





# **Die GAF-Domänen der humanen Phosphodiesterase 10**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Karina Hofbauer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. J. E. Schultz

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. P. Ruth

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde zwischen Oktober 2004 und Juni 2007 am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Joachim E. Schultz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Joachim E. Schultz danke ich für die Überlassung des Themas, die allzeit offene Tür sowie die interessanten Diskussionen, die zahlreichen guten Ratschläge und die insgesamt sehr lehrreiche Zeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Ruth danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Oliver Werz und Herrn Prof. Dr. Thilo Stehle bedanke ich mich für die Abnahme der Promotionsprüfung.

Für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Tipps bezüglich der Kristallisation der PDE10 GAF-Domänen geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Thilo Stehle und Herrn Dr. Christoph Schall vom Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen.

Herrn Dr. Jost H. Weber danke ich für die Einarbeitung in die Methoden.

Ein besonderes Dankeschön geht an Frau Anita Schultz für die tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen Klonierungsarbeiten für die vorliegende Arbeit.

Frau Ursula Kurz danke ich für ihre Unterstützung und ihre Ratschläge in jeglicher Hinsicht.

Herrn PD Dr. Jürgen Linder danke ich für seine Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie, vor allem an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben und letztendlich alles ermöglichten.

Im Besonderen möchte ich auch Marcel Kober für seine Unterstützung, den Rückhalt, den er mir stets geboten hat, sowie für seine Geduld und sein Verständnis, vor allem während der Schreib- und Lernphase, Dank sagen.



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Cyclische Nucleotide als second messenger .....	1
1.2. Small molecule binding domains (SMBDs).....	2
1.2.1. Allgemeine Merkmale von SMBDs.....	2
1.2.2. GAF-Domänen .....	3
1.2.3. PAS-Domänen.....	7
1.3. Phosphodiesterasen .....	8
1.3.1. Allgemeine Merkmale von Phosphodiesterasen .....	8
1.3.2. Regulation der Säuger-Phosphodiesterasen .....	12
1.3.3. Die PDE10-Familie .....	14
1.4. Die Adenylatcyclasen CyaB1 und CyaB2 aus <i>Anabaena sp. PCC 7120</i> .....	16
1.5. Zielstellung der Arbeit.....	17
<b>2. Material.....</b>	<b>18</b>
2.1. Geräte .....	18
2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	20
2.3. Puffer und Lösungen .....	22
2.3.1. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden .....	22
2.3.1.1. Lösungen zum Arbeiten mit DNA.....	22
2.3.1.2. Nährmedien für <i>E. coli</i> .....	23
2.3.2. Puffer und Lösungen für proteinchemische Methoden.....	23
2.3.2.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	23
2.3.2.2. Western Blot .....	23
2.3.2.3. Zellernte, Zellyse und Proteinreinigung .....	24
2.3.2.4. Adenylatcyclasetest.....	25
2.3.2.5. Sonstige Puffer.....	25

2.4.	Oligonucleotide .....	26
2.4.1.	Klonierungsprimer .....	26
2.4.2.	Sequenzierprimer .....	28
2.5.	Plasmide .....	28
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.1.	Gentechnologische Methoden .....	29
3.1.1.	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	29
3.1.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	29
3.1.3.	Agarosegelelektrophorese .....	30
3.1.4.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	31
3.1.4.1.	<i>NucleoTrap</i> ® .....	31
3.1.4.2.	Glaswolle .....	32
3.1.5.	Reinigung, Entsalzung und Aufkonzentrierung von DNA .....	32
3.1.5.1.	Entsalzung .....	32
3.1.5.2.	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	32
3.1.5.3.	Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen .....	33
3.1.6.	Konzentrationsbestimmung von wässrigen DNA-Lösungen .....	33
3.1.7.	Restriktionsverdau von DNA .....	34
3.1.8.	Glätten von überhängenden DNA-Enden .....	34
3.1.9.	5'-Phosphorylierung .....	34
3.1.10.	5'-Dephosphorylierung .....	35
3.1.11.	DNA-Ligation .....	35
3.1.12.	Transformation von <i>E. coli</i> .....	35
3.1.12.1.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	35
3.1.12.2.	Standardtransformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	36
3.1.12.3.	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen .....	36
3.1.12.4.	Blau-Weiß-Screen .....	37
3.1.13.	DNA-Sequenzierung .....	37
3.2.	Proteinchemische Methoden .....	38
3.2.1.	Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	38
3.2.2.	Zellernte .....	38
3.2.3.	Zelllyse .....	38
3.2.4.	Proteinreinigung .....	39
3.2.4.1.	Reinigung mit Ni <sup>2+</sup> -IDA .....	39
3.2.4.2.	Reinigung mit Ni <sup>2+</sup> -NTA .....	40
3.2.5.	Dialyse .....	40
3.2.6.	Aufkonzentrieren .....	40
3.2.7.	Bradford-Test .....	41
3.2.8.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	41
3.2.9.	Western Blot .....	42
3.2.10.	Cross-Linking .....	43
3.2.11.	Gelfiltrationschromatographie .....	43
3.2.12.	Verdau mit der TEV-Protease .....	44
3.3.	Adenylatcyclasetest .....	45

3.4. Kristallisation .....	46
3.5. Klonierungen .....	46
3.5.1. Ausgangsklone .....	47
3.5.2. PDE10-CyaB1-Chimären.....	48
3.5.2.1. PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	48
3.5.2.2. PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC .....	49
3.5.2.3. PDE10 NKFDE GAF-CyaB1 AC.....	50
3.5.2.4. PDE10 NKFDE GAF-A D397A GAF-B-CyaB1 AC.....	50
3.5.2.5. PDE10A1 GAF-CyaB1 AC .....	51
3.5.2.6. PDE10A2 GAF-CyaB1 AC .....	52
3.5.2.7. PDE10A1 V63 GAF-CyaB1 AC .....	53
3.5.2.8. PDE10A1 G73 GAF-CyaB1 AC .....	54
3.5.2.9. PDE10A1 D87 GAF-CyaB1 AC .....	55
3.5.3. PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären.....	56
3.5.3.1. PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A-PDE10 Linker GAF-B .....	56
3.5.3.2. PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B .....	57
3.5.3.3. PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker D397A GAF-B.....	58
3.5.3.4. PDE5 N-Term. GAF-A Linker-PDE10 GAF-B .....	58
3.5.3.5. PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A Linker-PDE10 GAF-B .....	59
3.5.3.6. PDE5 N-Term.-PDE10 GAF-A-PDE5 Linker GAF-B .....	60
3.5.3.7. PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker GAF-B .....	62
3.5.3.8. PDE10 N-Term. GAF-A Linker-PDE5 GAF-B .....	63
3.5.3.9. PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker-PDE5 GAF-B .....	64
3.5.3.10. PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker-PDE10 GAF-B .....	65
3.5.4. PDE10 GAF-Konstrukte zur Kristallisation .....	66
3.5.4.1. PDE10A1 D87 GAF-A/B .....	66
3.5.4.2. PDE10A1 V63 GAF-A/B .....	66
3.5.4.3. PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV .....	67
3.5.5. Domänenstrukturen der untersuchten Proteine .....	68
3.5.5.1. PDE10-CyaB1-Chimären .....	68
3.5.5.2. PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären.....	70
3.5.5.3. PDE10 GAF-Konstrukte zur Kristallisation .....	71
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>72</b>
4.1. Untersuchung der PDE10-CyaB1-Chimären .....	72
4.1.1. Biochemische Charakterisierung der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	72
4.1.1.1. Expression und Reinigung der PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	74
4.1.1.2. Proteinabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	75
4.1.1.3. Dosis-Wirkungskurve der PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	76
4.1.1.4. Kinetik der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	76
4.1.1.5. pH-Abhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	78
4.1.1.6. Temperaturabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	78
4.1.1.7. Zeitabhängigkeit und $K_{on}$ -Wertbestimmung der PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	80
4.1.1.8. $K_{off}$ -Wertbestimmung der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	81
4.1.1.9. Einfluss anderer Nucleoside und Nucleotide.....	82
4.1.1.10. Stabilität und Lagerung der PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	83

## Inhaltsverzeichnis

---

4.1.1.11. Cross-Linking .....	83
4.1.1.12. Regenerierendes System .....	84
4.1.2. Untersuchung der Rolle des NKFDDE-Motivs .....	84
4.1.2.1. PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC .....	85
4.1.2.2. PDE10 NKFDDE GAF-CyaB1 AC.....	88
4.1.2.3. PDE10 NKFDDE GAF-A D397A GAF-B-CyaB1 AC.....	89
4.1.3. Untersuchungen zum N-Terminus .....	90
4.1.3.1. PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC .....	91
4.1.3.2. PDE10A1 G73 GAF-CyaB1 AC .....	94
4.2. Untersuchungen der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären.....	95
4.2.1. Biochemische Charakterisierung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I.....	98
4.2.1.1. Proteinabhängigkeit .....	98
4.2.1.2. Dosis-Wirkung.....	98
4.2.1.3. Additive Dosis-Wirkungskurve .....	102
4.2.2. Biochemische Charakterisierung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II.....	103
4.2.3. Biochemische Charakterisierung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III .....	106
4.2.4. Biochemische Charakterisierung der PDE5 GAF-CyaB1 AC .....	107
4.3. Kristallisation der PDE10 Tandem-GAF-Domänen .....	109
4.3.1. Kristallisationskonstrukt PDE10A1 D87 GAF-A/B .....	110
4.3.2. Kristallisationskonstrukt PDE10A1 V63 GAF-A/B .....	115
4.3.3. Kristallisationskonstrukt PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV .....	121
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>125</b>
5.1. cAMP als Ligand der PDE10 Tandem-GAF-Domänen.....	125
5.2. Die Bedeutung des NKFDDE-Motivs der PDE10 GAF-Domänen .....	126
5.3. Die Rolle des PDE10 N-Terminus .....	128
5.4. Chimären aus PDE5, PDE10 und CyaB1.....	129
5.5. Die Kristallisation der Tandem-GAF-Domänen der PDE10 .....	133
5.6. Die physiologische Bedeutung der humanen PDE10.....	135
5.7. Offene Fragen und Ausblick .....	136
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>138</b>
Anhang .....	139
Literaturverzeichnis.....	151

