIENAI I KIGALL : 502
shaker   : NYFYHRETDQEEMQSQNFNHVTSCP YLP GTLGQHMKKS--SLSESSS-----DMMDL D : 532
Kv1.1-mou: NYFYHRETEGEE-QAQLLH--VSSPNLASDSD--LSR---RSSSTIS---KSEYMEIE : 458
Xenlae   : NYFYHRETEGEE-QAQLLH--VSSPNLASNSD--LSR---RSSSAMS---KSEYMEIE : 452
Frag1-rab: ----- : -
Kv1.2-mou: NYFYHRETEGEE-QAQLYQ-VTSCP KIP SSPD--LKKK--RSASTIS---KSDYMEIQ : 462
Frag2-rab: ----- : -
Frag4-rab: ----- : -
Kv1.4-mou: NYFYHRETENEE-QTQLTQNAVSCPYLPSNL--LKKF--RSSTSSSLGDKSEYLEME : 616
KCN1-hum : NYFYHRETENEEKQN-----IPGEIERILNSVGSRMGSTDSL N-KTNGGCST : 506
KCN1-rab : NYFYHRETENEEKQN-----IPGEIDKILNSVGSRMGSTDSL S-KTNGGCSP : 459
SKV1.1   : NYFYHRETESDD-----ISHSISSSL ETD DDDITNKEQHINTKVR SITY : 470
Kv2.1-hum: SEFYKEQKREQEKAIKRREA-----LERAK-RNGSIVSMNMKDAFARSI : 454
Kv3.1-hum: GMYYSLAMAKQKLPK KKKKHI PRPPQLGSPN---YCKSVVNSPHHST---QSDTCPLA : 491
Kv4.1-hum: SRIYHQNRADKRRAQQK VRLARIR-----LAKSGTTNAFLQYKQNG----- : 453

```

```

-pAC-Pore-Loop--
pAC      : ALGFGDAGSAIIGTNMASS- : 521
shaker   : DGVESTP----- : 539
Kv1.1-mou: EDMNNSI----- : 465
Xenlae   : EDLNNSI----- : 459
Frag1-rab: ----- : -
Kv1.2-mou: EGVNNSN----- : 469
Frag2-rab: ----- : -
Frag4-rab: ----- : -
Kv1.4-mou: EGVKESL----- : 623
KCN1-hum : EKSRK----- : 511
KCN1-rab : EKPRK----- : 464
SKV1.1   : NINSSGSSKSI----- : 481
Kv2.1-hum: EMMDIVVEKNG----- : 465
Kv3.1-hum: QEEIILEINRAGRKPLRGMSI : 511
Kv4.1-hum: ----- : -

```

8 Literaturverzeichnis

- (1) Linder, J.U., Engel, P., Reimer, A., Krüger, T., Plattner, H., Schultz, A., Schultz, J.E. *Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in Paramecium, Tetrahymena and Plasmodium*. EMBO J. (1999) 18, 4222-4232.
- (2) Macheiner, H. *Electrophysiology, in Paramecium*, Görtz, H.-D. Editor. 1988, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- (3) Hennessey, T.M. *Ion Currents of Paramecium: Effects of Mutations and Drugs*, in *Evolution of the First Nervous Systems*, Anderson, P.A.V. Editor. 1990, Plenum Press: New York.
- (4) Hinrichsen, R.D., Schultz, J.E. *Paramecium: a model system for the study of excitable cells*. Trends Neurosci. (1988) 11, 27-32.
- (5) Schultz, J.E., Klumpp, S. *Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclases in the ciliary membranes from Paramecium and tetrahymena*. Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. (1984) 17, 275-283.
- (6) Klumpp, S., Kleefeld, G., Schultz, J.E. *Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclase of the excitable ciliary membrane from Paramecium. Dissociation of calmodulin by La³⁺: calmodulin specificity and properties of the reconstituted guanylate cyclase*. J. Biol. Chem. (1983) 258, 12455-12459.
- (7) Schultz, J.E., Guo, Y.L., Kleefeld, G., Völkel, H. *Hyperpolarization- and depolarization-activated Ca²⁺ currents in Paramecium trigger behavioral changes and cGMP formation independently*. J. Membr. Biol. (1997) 156, 251-259.
- (8) Klumpp, S., Gierlich, D., Schultz, J. E. *Adenylate cyclase and guanylate cyclase in the excitable ciliary membrane from Paramecium: Separation and regulation*. FEBS (1984) 171, 95-99.
- (9) Schultz, J.E., Grünemund, R., von Hirschhausen, R., Schönefeld, U. *Ionic regulation of cyclic AMP levels in Paramecium tetraurelia in vivo*. FEBS Lett. (1984) 167, 113-116.
- (10) Richard, E.A., Hinrichsen, R.D., Kung, C. *A single gene mutation that affects a potassium conductance and resting membrane potential in Paramecium*. J. Neurogenet. (1985) 2, 239-252.
- (11) Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R.R., Gilman, A.G. *Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure*. Science (1989) 244, 1558-1564.
- (12) Schultz, J.E., Klumpp, S., Benz, R., Schürhoff-Goeters, W.J., Schmid, A. *Regulation of adenylyl cyclase from Paramecium by an intrinsic potassium conductance*. Science (1992) 255, 600-603.
- (13) Linder, J. *Klonierung einer Adenylatcyclase aus Paramecium*. Dissertation der Universität Tübingen (1997).
- (14) Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G., Sprang, S.R. *Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S*. Science (1997) 278, 1907-1916.
- (15) Zhang, G., Liu, Y., Ruoho, A.E., Hurley, J.H. *Structure of the adenylyl cyclase catalytic core*. Nature (1997) 386, 247-253.

- (16) Tang, W.J., Hurley, J.H. *Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases*. Mol. Pharmacol. (1998) 54, 231-240.
- (17) Sunahara, R.K., Beuve, A., Tesmer, J.J., Sprang, S.R., Garbers, D.L., Gilman, A.G. *Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases*. J. Biol. Chem. (1998) 273, 16332-16338.
- (18) Tucker, C.L., Hurley, J.H., Miller, T.R., Hurley, J.B. *Two amino acid substitutions convert a guanylyl cyclase, RetGC-1, into an adenylyl cyclase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95, 5993-5997.
- (19) Hoffmann, T.R. *Membranständige Guanylatcyclasen aus Paramecium und Tetrahymena: Klonierung und bakterielle Expression der katalytischen Bereiche*. Dissertation der Universität Tübingen (1999).
- (20) Reimer, A. *Funktion der Transmembranbereiche in Nukleotidtriphosphat-Cyclasen mit zweimal sechs Transmembranhelices*. Dissertation der Universität Tübingen (2000).
- (21) Stratagene: *ZAP Express EcoR I/Xho I Vector Cloning Kit*. Instruction Manual (1993).
- (22) Stratagene: *cDNASynthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit and ZAP-cDNA Gigapack II Gold Cloning Kit*. Instruction Manual (1994).
- (23) Stratagene: *Predigested Lambda ZAP II/EcoR I/CIAP Cloning Kit*. Instruction Manual (1993).
- (24) Qiagen: *The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. The QIAexpressionist (1999).
- (25) Harlow, E.L., D. *Protein A (chapter 15)*, in *Antibodies: a laboratory manual*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory. 616-619.
- (26) Harlow, E.L., D. *Antibody purification on protein A columns (low salt)*, in *Antibodies: a laboratory manual*. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory. 310.
- (27) Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Translation of RNA Reticulocyte Lysates*, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (28) Duszenko, M., Kang, X., Böhme, U., Homke, R., Lehner, M. *In vitro translation in a cell-free system from Trypanosoma brucei yields glycosylated and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins*. Eur. J. Biochem. (1999) 266, 789-797.
- (29) Thiele, J., Honer-Schmid, O., Wahl, J., Kleefeld, G., Schultz, J. E. *A New Method for Axenic Mass Cultivation of Paramecium tetraurelia*. J. Protozool. (1980) 27, 118-121.
- (30) Bayer, A. *Proteinphosphatase Typ 2C aus Paramecium tetraurelia: Lokalisation, Isolierung, Teilsequenzierung und Charakterisierung*. Dissertation der Universität Tübingen (1993).
- (31) Schmitt-John, T., Engels, J.W. *Promoter constructions for efficient secretion expression in Streptomyces lividans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1992) 36, 493-498.
- (32) Strohl, W.R. *Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters*. Nucleic Acids Res. (1992) 20, 961-974.
- (33) Altenbuchner, J. *mündliche Absprache mit J. E. Schultz*. (2000).