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Übersicht über grundlegende Mechanismen der Synthese und Funktion von cAMP und cGMP (aus [6]) .....	2
Abb. 1-2 Domänenorganisation in Säuger-PDEn und <i>Anabaena</i> ACn (modifiziert nach [15]).....	4
Abb. 1-3 Clustal W-Sequenzalignment der GAF-Domänen aus humanen PDEn (modifiziert nach [16]).....	5
Abb. 1-4 Übersicht über die Substratspezifitäten der elf Säuger-PDE-Familien (aus [44]) .....	10
Abb. 1-5 Übersicht über die Domänenorganisation der elf PDE-Familien aus Säugern (aus [46]) .....	11
Abb. 1-6 Übersicht über die Kombinationsmöglichkeiten der N- und C-Termini der humanen PDE10A-Spleißvarianten (aus [87]).....	15
Abb. 1-7 Vergleich der N-terminalen AS-Sequenzen der PDE10A-Spleißvarianten von Mensch und Ratte (modifiziert nach [88]) .....	15
Abb. 2-1 Konstruierter pET16b-MCS-pQE60-Vektor (von Anita Schultz) .....	28
Abb. 3-1 Prinzip der hanging drop-Methode .....	46
Abb. 4-1 Domänenstruktur der PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	72
Abb. 4-2 Alignment der N-Termini der humanen PDE10A1 und PDE10A2.....	73
Abb. 4-3 SDS-PAGE-Gel und Western Blot von PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	74
Abb. 4-4 Proteinabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	75
Abb. 4-5 Dosis-Wirkungskurve der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	76
Abb. 4-6 Substratkinetik der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	77
Abb. 4-7 pH-Abhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	78
Abb. 4-8 Temperaturabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	79
Abb. 4-9 Arrheniusplot der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	79
Abb. 4-10 Zeitabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	80
Abb. 4-11 $K_{on}$ -Wertbestimmung der PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	81
Abb. 4-12 $K_{off}$ -Wertbestimmung der PDE10 GAF-CyaB1 AC.....	81
Abb. 4-13 Übersicht über die Stimulation durch verschiedene Nucleotide und Nucleoside im Vergleich mit cAMP .....	82
Abb. 4-14 Abhängigkeit der Stimulation der PDE10 GAF-CyaB1 AC mit 300 $\mu$ M cAMP von der Lagerungsdauer .....	83
Abb. 4-15 Western Blot nach Cross-Linking-Reaktion mit PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	84
Abb. 4-16 Western Blot der PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC .....	85
Abb. 4-17 Dosis-Wirkungskurve der PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC-Chimäre.....	86
Abb. 4-18 Substratkinetik der PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC-Chimäre.....	87
Abb. 4-19 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10 NKFDE GAF-CyaB1 AC .....	88
Abb. 4-20 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10 NKFDE GAF-A D397A GAF-B-CyaB1 AC.....	89
Abb. 4-21 Alignment der N-Termini der humanen PDE10-Hauptisoformen.....	90
Abb. 4-22 SDS-PAGE-Gele der PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC .....	91
Abb. 4-23 Dosis-Wirkungskurven mit Western Blot der PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC.....	92
Abb. 4-24 Substratkinetik der PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC-Chimären .....	93
Abb. 4-25 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10A1 G73 GAF-CyaB1 AC.....	94
Abb. 4-26 Schematische Darstellung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I .....	95
Abb. 4-27 Schematische Darstellung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I .....	96
Abb. 4-28 Schematische Darstellung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II.....	96
Abb. 4-29 Schematische Darstellung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III.....	97

---

Abb. 4-30 Proteinabhängigkeit der PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC	98
Abb. 4-31 Dosis-Wirkungskurven mit Western Blot der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I	99
Abb. 4-32 Dosis-Wirkungskurve mit Western Blot einer PDE5-PDE10-CyaB1-Chimäre der Gruppe I	100
Abb. 4-33 Additive Dosis-Wirkungskurven der PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC	103
Abb. 4-34 Dosis-Wirkungskurven mit Western Blot der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II	104
Abb. 4-35 Dosis-Wirkungskurven mit Western Blot der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III	106
Abb. 4-36 Domänenstruktur der PDE5 GAF-CyaB1 AC	107
Abb. 4-37 Dosis-Wirkungskurve mit Western Blot und Cross-Linking der PDE5 GAF-CyaB1 AC	108
Abb. 4-38 1. Ausschnitt aus einem modifizierten Clustal W-Alignment	109
Abb. 4-39 2. Ausschnitt aus einem modifizierten Clustal W-Alignment	110
Abb. 4-40 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10A1 D87 GAF-CyaB1 AC	110
Abb. 4-41 SDS-PAGE-Gel und Western Blot von PDE10A1 D87 GAF-A/B	111
Abb. 4-42 Kristalle von PDE10A1 D87 GAF-A/B	112
Abb. 4-43 Kristalle von PDE10A1 D87 GAF-A/B nach Optimierung	113
Abb. 4-44 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10A1 V63 GAF-CyaB1 AC	115
Abb. 4-45 SDS-PAGE-Gel und Western Blot von PDE10A1 V63 GAF-A/B	116
Abb. 4-46 Kristalle von PDE10A1 V63 GAF-A/B	117
Abb. 4-47 Kristalle von PDE10A1 V63 GAF-A/B nach Optimierung	117
Abb. 4-48 Gelfiltrationslauf von PDE10A1 V63 GAF-A/B	120
Abb. 4-49 Schematische Darstellung von PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV mit TEV-Schnittstelle	121
Abb. 4-50 SDS-PAGE-Gel (vor und nach TEV-Verdau) und Western Blot von PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV	122
Abb. 4-51 Zeitabhängigkeit des TEV-Verdau von PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV	123
Abb. 4-52 Gelfiltrationslauf des TEV-verdauten Proteins PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV	124
Abb. 5-1 Kristallstrukturen der GAF-Domänen der PDE2A der Maus und der CyaB2 aus <i>Anabaena</i>	133

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Übersicht über die elf Säuger-PDE-Familien (modifiziert nach [47]) .....	9
Tab. 2-1 Klonierungsprimer .....	27
Tab. 2-2 Fluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer .....	28
Tab. 3-1 PCR-Programm.....	29
Tab. 3-2 Größenmarker für die Agarosegelelektrophorese.....	31
Tab. 3-3 Übersicht über die Agarosekonzentration in Abhängigkeit von der Fragmentgröße [95].....	31
Tab. 3-4 PCR-Programm für die DNA-Sequenzierung .....	37
Tab. 3-5 Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele .....	41
Tab. 3-6 Zusammensetzung des Protein-Markers.....	42
Tab. 3-7 Säulendaten der Superdex 200 (16/60).....	44
Tab. 4-1 Übersicht über die Basalaktivitäten, Stimulationsfaktoren und EC <sub>50</sub> -Werte von PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC im Vergleich mit PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	91
Tab. 4-2 Übersicht über die kinetischen Parameter der PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC-Chimären im Vergleich mit PDE10 GAF-CyaB1 AC .....	92
Tab. 4-3 Übersicht über die Basalaktivitäten, Stimulationsfaktoren und EC <sub>50</sub> -Werte der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I im Vergleich mit PDE10 GAF- und PDE5 GAF-CyaB1 AC.....	101
Tab. 4-4 Übersicht über die kinetischen Parameter der stimulierbaren PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I .....	102
Tab. 4-5 Übersicht über die Basalaktivitäten und Stimulationsfaktoren der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II im Vergleich mit PDE10 GAF- und PDE5 GAF-CyaB1 AC .....	105
Tab. 4-6 Übersicht über die Basalaktivitäten und Stimulationsfaktoren der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III im Vergleich mit PDE10 GAF- und PDE5 GAF-CyaB1 AC .....	106
Tab. 4-7 Zusammenstellung der Pufferzusammensetzungen, Kristallform und -größe .....	112
Tab. 4-8 Ergebnisse der Optimierung der Kristallisationsbedingungen mit PDE10A1 D87 GAF-A/B.....	114
Tab. 4-9 Ergebnisse der Optimierung der Kristallisationsbedingungen mit PDE10 V63 GAF-A/B (I) .....	118
Tab. 4-10 Ergebnisse der Optimierung der Kristallisationsbedingungen mit PDE10 V63 GAF-A/B (II).....	119

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS(n)	Aminosäure(n)
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
cNMP	cyclisches Nucleosid-3',5'-monophosphat
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CRE	<i>cAMP-response element</i>
CREB	CRE-bindendes Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
FAD	Flavinadenindinucleotid
GAF	cGMP-spezifische und -regulierte PDEn, <i>Anabaena</i> <u>A</u> denylatcyclasen und <i>E. coli</i> Transkriptionsfaktor <u>F</u> hlA
IDA	<i>iminodiacetic acid</i>
IEP	Isoelektrischer Punkt
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LB-Medium	Luria-Bertani Kulturmedium
MCS	<i>multiple cloning site</i>
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i>
N-Term.	N-Terminus
OD	optische Dichte
pBSKII (-)	<i>pBluescript II SK (-)</i> -Vektor
PAS	Per-Arnt-Sim
PDE(n)	Phosphodiesterase(n)
PEI	Polyethylenimin

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>Pfu</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PKA	Proteinkinase A oder cAMP-abhängige Proteinkinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G oder cGMP-abhängige Proteinkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SMBD	small molecule binding domain
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
ü.N.	über Nacht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid



# 1. Einleitung

## 1.1. Cyclische Nucleotide als second messenger

Die Entdeckung der cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP in Leberhomogenaten durch Sutherland und Rall (1957) bzw. in Rattenurin durch Ashman et al. (1963) war der Beginn für die Entwicklung der second messenger-Theorie [1-3]. Second messenger sind intrazelluläre Botenstoffe, die eine Zellantwort auf eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli von chemischer oder physikalischer Natur über eine intrazelluläre Signalkaskade vermitteln. Der zelluläre Spiegel von cAMP bzw. cGMP sowie die Dauer des Signals werden bestimmt durch die Aktivitäten von Adenylat- bzw. Guanylatcyclasen, die deren Synthese aus ATP oder GTP katalysieren, und von cyclischen Nucleotid-bindenden Phosphodiesterasen, welche diese zum entsprechenden 5'-Nucleosidmonophosphat hydrolysieren [4, 5].

Auf einen extrazellulären Reiz hin wechselwirken sogenannte first messenger wie Hormone oder Neurotransmitter mit membranständigen oder löslichen Rezeptormolekülen, die das Signal ins Zellinnere weiterleiten. Dies stimuliert die Synthese eines second messengers wie z.B. cAMP oder cGMP, welcher an verschiedene Effektormoleküle binden kann. Zu diesen gehören vor allem cyclische Nucleotid-abhängige Proteinkinasen wie PKA oder PKG, cyclische Nucleotid-gesteuerte Ionenkanäle, cyclische Nucleotid-bindende Phosphodiesterasen (PDEn) oder Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (*guanine-nucleotide exchange factor*, GEF), die letztlich eine gezielte Zellantwort bewirken (Abb. 1-1). Durch cAMP oder cGMP können physiologische Prozesse wie Metabolismus, Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Sekretion, Genexpression, Lernen und Gedächtnis sowie Muskelkontraktion oder -relaxation reguliert werden [6-9].