- (34) Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R. *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J. Gen. Virol. (1977) 36, 59-74.

- (35) *Introduction of DNA into Mammalian Cells (Chapter 9)*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M., Brant, A., Kingston, R.E., Moore, P., Sudman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. Editor. 1992, John Wiley and Sons: New York.
- (36) Gibco BRL Life Technologies: *BAC-TO-BACTM Baculovirus Expression System*. Instruction Manual.
- (37) Gibco BRL Life Technologies: *Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques*. Instruction Manual.
- (38) Invitrogen: *Growth and Maintenance of Insect Cell Lines*. Instruction Manual.
- (39) Engel, P. *Klonierung und Expression einer Guanylatcyclase aus Paramecium tetraurelia*. Dissertation der Universität Tübingen (1999).
- (40) Schlecht, S., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Bessler, W.G. [*Lipopeptides as natural adjuvants for vaccines from Gram-negative bacteria*]. *Naturwissenschaften* (1993) 80, 9-17.
- (41) Freiburg, M. *Organization and Expression of the Nuclear Genome, in Paramecium*, Görtz-H.-D. Editor. 1988, Springer-Verlag: Berlin. 141-154.
- (42) Russell, C.B., Fraga, D., Hinrichsen, R.D. *Extremely short 20-33 nucleotide introns are the standard length in Paramecium tetraurelia*. *Nucleic Acids Res.* (1994) 22, 1221-1225.
- (43) Katayama, M., Ohmori, M. *Isolation and characterization of multiple adenylate cyclase genes from the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120*. *J. Bacteriol.* (1997) 179, 3588-3593.
- (44) Katayama, M., Wada, Y., Ohmori, M. *Molecular cloning of the cyanobacterial adenylate cyclase gene from the filamentous cyanobacterium Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* (1995) 177, 5197.
- (45) Katayama, M., Wada, Y., Ohmori, M. *Molecular cloning of the cyanobacterial adenylate cyclase gene from the filamentous cyanobacterium Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* (1995) 177, 3873-3878.
- (46) Fraser, C.M., Norris, S.J., Weinstock, G.M., White, O., Sutton, G.G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E.K., Clayton, R., Ketchum, K.A., Sodergren, E., Hardham, J.M., McLeod, M.P., Salzberg, S., Peterson, J., Khalak, H., Richardson, D., Howell, J.K., Chidambaram, M., Utterback, T., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Cotton, M.D., Venter, J.C., et al. *Complete genome sequence of Treponema pallidum, the syphilis spirochete*. *Science* (1998) 281, 375-388.
- (47) Coudart-Cavalli, M.P., Sismeiro, O., Danchin, A. *Bifunctional structure of two adenylate cyclases from the myxobacterium Stigmatella aurantiaca*. *Biochimie* (1997) 79, 757-767.
- (48) Yashiro, K., Sakamoto, T., Ohmori, M. *Molecular characterization of an adenylate cyclase gene of the cyanobacterium Spirulina platensis*. *Plant Mol. Biol.* (1996) 31, 175-181.
- (49) Kasahara, M., Yashiro, K., Sakamoto, T., Ohmori, M. *The Spirulina platensis adenylate cyclase gene, cyaC, encodes a novel signal transduction protein*. *Plant Cell Physiol.* (1997) 38, 828-836.
- (50) Beuve, A., Boesten, B., Crasnier, M., Danchin, A., O'Gara, F. *Rhizobium meliloti adenylate cyclase is related to eucaryotic adenylate and guanylate cyclases*. *J. Bacteriol.* (1990) 172, 2614-2621.
- (51) Linder, J.U. *persönliche Mitteilung*.
- (52) Miller, C. *An overview of the potassium channel family*. *Genome Biol.* (2000) 1.

- (53) Kozak, M. *Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes.* Cell (1986) 44, 283-292.
- (54) Tang, W.J., Gilman, A.G. *Construction of a soluble adenylyl cyclase activated by Gs alpha and forskolin.* Science (1995) 268, 1769-1772.
- (55) Beitz, E. *Zur cAMP-Signaltransduktion des retinalen Pigmentepithels des Rindes und des Innenohrs der Ratte.* Dissertation der Universität Tübingen (1997).
- (56) Seebacher, T., Linder, J.U., Schultz, J.E. *An isoform-specific interaction of the membrane anchors affects mammalian adenylyl cyclase type V activity.* Eur. J. Biochem. (2001) 268, 105-110.