Eine Regulation der cAMP- und cGMP-Signalwege erfolgt durch Feedback-Mechanismen, Modulation durch andere second messenger und subzelluläre Kompartimentierung [10].

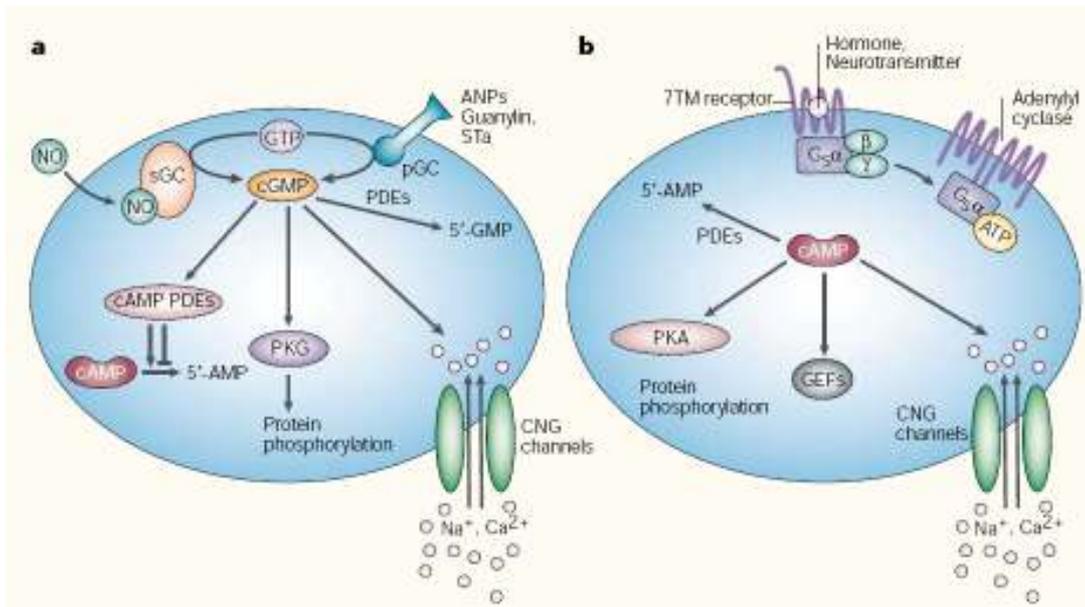


Abb. 1-1 Übersicht über grundlegende Mechanismen der Synthese und Funktion von cAMP und cGMP (aus [6])

ANP: atriales natriuretisches Peptid, CNG channels: cyclische Nucleotid-gesteuerte Kanäle, GEF: Guaninnucleotid-Austauschfaktor (guanine-nucleotide exchange factor),  $G_{s\alpha}$ : stimulatorisches  $G_{\alpha}$ -Protein, NO: Stickstoffmonoxid, PDEs: Phosphodiesterasen, pGC: membrangebundene Guanylatcyclase, PKA: Proteinkinase A, PKG: Proteinkinase G, sGC: lösliche Guanylatcyclase, STa: hitzestabiles Enterotoxin (heat-stable enterotoxin)

## 1.2. Small molecule binding domains (SMBDs)

### 1.2.1. Allgemeine Merkmale von SMBDs

Die Bindung kleiner Moleküle durch spezialisierte Proteindomänen spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation zentraler zellulärer Prozesse wie Metabolismus, Stofftransport und Signaltransduktion. Durch Sequenzanalyse und Proteinstrukturvergleich anhand komplett sequenzierter Genome wurden bisher 21 verschiedene intrazelluläre *small-molecule-binding domains* (SMBDs) in zahlreichen verschiedenen Proteinen aus Bakterien, Archaea und Eukaryoten gefunden [11].

SMBDs sind häufig kompakte globuläre Domänen von ca. 100 ASn Länge, die entfernt vom katalytischen Zentrum liegen. Durch die Bindung kleiner Moleküle wie organischer Metabolite, mono- und oligomerer Einheiten von Biopolymeren und anorganischer Ionen üben sie eine regulatorische Wirkung auf die Proteinaktivität aus, wobei sie aber meist selbst keine katalytische Aktivität besitzen. Sie fungieren somit als Rezeptoren für verschiedene Stimuli und leiten das Signal in Form einer allosterischen Regulation an das katalytische Zentrum weiter. Die Ligandenbindung der SMBDs umfasst verschiedene Typen molekularer Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, kovalente Verknüpfung mit AS-

Seitenketten der SMBDs sowie die Bildung von Übergangs-Metall-Schwefel-Clustern mit Cysteinseitenketten. Beispiele für SMBDs, die verschiedene organische Moleküle (Oxalat, Kohlenhydrate, ASn, Häm, Flavinnucleotide) binden, sind PAS (Per-Arnt-Sim) und DSBH (double-stranded  $\beta$ -helix domain). STAS (sulfate transporter, anti-sigma factor-binding domain), cNMPBD (cNMP-binding domain) und GAF (cGMP phosphodiesterase, Adenylate cyclase, FhlA domain) besitzen Nucleotide als Liganden. Anorganische Ionen wie Schwermetallionen (Eisen, Nickel, Kupfer u.a.) werden z.B. von Ferredoxinen oder HMA (heavy metal-associated domain) gebunden [11, 12].

SMBDs zeigen eine geringere Konservierung in ihren Sequenzen als die katalytischen Domänen. Sie kommen entweder als singuläre Domänen, als Tandemwiederholungen oder auch in Kombination mit nicht-verwandten Domänen vor. Proteine können auch mehrere verschiedene SMBDs enthalten. Die Kombination von PAS- und GAF-Domänen ist dabei besonders gebräuchlich. Das Vorkommen beider Domärentypen bereits in Prokaryoten, besonders in Cyanobakterien, zeigt die Entwicklung komplexer regulatorischer Mechanismen durch die Kombination eines kleinen Repertoires an Domänen bereits früh in der Evolution [11-14].

### 1.2.2. GAF-Domänen

GAF-Domänen sind eine der größten und am weitesten verbreitete Gruppe von SMBDs [15]. Sie wurden ursprünglich 1997 von Aravind und Ponting basierend auf einer Sequenzdatenbanksuche (position-specific iterative BLAST, PSI-BLAST) identifiziert. Die Bezeichnung GAF setzt sich aus den Namen der ersten drei Proteinklassen zusammen, in denen diese Domänen entdeckt wurden. Dies sind die cGMP-spezifischen und -regulierten Phosphodiesterasen, die Adenylatcyclasen aus dem Cyanobakterium *Anabaena* und der *E. coli* Transkriptionsfaktor FhlA [16, 17]. In 4694 Proteinen wurden bisher 5286 GAF-Domänen gefunden (unter <http://smart.embl-heidelberg.de>, 01.09.07), der größte Teil davon in Bakterien, gefolgt von den Eukaryoten. Nur sehr wenige GAF-Domänen sind in Archaea zu finden [18, 19]. In Bakterien sind GAF-Domänen an der Genregulation [16], der Phototransduktion durch Phytochrome [16, 20], der Stickstofffixierung [21], der Antwort auf Sauerstoffmangel und NO in *Mycobacterium tuberculosis* [22] sowie an der Signaltransduktion durch Adenylatcyclasen (ACn) aus *Anabaena* beteiligt [14, 17, 23]. In Archaea spielen sie eine Rolle bei der Photo- und Signaltransduktion [17]. Für Pflanzen haben GAF-Domänen ebenso eine Bedeutung bei der Phototransduktion durch Phytochrome [20, 24] sowie bei der Ethylendetektion [17, 24]. Zudem wurden GAF-

Sequenzen in Phosphodiesterasen (PDEn) aus verschiedenen Organismen gefunden, einschließlich Trypanosomen, Nematoden, Schwämmen, Insekten und Säugern [17].

Die GAF-Domänen der PDEn sind bisher am besten untersucht. Die Phosphodiesterasen TbPDE2A und TbPDE2B aus *Trypanosoma brucei* besitzen eine bzw. zwei GAF-Domänen [25, 26]. In fünf der elf bekannten Säuger-PDEn (PDE 2, 5, 6, 10 und 11) sind bis auf die PDE11-Spleißvarianten PDE11A1-3 zwei vollständige GAF-Domänen N-terminal zu einer katalytischen Domäne angeordnet (siehe Abb. 1-2) [15, 17]. Dies trifft auch auf die Adenylatcyclasen CyaB1 und CyaB2 aus dem Cyanobakterium *Anabaena* zu, wobei sich zwischen den beiden N-terminalen GAF-Domänen und der katalytischen Domäne noch eine PAS-Domäne (siehe 1.2.3.) befindet (siehe Abb. 1-2) [14, 17].

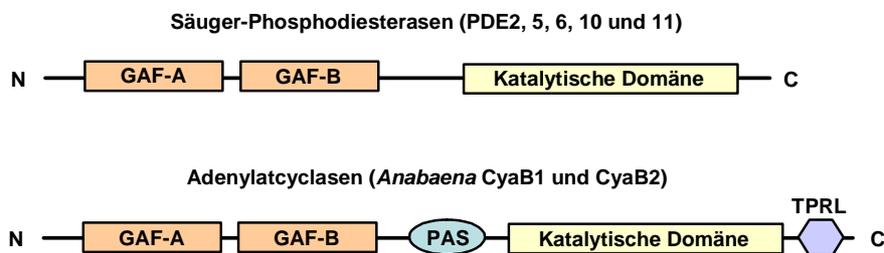


Abb. 1-2 Domänenorganisation in Säuger-PDEn und *Anabaena* ACn (modifiziert nach [15])

GAF: cGMP-spezifische und -regulierte PDEn, *Anabaena* Adenylatcyclasen und *E. coli* Transkriptionsfaktor EhlA, GAF-A: GAF-A-Domäne, GAF-B: GAF-B-Domäne, PAS: Per-Arrnt-Sim, TPRL: Tetratrico peptide repeat-like-Domäne

Die näher zum N-Terminus gelegene GAF-Domäne in einem solchen Tandem wird als GAF-A und die weiter entfernte als GAF-B bezeichnet. Die Länge der einzelnen GAF-Domänen liegt im Bereich von ca. 160 ASn. Beide sind durch einen Linker von etwa 30 ASn voneinander getrennt [27].

Neben der gemeinsamen Domänenorganisation (siehe Abb. 1-2) weisen die GAF-Domänen der PDEn und ACn deutliche Sequenzähnlichkeiten auf. So ähneln sich z.B. die GAF-Domänen der CyaB2 und der CyaB1 aus *Anabaena* einander sowie zu 43% mit denen der PDE2 und PDE5 aus Säugern. Zudem besteht eine AS-Sequenzübereinstimmung zu 24% bzw. 22% [23]. Dies zeigt eine Konservierung der GAF-Sequenzen über mehr als zwei Milliarden Jahre Evolution und deutet auf eine starke Verwandtschaftsbeziehung dieser GAF-Domänen untereinander hin. Auch die AS-Sequenzübereinstimmung der GAF-A-Domänen der humanen PDE5 und PDE11 zu 52% sowie der GAF-B-Domänen der humanen PDE2 und PDE10 zu 47% stützen die Theorie eines

## Einleitung

gemeinsamen Vorläufergens [17]. Eine Übersicht über die AS-Sequenzähnlichkeiten der GAF-Domänen der fünf humanen PDEn zeigt Abb. 1-3.

hpDE2-a	LQLCGELYDLDASSLQQLKVLQYLQOETRASRCCLLLVSEDN-----LQL	274
hpDE5-a	VKDISSHL--VTALCHKIFLHIHGLISADRYSLFLVCESSN-----DKFLISRLFD	206
hpDE6A-a	LLRDFQENLQ-TEKCIFNVMKLCFLLLQADRMSLFMYRTRNG-----IAELATRLFN	114
hpDE6A'-a	LWTVQEEGGT-PEQGVHRALQRLAHLQADRCSMFLCRSRNG-----IPEVASRLLV	116
hpDE6B-a	LVQDMQESIN-MERVVFKVLRRLCTLLQADRCSLFMYRQRNG-----VAELATRLFS	112
hpDE10-a	IEQRDLTGGD-NQLLLYELSSI IKIATKADGFALYFLGECNN-----SLCIFT	128
hpDE11-a	VKDISNDLD--LTSLSYKILIFVCLMVDADRCSLFLVGEAAAG-----KKTIVSKFFD	259
hpDE2-b	AKNLFTHLDD-VSVLLQEIIITEARNLSNAEICSVFLLDQN-----ELVAKVFD	446
hpDE5-b	ASLIFEEQQS-LEVILKKAATIISFMQVQKCTIFIVDEDCS-----DSFSSVFH	385
hpDE6A-b	GSKVFEELTD-IERQFHKALYTVRAFLNCDRYSVGLLDMTKQKEFFDVWPVLMGEVPPYSGPRTPD	309
hpDE6A'-b	ANKVFEELTD-VERQFHKALYTVRTYLNCERYSIGLLDMTKKEFEYDEWPIKLGVEPEYKGPKTPD	311
hpDE6B-b	ANKVFEELTD-IERQFHKAFYTVRAYLNCERYSVGLLDMTKKEFEFFDVWSVLMGESQPYSGPRTPD	307
hpDE10-b	SKTYFDNIVA-IDSLLEHIMIYAKNLVNADRCALFQVDHKN-----KELYSDLFD	305
hpDE11-b	AENSFKESMEKSSYSDWLINNSIAELVASTGLPVNISDAYQ-----DPRFD	498
hpDE2-a	S-CKVIGDKVLG-----EE---VSFP-----LTGCLGQVVEDKKS IQLKDLTSEDVQQLQS---	321
hpDE5-a	VAEGSTLEEVSN---NC---IRLE-----WNKGI VGHVAALGEPLNIKDAYEDPRFNAEVD--	256
hpDE6A-a	VHKDAVLEDC LVM-PDQE---IVFP-----LDMGIVGHVAHSHKIANVPNTEEDEHFCDFVD--	167
hpDE6A'-a	VTPTSKFEDNLVG-PDKE---VFP-----LDIGIVGWAHTKKTHNVPDVKKNSHFSDFMD--	169
hpDE6B-a	VQPDSVLEDC LVP-PDSE---IVFP-----LDIGVGHVAQTKKMVNVEDVAECPHFSSFAD--	165
hpDE10-a	PPGIKEGKPR LIP--AGP---ITQG-----TTVSAYVAKSRKTLLEDILGDERFPRGTG--	178
hpDE11-a	VHAGTPLLPCSSSTENSNE---VQVP-----WGKGIIGYVGEHGETVNIPDAYQDRRFNDEID--	313
hpDE2-b	GG-----VDD---ESYE---IRIP-----ADQGIAGHVATTGQLLNIPDAYAHPFYRGVD--	492
hpDE5-b	MECEELEKSSDILTREHD-----ANK-----INMYAQYVKNTEPLNIPDVSKDKRFPWTTENT	440
hpDE6A-b	GREINFYKVIDYILHGKEDIKVI PNPPDHVALVSGLPAYVAQNGLICNIMNAPAEDEFFAFQKEPL	375
hpDE6A'-b	GREVNFYKI IDYILHGKEEIKVIPTPPADHWTLISGLPTYVAENGFICNMNAPADEYFTFQKGPV	377
hpDE6B-b	GREIVFYKVIDYILHGKEEIKVIPTPSADHWALASGLPSYVAESGFICNIMNASADEMFKFOEGAL	373
hpDE10-b	IGEEKGKPVFK--KTKE---IRFS-----IEKGIAGQVARTGEVLNIPDAYADPRFNREVD--	357
hpDE11-b	AEADQISGFHIRSVLCVP----IWNS-----NHQIIGVAQVLNRLDGKPFDDADQRLFEAFV--	551
hpDE2-a	--MLGCELQAMLCVPVISRATDQVVALACAFN-KLE-----GDLFTDEDEHVIQHCFH---YTST	375
hpDE5-a	-QITGYKTQSILCMPIKNHREE-VVGVAQAINKSGN---GGTFTEKDEKDFAAAYLA---FCGI	312
hpDE6A-a	-ILTEYKTKNILASPI MNGKD--VVAIIMAVN-KVD-----GSHFTKRDEEILLKYL N---FANL	220
hpDE6A'-a	-KQTYVTKNLLATPIVVGKE--VLAVIMAVN-KVN-----ASEFSKQDEEVFSKYLN---FVSI	222
hpDE6B-a	-ELTDYKTKNMLATPI MNGKD--VVAVIMAVN-KLN-----GPFFTSEDEDVFLKYL N---FATL	218
hpDE10-a	-LESGTRIQSVLCLPIVTAIGD-LIGILELYR-HWG-----KEAFCLSHQEVATANLA---WASV	232
hpDE11-a	-KLTGYKTKSLLCMPIRSSDGE-IIGVAQAIN-KIPE---GAPFTEDEKVMQMYLP---FCGI	368
hpDE2-b	-DSTGFRTRNILCFPIKNENQE-VIGVAELVN-KIN---GPWFSKFDEDLATAFSI---YCGI	546
hpDE5-b	GNVNQQCIRSLCTPIKNGKKNK VIGVCQLVN-KMEENTGKVKPFNRNDEQFLEAFVI---FCGL	500
hpDE6A-b	-DESGWMIKNVLSMPIVNKKEE-IVGVATFYN-RKD-----GKPFDEHDEYITETLTQ---FLGW	426
hpDE6A'-b	-DETGWVIKNVLSMPIVNKKEE-IVGVATFYN-RKD-----GKPFDEHDEYITETLTQ---FLGW	431
hpDE6B-b	-DDSGWLIKNVLSMPIVNKKEE-IVGVATFYN-RKD-----GKPFDEQDEVLMESLTG---FLGW	427
hpDE10-b	-LYTGYTTRNILCMPIVSRGS--VIGVQMVN-KIS---GSAFSKTDENNFKMFAV---FCAL	410
hpDE11-b	-IFCGLGINNTIMYDQVKKSWAKQSVLDVLSYHATCSKAQVDFKKAANIPLVSELAIDDIHFDDF	616

Abb. 1-3 Clustal W-Sequenzalignment der GAF-Domänen aus humanen PDEn (modifiziert nach [17])

Abkürzungen: *a* steht für GAF-A-Domäne und *b* für GAF-B-Domäne; h=human; Farbkodierung: rot: konservierte ASn; grün: Positionen der elf mit cGMP wechselwirkenden ASn, aus der Kristallstruktur der PDE2A GAF-B der Maus abgeleitet. Die graue Box kennzeichnet die Region mit dem NK/RX<sub>n</sub>FX<sub>3</sub>DE-Motiv.

Die GAF-Domänen wurden vor allem in den Säuger-PDEn, den PDEn aus Trypanosomen und den *Anabaena* Adenylatcyclasen als cyclische Nucleotid-bindende Domänen beschrieben. In diesen Proteinen binden sie die cyclischen Nucleotide cAMP bzw. cGMP zur allosterischen Regulation der katalytischen Aktivität der Enzyme. Beispielsweise bindet die GAF-A der TbPDE2B aus *Trypanosoma brucei* spezifisch cAMP [28] ebenso wie die GAF-B der Adenylatcyclase CyaB1 aus *Anabaena sp. PCC 7120* (siehe 1.4.) [14]. PDE2, 5, 6 und 11 werden durch die bevorzugte Bindung von cGMP an eine ihrer GAF-Domänen allosterisch reguliert [27, 29-32]. Der Ligand der PDE10 GAF-Domänen ist bisher unbekannt.

Neben cyclischen Nucleotiden können GAF-Domänen in verschiedenen Proteinen auch Formiat, 2-Oxoglutarat und aromatische Verbindungen (z.B. Tetrapyrrole und Photopigmente) binden [11, 17, 21, 24].

12 der 14 in Säuger-PDEn vorhergesagten GAF-Domänen enthalten ein NK/RX<sub>n</sub>FX<sub>3</sub>DE-Motiv, wobei in allen Phe die einzige invariante AS ist [17]. Ursprünglich wurde dieses konservierte Sequenzmotiv als Bindungsmotiv für cyclische Nucleotide angesehen. Dies wurde zunächst durch Mutationsstudien der PDE5 bestätigt [33, 34]. Jedoch zeigt die Kristallstruktur der PDE2A GAF-Domänen der Maus mit gebundenem cGMP, dass keine dieser ASn direkt cGMP bindet [35]. Dennoch führten Mutationsstudien, in denen alle fünf Reste des Motivs einzeln zu Ala sowie die Salzbrücke zwischen Lys und Asp mutiert wurden, zum Verlust der cGMP-Bindung. Dies deutet darauf hin, dass das NKFDE-Motiv an der Ausbildung und Stabilisierung der Bindungstasche beteiligt ist [30]. Auch die Kristallstruktur von CyaB2 aus *Anabaena*, in der cAMP an GAF-A und -B gebunden ist, zeigt, dass das hier in beiden GAF-Domänen enthaltene NKFDE-Motiv nicht Teil der Bindungstasche ist, aber ein konserviertes Netzwerk an H-Brücken sowie eine konservierte Salzbrücke zwischen Lys und Asp ausbildet [23, 36]. Für die cGMP-Bindung bedeutend wurden durch Kristallisation elf ASn in der GAF-B der PDE2A der Maus bestimmt (siehe Abb. 1-3) [35].