- (57) Pelletier, J., Sonenberg, N. *Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency.* Cell (1985) 40, 515-526.
- (58) Pfister, M.F., Ruf, I., Stange, G., Ziegler, U., Lederer, E., Biber, J., Murer, H. *Parathyroid hormone leads to the lysosomal degradation of the renal type II Na/Pi cotransporter.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95, 1909-1914.
- (59) Zhou, Z., Gong, Q., January, C.T. *Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects.* J. Biol. Chem. (1999) 274, 31123-31126.
- (60) Kubo, Y., Baldwin, T.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y. *Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel.* Nature (1993) 362, 127-133.
- (61) Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J., Adelman, J.P. *Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain.* Science (1996) 273, 1709-1714.
- (62) Xia, X.M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J.E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C.T., Lutsenko, S., Maylie, J., Adelman, J.P. *Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels.* Nature (1998) 395, 503-507.
- (63) Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y. *Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers.* Science (2001) 291, 316-319.
- (64) Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., Jan, L.Y. *A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization.* Neuron (2000) 27, 97-106.
- (65) Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N., Jan, L.Y. *A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels.* Neuron (1999) 22, 537-548.
- (66) Kloecker, N. *persönliche Mitteilung.*
- (67) Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B.G., et al. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.* Nature (1998) 393, 537-544.
- (68) Guo, Y.L., Seebacher, T., Kurz, U., Linder, J.U., Schultz, J.E. *Adenylyl cyclase Rv1625c of Mycobacterium tuberculosis: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases.* EMBO J. (2001) 20, 3667-3675.
- (69) Kanacher, T. *persönliche Mitteilung; Daten in Veröffentlichung.*

- (70) Danchin, A., Pidoux, J., Krin, E., Thompson, C.J., Ullmann, A. *The adenylate cyclase catalytic domain of Streptomyces coelicolor is carboxy-terminal*. FEMS Microbiol. Lett. (1993) 114, 145-151.
- (71) Altenbuchner, J. *unveröffentlicht*. (2000).
- (72) Pfeifer, V. *persönliche Mitteilung*.
- (73) Weber, J. *persönliche Mitteilung*.
- (74) Barzu, O., Danchin, A. *Adenylyl Cyclases: A Heterogeneous Class of ATP-Utilizing Enzymes*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. (1994) 49, 241-283.
- (75) Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., Frank, D.W. *ExoY, an adenylate cyclase secreted by the Pseudomonas aeruginosa type III system*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95, 13899-13904.
- (76) Sismeiro, O., Trotot, P., Biville, F., Vivares, C., Danchin, A. *Aeromonas hydrophila adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria*. J. Bacteriol. (1998) 180, 3339-3344.
- (77) Cotta, M.A., Whitehead, T.R., Wheeler, M.B. *Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, Prevotella ruminicola D31d*. FEMS Microbiol. Lett. (1998) 164, 257-260.
- (78) Kreuzsch, A., Pfaffinger, P.J., Stevens, C.F., Choe, S. *Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel*. Nature (1998) 392, 945-948.
- (79) Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. *The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity*. Science (1998) 280, 69-77.
- (80) Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., MacKinnon, R. *Mutations in the K⁺ channel signature sequence*. Biophys. J. (1994) 66, 1061-1067.
- (81) Guy, R. *persönliche Mitteilung an J.E. Schultz*.
- (82) Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J., Levin, L.R. *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 79-84.
- (83) Hurley, J.H. *Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase*. J. Biol. Chem. (1999) 274, 7599-7602.
- (84) Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Johnson, R.A., Gosselin, G., Gilman, A.G., Sprang, S.R. *Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase*. Science (1999) 285, 756-760.
- (85) Kanacher, T.S., A.; Linder, J. U.; Schultz, J. E. *A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from Anabaena is a self-activating cAMP switch*.
- (86) Liu, Y., Ruoho, A.E., Rao, V.D., Hurley, J.H. *Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94, 13414-13419.
- (87) McCue, L.A., McDonough, K.A., Lawrence, C.E. *Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in Mycobacterium tuberculosis*. Genome Res. (2000) 10, 204-219.
- (88) Castro, L., Wetterer, M., Hammer, A. *persönliche Mitteilungen*.