Die Kristallstruktur der GAF-Domänen der PDE2A der Maus zeigt zudem, dass cGMP nur von der GAF-B gebunden wird, während die GAF-A für die Ausbildung eines parallelen Dimers verantwortlich ist [35]. Eine weitere Funktion der GAF-Domänen in PDEn zusätzlich zur Ligandenbindung und allosterischen Regulation der katalytischen Aktivität der PDEn ist die Dimerisierung [17].

Aufgrund ihres begrenzten Vorkommens in Säugern, ausschließlich in fünf von elf bekannten PDEn, stellen die GAF-Domänen interessante therapeutische Angriffspunkte für die Entwicklung selektiver Agonisten oder Antagonisten dar [15, 17, 29].

### 1.2.3. PAS-Domänen

Eine weitere Gruppe von SMBDs bilden die PAS-Domänen. Diese sind cytosolische sensorische Module, die die Änderungen der Lichtintensität, des Redoxpotentials und des Sauerstoffgehalts sowie kleine Liganden wahrnehmen können. Als Cofaktoren nutzen sie dazu 4-Hydroxymethylsäure, Häm, FAD und 2Fe-2S-Zentren. PAS-Domänen wurden zuerst in dem *Drosophila* clock protein (**PER**), in dem Transkriptionsfaktor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (**ARNT**) in Säugern und im *Drosophila* single-minded protein (**SIM**) entdeckt, woraus sich auch der Name PAS ableitet [12, 13]. Die 100-120 ASn umfassenden Domänen zeigen trotz geringer Sequenzähnlichkeiten eine Konservierung in ihrer Faltung. Aus NMR- und Kristallstrukturanalysen verschiedener PAS-Domänen wurde als typisches konserviertes Strukturmerkmal die  $\alpha/\beta$ -Faltung beschrieben. Daneben teilen sie auch gemeinsame konformationelle Flexibilität, die wahrscheinlich nach Eingang des Signals zur Übermittlung an stromabwärts liegende Proteindomänen genutzt wird [12, 37-39]. Der genaue Mechanismus des Signalisierens durch PAS-Domänen an Downstream-Komponenten ist noch nicht gut verstanden. Eine mögliche Beteiligung der PAS-Domänen an Protein-Protein-Interaktionen wird diskutiert [12, 40].

PAS-Domänen wurden in zahlreichen Proteinen aus Archaea, Bakterien und Eukaryoten identifiziert, wobei die sensorische Rolle der PAS-Domänen in vielen dieser Proteine noch ungeklärt ist. Beispielsweise wurden sie in Proteinen wie Histidin- und Serin/Threonin-Kinasen, Chemorezeptoren und Photorezeptoren für Taxien (Bakterien) und Tropismen (Pflanzen), spannungsabhängigen Ionenkanälen, Regulatoren der Antwort auf Sauerstoffmangel, der embryonalen Entwicklung des ZNS und des circadianen Rhythmus sowie cyclischen Nucleotid-Phosphodiesterasen wie der PDE8 gefunden. Eine Funktion der PAS-Domäne in der PDE8 ist noch nicht bekannt [12, 13, 41, 42]. In Kombination mit GAF-Domänen kommen PAS-Domänen z.B. in den Adenylatcyclasen CyaB1 und CyaB2 aus *Anabaena* vor (siehe 1.4.) [14, 43].

### 1.3. Phosphodiesterasen

#### 1.3.1. Allgemeine Merkmale von Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDEn) umfassen eine Superfamilie von Metallophosphohydrolasen, die spezifisch die Hydrolyse von cAMP und cGMP zu ihrem inaktiven 5'-Monophosphat katalysieren. Damit sind sie neben den Adenylat- und Guanylatcyclasen für die Regulation des intrazellulären Spiegels der beiden second messenger verantwortlich [4]. Zudem schränken PDEn die zeitliche und räumliche Ausdehnung cyclischer Nucleotidsignale ein. Durch unterschiedliche Lokalisation der PDEn in der Zelle kontrollieren sie die cyclische Nucleotiddiffusion und erzeugen sogenannte Mikrodomänen an cyclischem Nucleotid. Dadurch wird das Signal in eingeschränkten subzellulären Kompartimenten gehalten und kann gezielt spezifische Effektorproteine in dieser Region beeinflussen [6, 8, 10, 42, 44]. Eine Phosphodiesteraseaktivität wurde erstmals kurz nach der Entdeckung von cAMP von Sutherland und Rall beschrieben [1].

Basierend auf den Unterschieden in ihrer Primärstruktur wurden die PDEn bisher in zwei Klassen unterteilt: die Klasse I umfasst alle Säuger-PDEn sowie u.a. PDEn aus *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae*. Sie enthalten ein konserviertes C-terminales Segment aus 250-300 ASn, welches das katalytische Zentrum enthält. Zudem kommen sie intrazellulär vor und unterscheiden sich in ihrer subzellulären Verteilung. PDEn aus Hefen, *Dictyostelium discoideum* und *Vibrio fischeri* gehören zur Klasse II der PDEn. Diese PDEn enthalten das konservierte Sequenzmotiv HXHLDH, welches wahrscheinlich Teil einer Metallionenbindungsstelle ist [4, 45]. Aufgrund der fehlenden Homologie der vom cpdA-Gen kodierten PDE aus *E. coli* zur Klasse I und II der PDEn wurde diese einer neuen Klasse an PDEn zugeordnet, der Klasse III. In dieser sind PDEn verschiedener Prokaryoten enthalten [45].

In Säugern wurden bisher elf PDE-Familien gefunden, die von insgesamt 21 verschiedenen Genen kodiert werden (siehe Abb. 1-5) [4, 46, 47]. Durch zahlreiche Transkriptionsstartstellen und alternatives Spleißen vieler dieser Gene existieren mehr als 50 verschiedene PDE-Isoenzyme [42, 44, 47]. Die Säuger-PDEn unterscheiden sich in ihren AS-Sequenzen, Substrat- und Inhibitorspezifitäten, kinetischen Eigenschaften, Regulationsmechanismen, Gewebeverteilung sowie der Anzahl an Isoformen (siehe Tab. 1-1) [4].

## Einleitung

Isoformen	Substratspezifität	Regulation	Gewebeverteilung
PDE1A/B	cAMP < cGMP	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-stimuliert, Phosphorylierung	glatter Muskel, Gehirn, Hoden, Herz, Spermien
PDE1C	cAMP = cGMP		
PDE2A	cAMP = cGMP	cGMP-stimuliert	Gehirn, Herz, Blutplättchen, adrenale Medulla
PDE3A/B	cAMP > cGMP	cGMP-gehemmt, Phosphorylierung	Herz, vaskulärer glatter Muskel, Blutplättchen, Adipocyten, Leber, Niere
PDE4A-D	cAMP > cGMP	Phosphorylierung	Gehirn, Immunzellen, Hoden, Lunge
PDE5A	cGMP > cAMP	cGMP-stimuliert, Phosphorylierung	Blutplättchen, Lunge, Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Niere, vaskulärer glatter Muskel
PDE6A-C	cGMP > cAMP	cGMP-stimuliert	Retina
PDE7A/B	cAMP > cGMP	-	Immunzellen, Herz, Skelettmuskel, Leber, Gehirn, Hoden, Pankreas
PDE8A/B	cAMP > cGMP	-	Hoden, Milz, Dünn- u. Dickdarm, Niere, Ovarien, Gehirn, Schilddrüse
PDE9A	cGMP > cAMP	-	Niere, Gehirn, Milz, Prostata
PDE10A	cAMP > cGMP	cAMP-stimuliert, Phosphorylierung	Gehirn, Hoden, Schilddrüse, Herz, Hirnanhangsdrüse, Niere
PDE11A	cAMP = cGMP	cGMP-stimuliert	Skelettmuskel, Prostata, Hoden, Leber

*Tab. 1-1 Übersicht über die elf Säuger-PDE-Familien (modifiziert nach [47])*

Die Nomenklatur der PDEn: eine arabische Ziffer kennzeichnet die PDE-Familie und der nachfolgende Buchstabe das kodierende Gen. Spleißvarianten werden durchnummeriert.

Die elf Säuger-PDE-Familien lassen sich nach ihrer Spezifität für die Substrate cAMP und cGMP in drei Gruppen einteilen: cAMP-spezifische (PDE4, 7 und 8), cGMP-spezifische (PDE5, 6 und 9) sowie dual-spezifische PDEn (PDE1, 2, 3, 10 und 11). Letztere können beide cyclischen Nucleotide hydrolysieren (siehe Abb.1-4) [4, 10, 44]. Für die Spezifität der Wechselwirkungen der PDEn mit cAMP und cGMP sind der cyclische Phosphodiesterrißring und der Purinanteil der cyclischen Nucleotide entscheidend. Andere Nucleotide einschließlich ATP, ADP, GTP, GDP sowie deren 5'-Nucleosidmonophosphate werden von den PDEn nicht umgesetzt, was möglicherweise auf ihren fehlenden cyclischen Phosphodiesterrißring zurückzuführen ist [4]. Die Wechselwirkungen zwischen dem Purinanteil und eines invarianten Glutamins sind wahrscheinlich für die Unterscheidung zwischen cAMP und cGMP von Bedeutung. Bei der Theorie des „Glutaminschalters“ kann dieses Glutamin bei dual-spezifischen PDEn frei rotieren. Bei cAMP- bzw. cGMP-spezifischen PDEn wird das Glutamin durch benachbarte Reste jeweils in einer bestimmten Orientierung fixiert, welche die Bindung von nur einem der beiden Substrate erlaubt [46-49]. Diese Theorie ist jedoch umstritten [50].

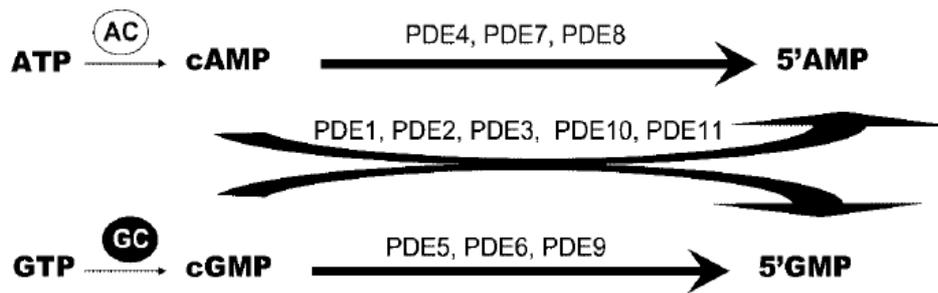


Abb. 1-4 Übersicht über die Substratspezifitäten der elf Säuger-PDE-Familien (aus [44])

Säuger-PDEn teilen eine gemeinsame Domänen-Organisation (Abb.1-5). Sie besitzen eine konservierte C-terminale katalytische Domäne sowie N-terminal zu dieser meist regulatorische Domänen. Die größten Sequenzähnlichkeiten (20-45% Identität) zeigen die elf Säuger-PDE-Familien in ihren katalytischen Domänen. Innerhalb einer PDE-Familie beträgt die Sequenzübereinstimmung sogar 70-80% [4, 10]. Die für die Katalyse erforderlichen Komponenten sind in der katalytischen Domäne enthalten. Sie ist allein für die Katalyse ausreichend. Die N-terminalen Domänen sind vor allem für die Regulation der katalytischen Aktivität oder die Dimerisierung des Enzyms verantwortlich. Die Art und Weise der Wechselwirkungen der regulatorischen Domänen mit der katalytischen Domäne sind noch unklar. Eine mögliche Konformationsänderung wird diskutiert [4, 46, 51, 52]. Alle bekannten Säuger-PDEn bilden Dimere oder Oligomere. Die funktionelle Bedeutung ihrer Quartärstruktur ist allerdings noch nicht bekannt [4, 46].

Für die katalytische Aktivität der PDEn sind zusätzlich divalente Kationen erforderlich, wobei ein durch konservierte Histidine und Aspartate koordiniertes  $Zn^{2+}$  eine Schlüsselrolle einnimmt. Als zweites Metallion wird meist  $Mg^{2+}$  beschrieben [4, 46-48, 50, 53].

Die physiologische Bedeutung der PDEn mit ihren GAF-Domänen zeigt sich unter anderem durch Mutationen in PDE-Genen. Die Mutation H258N in der  $\beta$ -Untereinheit der PDE6B im Photorezeptor ist verbunden mit der autosomal dominanten kongenitalen stationären Nachtblindheit. Wahrscheinlich führt eine unvollständige Hemmung der PDE6-Aktivität durch die inhibitorische  $\gamma$ -Untereinheit zur Desensibilisierung des Photorezeptors in den Stäbchen [54]. Mutationen im Gen für die  $\beta$ -Untereinheit der PDE6 (PDE6B) sind verantwortlich für eine progressive retinale Degeneration, der autosomal rezessiven Retinitis pigmentosa [55].

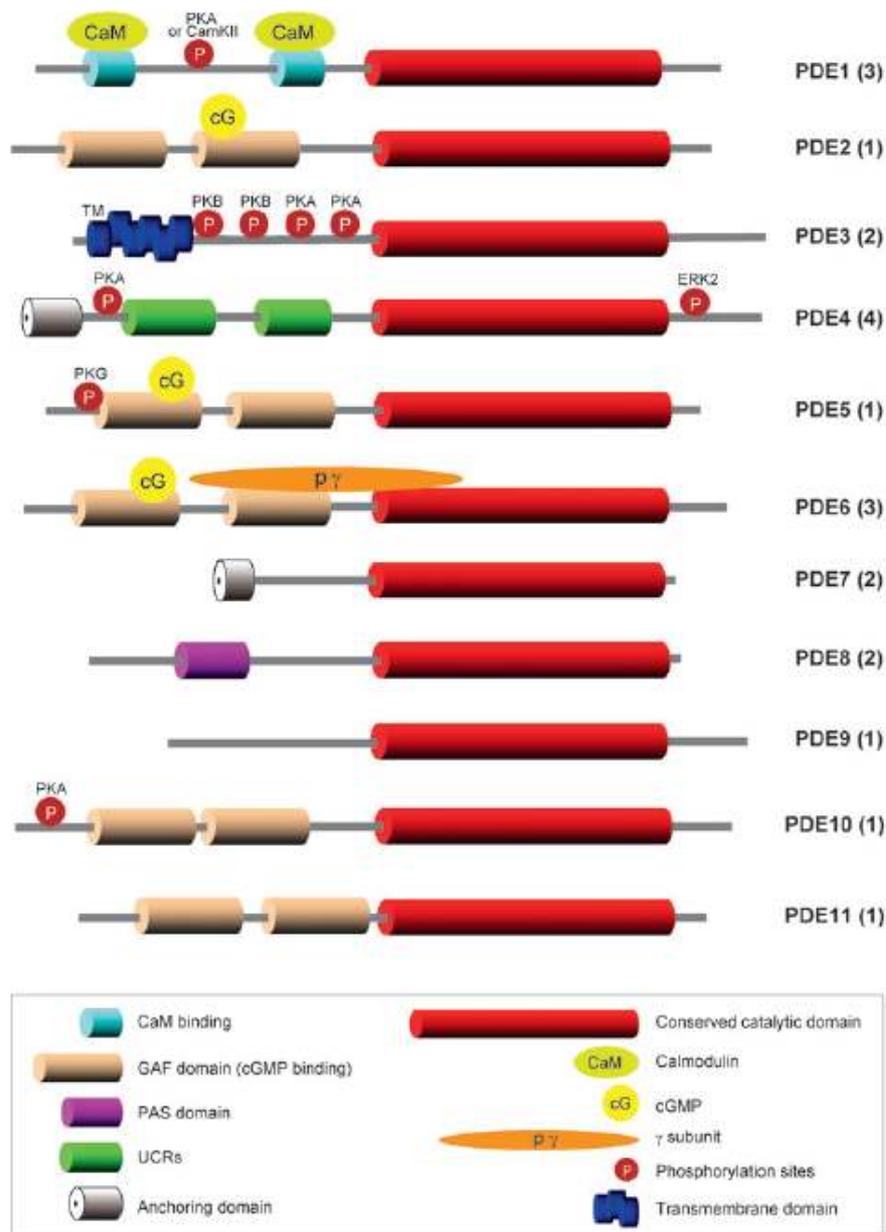


Abb. 1-5 Übersicht über die Domänenorganisation der elf PDE-Familien aus Säugern (aus [46])

Die Anzahl an Genen, die die Mitglieder der einzelnen PDE-Familien kodieren, ist in Klammern hinter dem Namen der jeweiligen PDE-Familie angegeben. CamKII: Calmodulin-regulierte Kinase II, ERK2: extracellular signal-regulated kinase 2,  $\gamma$ : PDE  $\gamma$ -Untereinheit, PKA: Proteinkinase A, PKB: Proteinkinase B, TM: Transmembrandomäne, UCR: upstream conserved region

Ihre unterschiedliche Gewebeverteilung und ihre spezifischen physiologischen Funktionen machen die PDEn zu interessanten Angriffspunkten für die medikamentöse Behandlung verschiedener Erkrankungen. Am besten bekannt ist der kompetitive PDE5-Inhibitor Sildenafil (Viagra®), der ebenso wie Tadalafil (Cialis®) und Vardenafil (Levitra®) zur Behandlung von erektiler Dysfunktion eingesetzt wird. Durch Hemmung der PDE5 kommt es durch einen

verringerten cGMP-Abbau im *Corpus cavernosum* zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und zum Bluteinstrom in dieses Gewebe [56-60]. Zudem findet Sildenafil (Revatio®) Einsatz bei der Behandlung von pulmonaler Hypertonie [10, 47, 59, 60]. Der PDE3-Inhibitor Milrinon wird zur Therapie von Herzinsuffizienz, häufig als Folge einer pulmonalen Hypertonie, eingesetzt [47, 59].

Gegen chronische entzündliche Atemwegserkrankungen wie Asthma und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) wurden die PDE4-Inhibitoren Cilomilast (Airflo®) und Roflumilast (Daxas®) entwickelt [7, 10, 59, 61].

Die hohe Sequenzähnlichkeit unter den katalytischen Domänen der Säuger-PDE-Familien hat Einfluss auf die Selektivität der PDE-Inhibitoren und führt häufig zu Kreuzreaktionen unter den PDEn und damit zu unerwünschten Nebenwirkungen. Beispielsweise wirkt Sildenafil nicht nur auf die PDE5, sondern auch auf die PDE6 hemmend. Dies führt zu visuellen Störungen [47, 56, 58-60].

Die hohe Vielfalt an bekannten PDE-Isoformen versucht man zukünftig für die Entwicklung von subtyp-spezifischen Inhibitoren zu nutzen. Zudem können die bereits bekannten Kristallstrukturen der katalytischen Domänen von acht verschiedenen PDE-Isoformen (PDE1B, PDE3B, PDE4B, PDE4D, PDE5A, PDE7A, PDE9A, PDE10A2) die Entwicklung von wirksameren und selektiveren Inhibitoren erleichtern [46-48, 50]. Wie bereits in 1.2.2. angedeutet, könnte auch die Nutzung der GAF-Domänen in fünf der elf PDE-Familien als medikamentöse Angriffspunkte die Selektivität von Inhibitoren erhöhen.

### 1.3.2. Regulation der Säuger-Phosphodiesterasen

Eine Regulation der PDEn ist wichtig für den geregelten Ablauf und die Kontrolle cyclischer Nucleotid-vermittelter Prozesse. Sie kann auf der Ebene der Genexpression sowie durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, Phosphorylierung und durch Bindung verschiedener Liganden an regulatorische Domänen erfolgen [62].

Eine Vielzahl an PDE-Genen sowie die Verwendung verschiedener Transkriptionsstartstellen und des alternativen Spleißens erzeugen eine Vielfalt an PDE-Isoformen (siehe 1.3.1.). Die PDE4 nimmt dabei mit vier Genen und mehr als 20 verschiedenen Isoformen mit unterschiedlichen N-Termini eine zentrale Stellung ein. PDE4-Promotoren werden z.B. durch cAMP über das CRE/CREB-System reguliert [47, 63, 64]. Drei potentielle CREB-Bindungsstellen wurden ebenfalls in der humanen PDE7A1-Promotorregion gefunden [65].

Protein-Protein-Wechselwirkungen spielen beispielsweise bei der Regulation von PDE1 und PDE4 eine Rolle. Die PDE1 wird durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an zwei  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-bindende Domänen aktiviert. Dabei bildet sich wahrscheinlich ein Tetramer aus zwei PDE1-Monomeren und zwei Molekülen CaM [4, 42, 47, 66]. Für die PDE4-Isoform PDE4D5 wurde eine Wechselwirkung mit dem Gerüstprotein RACK1 (*receptor for activated protein C kinase 1*) nachgewiesen. RACK1 könnte PDE4D5 zusammen mit anderen Proteinen wie z.B. der Proteinkinase C in einen Signalkomplex rekrutieren [67, 68]. PDE4A5 und PDE4D4 können über ihren N-Terminus an SH3-Domänen binden und so mit den Tyrosinkinasen Syn, Lyn und Fyn über deren SH3-Domäne wechselwirken [68-70].