- (89) Das, A.K., Cohen, P. W., Barford, D. *The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions.* EMBO J. (1998) 17, 1192-1199.
- (90) Lamb, J.R., Tugendreich, S., Hieter, P. *Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?* Trends Biochem. Sci. (1995) 20, 257-259.
- (91) Goebel, M., Yanagida, M. *The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription.* Trends Biochem. Sci. (1991) 16, 173-177.
- (92) Sikorski, R.S., Michaud, W.A., Hieter, P. *p62cdc23 of Saccharomyces cerevisiae: a nuclear tetratricopeptide repeat protein with two mutable domains.* Mol. Cell Biol. (1993) 13, 1212-1221.
- (93) Samejima, I., Yanagida, M. *Bypassing anaphase by fission yeast cut9 mutation: requirement of cut9+ to initiate anaphase.* J. Cell Biol. (1994) 127, 1655-1670.
- (94) Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A.W., Hall, A. *Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity.* Science (1994) 265, 531-533.
- (95) Ponting, C.C., Phillips, C. *Rapsyn's knobs and holes: eight tetratricopeptide repeats.* Biochem. J. (1996) 314, 1053-1054.
- (96) Hammer, A. *persönliche Mitteilung.*
- (97) Ling, K.Y., Haynes, W.J., Oesterle, L., Kung, C., Preston, R.R., Saimi, Y. *K(+)-channel transgenes reduce K(+) currents in Paramecium, probably by a post-translational mechanism.* Genetics (2001) 159, 987-995.
- (98) Higgins, M.K., Weitz, D., Warne, T., Schertler, G.F.X., Kaupp, U.B. *Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: the arrangement of the cytoplasmic domains.* EMBO J. (2002) 21, 2087-2094.
- (99) Müller, G. ed. *Wörterbücher der Biologie.* Mikrobiologie. 1980, Gustav Fischer-Verlag: Stuttgart, New York.
- (100) Rueda, B., Miguelez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B. *Mycelial differentiation and spore formation by Streptomyces brasiliensis in submerged culture.* Can. J. Microbiol. (2001) 47, 1042-1047.
- (101) Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H.H., Canal, I., Llamazares, S., Ferrus, A. *Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila.* EMBO J. (1988) 7, 1087-1096.

Meine akademischen Lehrer neben Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz waren die Damen und Herren:

Ammon, H.P.T.	Pharmakologie und Toxikologie
Beyer, C.	Pharmazeutische Chemie
Drews, G.	Pharmakologie und Toxikologie
Eger, K.	Pharmazeutische Chemie
Gauglitz, G.	Physikalische Chemie
Heide, L.	Pharmazeutische Biologie
Kovar, K.-A.	Pharmazeutische Chemie
Mechler, E.	Pharmazeutische Biologie
Müller, C.	Pharmazeutische Chemie
Reinhard, E.	Pharmazeutische Biologie
Roth, H.J.	Pharmazeutische Chemie
Safayhi, H.	Pharmakologie und Toxikologie
Schmidt, P.C.	Pharmazeutische Technologie
Schubert, R.	Pharmazeutische Technologie
Steinhilber, D.	Pharmazeutische Chemie
Wahl, M.A.	Pharmakologie und Toxikologie
Wankmüller, A.	Pharmazeutische Terminologie
Zimmermann, W.	Pharmazeutische Chemie

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kristina Hambach
Geburtstag: 07.08.1971
Geburtsort: Freiburg i.Br.

Ausbildung:

1978 - 1982 Grund- und Hauptschule Kollnau
1982 - 1991 Geschwister-Scholl Gymnasium Waldkirch
06/1991 Abitur
04/1992 - 10/1996 Pharmaziestudium an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08/1994 1. Staatsexamen Pharmazie
10/1996 2. Staatsexamen Pharmazie
11/1996 - 04/1997 Pharmaziepraktikum bei Schwabe-Arzneimittel, Karlsruhe
05/1997 - 10/1997 Pharmaziepraktikum in der Auerhahn-Apotheke, Karlsruhe
12/1997 3. Staatsexamen Pharmazie
01/1998 Approbation als Apotheker
06/1998 - 09/2001 Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit:
"Klonierung einer Adenylatcyclase aus *Paramecium tetraurelia*"
am Pharmazeutischen Institut der Eberhard Karls Universität Tü-
bingen unter Leitung von Prof. Dr. J.E. Schultz