Die Phosphorylierung als Regulationsmöglichkeit wurde besonders bei PDE4 und PDE5 intensiv untersucht. Die lange PDE4-Isoform PDE4D3, welche die beiden N-terminalen regulatorischen Domänen UCR1 und UCR2 (*upstream conserved regions*) besitzt, wird durch N-terminale Phosphorylierung mittels PKA aktiviert. Eine Dimerisierung der PDE4 scheint für eine Aktivierung strukturell erforderlich zu sein [68, 71, 72]. Eine Hemmung der PDE4D3 tritt durch Phosphorylierung mit der MAP-Kinase ERK2 an einem C-terminalen Ser auf. Dieser Hemmung kann allerdings eine PKA-Phosphorylierung im N-Terminus entgegenwirken [68, 73]. Die cGMP-Bindung an die GAF-A der PDE5 fördert eine Phosphorylierung am Ser-102 (hPDE5A1) im N-Terminus dieser PDE durch PKG oder PKA, was wiederum zu einer erhöhten Affinität der GAF-Domänen für cGMP führt. Die Auswirkungen der Phosphorylierung werden in der Literatur jedoch widersprüchlich dargestellt [60, 74-79]. Bei der PDE1 verringert sich die Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin durch Phosphorylierung am N-Terminus durch PKA oder der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Kinase [4, 42, 46, 66, 80]. Eine Phosphorylierung der PDE3B durch PKA oder PKB an verschiedenen N-terminalen Stellen bewirkt eine Aktivierung des Enzyms. Dabei wirken Insulin und IGF-1 induzierend auf die Phosphorylierung. Nur die PKA-Phosphorylierung der PDE3B an Ser-318 fördert die Wechselwirkung der PDE mit 14-3-3-Proteinen und schützt PDE3B vor Phosphatase-vermittelter Deaktivierung [47, 81].

Wie bereits unter 1.2.2. beschrieben, besitzen die Säuger- PDEn PDE2, 5, 6, 10 und 11 zwei N-terminale GAF-Domänen. An die von PDE2, 5, 6 und 11 kann cGMP als allosterischer Regulator binden (zur Übersicht [4, 46, 47]). Die langen PDE4-Isoformen (PDE4A5, PDE4B1 und PDE4D3) werden durch Phosphatidsäure aktiviert, während dieser Effekt bei den kurzen Isoformen ohne die UCR1-Domäne nicht beobachtet wurde [82].

### 1.3.3. Die PDE10-Familie

Die PDE10-Familie wurde unter Nutzung der Bioinformatik zur gleichen Zeit (1999) von drei verschiedenen Gruppen beschrieben. Sie zeigten, dass die PDE10 eine dual-spezifische PDE ist, die sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren kann [83-85]. Die kinetischen Daten der humanen PDE10A finden sich im Anhang unter A-1.

Die PDE10 besitzt eine konservierte C-terminale katalytische Domäne, die zu 16-47% mit der anderer Säuger-PDE-Familien übereinstimmt [83]. Die größte AS-Sequenzübereinstimmung (40-50%) besteht dabei mit den GAF-haltigen PDEn 2, 5, 6 und 11 [86]. Ebenso wie bei diesen wurden bei der PDE10 N-terminal zwei GAF-Domänen (GAF-A und -B) gefunden [84], die mit den GAF-Domänen der PDE2, 5, 6 und 11 eine Übereinstimmung in ihren AS-Sequenzen von 18-47% zeigen [17]. Dies verdeutlicht eine phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung zwischen diesen PDEn.

Für die PDE10 ist bisher nur ein Gen (PDE10A) bekannt. Im Menschen wurden sechs alternative Spleißvarianten gefunden: PDE10A1, PDE10A2, PDE10A7, PDE10A8, PDE10A9 und PDE10A10. Sie unterscheiden sich in ihren N- und C-Termini. Mittels RT-PCR und Sequenzanalysen wurden drei Arten von N-terminalen Sequenzen (N1, N2 und N3) sowie zwei Arten von C-terminalen Sequenzen (C1 und C2) der PDE10A in menschlichen Hoden nachgewiesen. Die Kombination dieser Sequenzen ergibt die sechs verschiedenen humanen PDE10A-Spleißvarianten (Abb. 1-6). Die Hauptformen im Menschen sind die PDE10A1 und PDE10A2 [87]. Die N-terminalen PDE10A-Spleißvarianten PDE10A3-A6 wurden in der Ratte entdeckt. Zusätzlich existiert auch eine PDE10A2 in der Ratte (794 AS). Sie stimmt zu 96% bezüglich ihrer AS-Sequenz mit der humanen PDE10A2 überein (789 AS). Beide besitzen den gleichen N-Terminus, unterscheiden sich jedoch in ihrer C-terminalen Sequenz. In der Ratte wurde keine PDE10A1 gefunden. PDE10A2 und PDE10A3 stellen in der Ratte die Hauptformen dar [88].

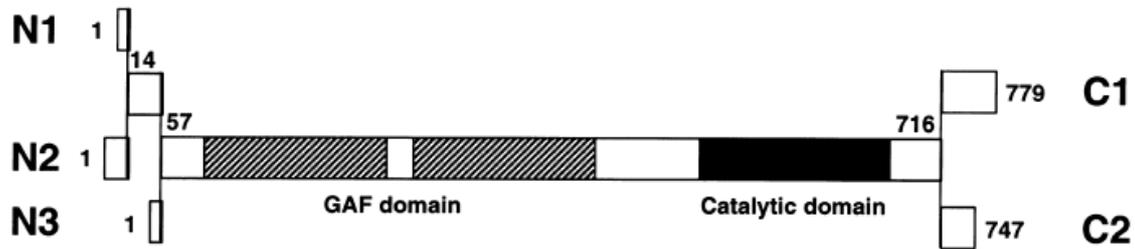


Abb. 1-6 Übersicht über die Kombinationsmöglichkeiten der N- und C-Termini der humanen PDE10A-Spleißvarianten (aus [87])

Die angegebenen Zahlen zeigen die AS-Positionen bezogen auf PDE10A1 an. Die vertikalen Linien geben die Stellen von AS-Sequenzänderungen an. Die schraffierten Bereiche kennzeichnen die beiden GAF-Domänen und der schwarze Bereich die katalytische Domäne. Mit N1, N2 und N3 bzw. C1 und C2 werden die verschiedenen N- bzw. C-Termini bezeichnet. N1+C1: PDE10A1; N2+C1: PDE10A2; N3+C1: PDE10A7; N1+C2: PDE10A8; N2+C2: PDE10A9; N3+C2: PDE10A10.

Abb. 1-7 zeigt den Vergleich der N-terminalen AS-Sequenzen der sechs PDE10A-Isoformen der Ratte mit den beiden humanen Hauptisoformen. Unabhängig vom Organismus variieren die N-Termini nur bis zu einem spezifischen Leu (Leu-24 der PDE10A2 der Ratte). Die Sequenz der regulatorischen Domänen und der katalytischen Domäne ist unter den Varianten unverändert. Sie zeigen erst wieder in ihrer C-terminalen Sequenz Unterschiede [88].

Mensch	PDE10A1	MRIEERKSQHLTG	LTDEK	AASED
	PDE10A2	MEDGPSNNASCFRRLTECFLLSPS	PDE10A Mensch	
Ratte	PDE10A2	MEDGPSNNASCFRRLTECFLLSPS	LTDEK	RKVDD
	PDE10A3	MSNDSPEGAVGSCNATG		
	PDE10A4	MDAYEGWQVMDWKPPETAAC		
	PDE10A5	MSKRRKALEGGGGGGEPQLPEEPTAWFGRSSEEPG	PDE10A Ratte	
	PDE10A6	*TGNEAERSFVLEDTLAG		

Abb. 1-7 Vergleich der N-terminalen AS-Sequenzen der PDE10A-Spleißvarianten von Mensch und Ratte (modifiziert nach [88])

Das Sternchen bei PDE10A6 steht für ein Stoppcodon in der Sequenz.

PDE10 wird im Putamen und im Nucleus caudatus (beide werden zum Striatum zusammengefasst) des Gehirns sowie in den Hoden sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte und der Maus stark exprimiert. Eine mäßige Expression wurde in der Schilddrüse, der Hirnanhangsdrüse, dem Thalamus und dem Cerebellum gefunden. Der Nachweis der PDE10A-Transkripte erfolgte über Dot Blot- und Northern Blot-Analysen [83, 84, 88]. Immunhistochemisch wurde PDE10A im Nucleus caudatus, Nucleus accumbens und im olfaktorischen Tuberkel im Rattengehirn nachgewiesen [89]. Eine Expression der humanen

PDE10A1 und PDE10A2 wurde zusätzlich zum Gehirn auch im Herz und in der Niere gezeigt [90].

PDE10A2 besitzt im N-Terminus ein Motiv (RRLT<sup>16</sup>E) für eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase A [90]. Kotera et al. zeigten, dass eine Phosphorylierung am Thr-16 die subzelluläre Lokalisation der PDE10A2 vom Golgi-Apparat zum Cytosol im Striatum der Ratte verändert. Die subzelluläre Lokalisation von PDE10A1 (Mensch) und PDE10A3 (Ratte) blieb durch die PKA unbeeinflusst, weil ihnen eine Phosphorylierungsstelle fehlt. Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass PDE10A2 eine membranassoziierte PDE10A-Variante ist [91].

Die mögliche physiologische Bedeutung der PDE10 wird unter 5.6. näher betrachtet.

### 1.4. Die Adenylatcyclasen CyaB1 und CyaB2 aus *Anabaena sp. PCC 7120*

Adenylatcyclasen katalysieren die Bildung des second messengers cAMP (siehe 1.1.) aus ATP. Sie werden in sechs Klassen (I-VI) unterteilt. Die Adenylatcyclasen der Klasse III sind am weitesten verbreitet [92]. Sie kommen in Pro- und Eukaryoten vor und werden nochmals anhand von AS-Sequenzuntersuchungen in vier Unterklassen unterteilt: IIIa-d [43].

Das Cyanobakterium *Anabaena sp. PCC 7120* besitzt sechs Gene, die für verschiedene AC-Isoenzyme kodieren [14, 92-94]. Die Gene *cyaB1* und *cyaB2* kodieren jeweils für eine AC mit zwei N-terminalen GAF-Domänen, einer PAS- und einer Klasse IIIb AC-katalytischen Domäne, gefolgt von einer *Tetratrico peptide repeat-like* Domäne (TPRL) (siehe Abb.1-2) [43, 92, 94]. Wie unter 1.2.2. bereits beschrieben, besitzen die CyaB1 und CyaB2 GAF-Domänen große Ähnlichkeit zu denen der Säuger-PDEn. CyaB1 bildet ein Homodimer, in dem die Stimulation der katalytischen Aktivität der AC durch cAMP-Bindung an die GAF-B in der Synthese von cAMP resultiert, welches wiederum in einer positiven Feedbackschleife die AC aktiviert [14, 94]. Die Kristallstruktur der Tandem-GAF-Domänen der CyaB2 mit gebundenem cAMP zeigt die Bildung eines antiparallelen Dimers, in dem alle vier GAF-Domänen cAMP binden [23, 36]. Der Ersatz der GAF-Domänen der CyaB1 durch die der PDE2 der Ratte führte zu einer CyaB1, die nun durch cGMP statt durch cAMP über die GAF-B stimulierbar war. Dies verdeutlicht zusätzlich zur Sequenzähnlichkeit auch eine funktionelle Konservierung der GAF-Domänen über mehr als zwei Milliarden Jahre Evolution [14, 94].

### 1.5. Zielstellung der Arbeit

Aus zahlreichen Arbeiten geht hervor, dass GAF-Domänen zur allosterischen Regulation von Phosphodiesterasen cyclische Nucleotide wie cAMP oder cGMP binden können (zur Übersicht [17]). Zudem sind sie an der Ausbildung von Dimeren beteiligt [35]. Die Eigenschaften und die Funktion der GAF-Domänen in der PDE10 wurden bisher nicht untersucht. Deshalb stand die biochemische Charakterisierung sowie die Kristallisation des humanen PDE10 GAF-Tandems zur Funktions- bzw. Strukturaufklärung im Mittelpunkt dieser Arbeit. Dies wurde durch die Eigenschaft von Phosphodiesterasen, cyclische Nucleotide sowohl als Substrat als auch als allosterischen Liganden zu nutzen, erschwert. In der Arbeit von Dr. Tobias Kanacher wurde gezeigt, dass die GAF-Domänen der Cyb1 aus *Anabaena* gegen die GAF-Domänen der PDE2 der Ratte unter Funktionserhalt austauschbar sind [14, 94]. Dieses Prinzip wurde als Messsystem für diese Arbeit verwendet, denn damit wurde eine Trennung von Substrat und allosterischem Regulator erreicht.

Es wurden die folgenden Aufgabenstellungen bearbeitet:

1. Biochemische Charakterisierung der PDE10 GAF-Domänen mit Bestimmung des Liganden, Untersuchung der Rolle des NKFD-Motivs bei der cyclischen Nucleotidbindung sowie der Länge des N-Terminus mit möglichem Einfluss auf die Funktion der GAF-Domänen
2. Konstruktion von Chimären aus GAF-Domänen der humanen PDE5 und PDE10 zur Untersuchung ihrer eigenständigen Funktionsfähigkeit in Abhängigkeit von bestimmten Sequenzabschnitten
3. Kristallisation des PDE10 GAF-Tandems zur Aufklärung der Struktur der PDE10 GAF-Domänen in An- und Abwesenheit ihres Liganden

## 2. Material

### 2.1. Geräte

**Amersham Pharmacia, Freiburg:** Elektrophorese-Spannungsquellen *EPS 301, EPS 601, Macrodrive 1 Power Supply 2301, Power Supply 2197* (LKB Bromma), *Liquid Scintillation Counter 1209 Rackbeta* (LKB Wallac), *ÄKTA-FPLC-Proteinreinigungsanlage* mit Zubehör, *Hofer-Gelgießapparatur Mighty Small SE245* und Gellaufkammer *SE250 Mighty Small II*, Kämmen und Spacer

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

**Berthold, Wildbad:** Hand-Fuß-Monitor *LB 1043 B*, Handmonitor *LB 1210 B*

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

**BIO-RAD, München:** Blotapparatur *Trans-Blot SD Semi-dry transfer Cell*

**Brand, Wertheim:** Glasgeräte

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

**Bühler, Tübingen:** *KL-2-* und *KS-15-Laborschüttler*

**Canon, Krefeld:** *PowerShot G2* Digitalkamera

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

**Eberhard-Karls-Universität, Werkstatt Pharmazie, Tübingen:** Flachbett-Gelelektrophoresekammern, Kämmen und Spacer für SDS-Gelelektrophorese, Schutzschilde für Radioaktiv-Teststände

**Eppendorf, Hamburg:** Thermo-Heizblock *3401* und *5320*, Thermomixer *5436*, Thermostat *5320*, Tischzentrifugen *3200, 5410, 5414* und *mini spin*, Kühlzentrifuge *5402*, Zentrifuge *HERMLE ZK 401, BioPhotometer*, Pipetten *Research* (0,1-2,5 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), *Reference* (0,5-10 µl), *Multipipette Plus*

**Fisher Scientific GmbH, Schwerte:** *Fisherbrand* Glasgeräte

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

**GE Healthcare, München:** *HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade*

**Gilson, Middleton (USA):** Pipetten *pipetman* (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)

**Heidolph, Schwabach:** *MR 2002* Laborrührer

**Heinemann, Schwäbisch Gmünd:** Zellpresse *French Pressure Cell Press* mit Zubehör

**Helmut Saur Laborbedarf, Reutlingen:** Vakuumzentrifuge *Typ BA-VC-300H*, Bachofer-Vacuum-Concentrator (*Speedvac*)

**Heraeus, Osterode:** *Megafuge 1.0 R (BS 4402/A), Varifuge 3.0, Laminair HLB2448, -80°C-Schrank Herafreeze*

**Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt:** *Pipetus-akku-Pipettierhilfe, Pipetus Classic II Reddot*

**Infors, Bottmingen (Schweiz):** *Unitron-Kühlbrutschrank*

**Junghans, Dunningen:** Stoppuhren

**Konica Minolta, München:** *Filmentwicklungsgerät Medical Film Processor QX-150 U*

**Kontron-Hermle, Gosheim:** *Centrikon H-401 und ZK401, Rotoren A6.14 (SS34) und A8.24*

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

**Liebherr, Kirchdorf an der Iller:** *Kühlschränke*

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

**Metrohm, Herisau (Schweiz):** *pH-Meter E512 und 605*

**Mettler-Toledo, Steinbach:** *Waage Mettler PL 200 (Tischwaage), pH-Elektrode Inlab 423*

**Millipore, Molsheim (Frankreich):** *Filter-Pinzette, Reinstwasseranlage MilliQ,*

*Vorreinigungsanlage ELIX, mit Quantum EX-Patronen*

**Moulinex, Ecully Cedex (Frankreich):** *Mikrowellengeräte Micro-Chef FM B935 Q und Compact Y 53*

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

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

**Promega, Madison (USA):** *Vac-Man (Vakuuman schlüsse zur Plasmidpräparation), Wizard Minicolumns (zur Proteinreinigung)*

**Sartorius, Göttingen:** *Analysenwaage handy, Tischwaage BP 2100 S*

**Schott, Mainz:** *Glasgeräte*

**Scotsman, Mailand (Italien):** *Eismaschine AF 100*

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

**TPP, Trasadingen (Schweiz):** *Zentrifugenröhrchen 50 ml*

**Vacuubrand, Wertheim:** *Membranvakuumpumpe*

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

**Wolf, Geislingen:** *Tischautoklav SANOclav*

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

**Zeiss, Oberkochen:** *UV-Spektrometer PM6, Mikroskop Axioskop 40*

## 2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

**Adefo-Chemie, Dietzenbach:** Fixierer- und Entwicklerkonzentrat

**AGS, Heidelberg:** Restriktionsendonucleasen mit 10x-Reaktionspuffern

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

**Amersham Biosciences, Freiburg:** [2,8-<sup>3</sup>H]-cAMP (Ammoniumsalz), *Hyperfilm ECL*, *ECL Plus Western Blotting Detection System*, *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*

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

**ASID BONZ, Herrenberg:** Handschuhe *ProLine Latex*

**Axygen Scientific, Union City (USA):** PCR-Tubes PCR-02-R

**Becton Dickinson (BD), Heidelberg:** Falcon-Tubes 15 ml und 50 ml, Einmalspritzen 10ml

**Biolog Life Science Institute, Bremen:** cAMP-Analoga u.a. cyclische Nucleotide

**BIO-RAD, München:** *BIO-RAD Protein Assay-Reagenz*, *Profinity<sup>TM</sup> IMAC Ni-Charged Resin*

**Biozym Diagnostics, Hess. Oldendorf:** *Sequagel XR*, *Sequagel Complete Buffer Reagent*, *Chill out 14 Liquid wax*

**B. Braun, Melsungen:** *Discofix-3-Wege-Hähne*

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

**Emerald Biosystems, Bainbridge Island (USA):** *Wizard I* und *II* Kristallisationskits

**Eppendorf, Hamburg:** Multipipettenspitzen

**Fluka BioChemika, Buchs (Schweiz):** Glutaraldehyd, Natriumdodecylsulfat, cAMP, Ethylenglykol, Glukose

**Fortuna, Wertheim:** Pasteur-Pipetten

**Greiner Labortechnik, Nürtingen:** Gewebekulturschalen, Petrischalen

**Hampton Research, Aliso Viejo (USA):** *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2*, *Crystal Screen Lite*, VDX 24-well Kristallisationsplatten, siliconized cover slides

**Hartmann Analytik, Braunschweig:** [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP

**ICN Biomedicals, Aurora (USA):** Ethidiumbromid-Tabletten

**Invitrogen, Karlsruhe:** AcTEV Protease, *pRSET A*-Expressionsvektor

**Kimberly-Clark, Roswell (USA):** *Kimtech<sup>Science</sup>*-Präzisionswischtücher, *Safeskin Satin Plus*-Latex-Untersuchungshandschuhe

**Macherey-Nagel, Düren:** *Nucleotrap*-Kit, Blotmembran *porablot PVDF* (2  $\mu$ m Porenweite)

**Merck, Darmstadt:** Aluminiumoxid 90% aktiv, pH-Papier Universalindikator pH 0-14, Glycerol 87%, Essigsäure 100%, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Natriumchlorid, Ammoniumsulfat, Ammoniumacetat, Natriumacetat, Natriumcitrat, Calciumchlorid-Dihydrat, Imidazol, D-Glukose, Ethanol, Methanol, Natriumhydroxid, DMSO, Harnstoff, Natriumpyrophosphat,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Chloroform, di-Natriumhydrogenphosphat, sonstige nicht aufgeführte Chemikalien

**Millipore, Molsheim (Frankreich):** Konzentratoren *Amicon Ultra-15 (Ultracel-5k)* und *ULTRAFREE-0.5*

**MWG Biotech, Ebersberg:** Oligonucleotide (PCR-Primer und fluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer [5'-IRD 800-Markierung])

**Nalge Nunc International, Rochester (USA):** Sterilfilter

**New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main:** Restriktionsendonucleasen mit 10x-Reaktionspuffern, *T4*-Polynucleotidkinase, Klenow-Polymerase, BSA 100x (10 mg/ml) für Molekularbiologie

**Novagen R&D Systems, Wiesbaden:** *pET16b*-Expressionsvektor, *E. coli BL21(DE3) [pRep4]*-Zellen

**Pall Life Sciences, Ann Arbor (USA):** *NANOSEP 10k OMEGA*-Proteinkonzentratoren

**PeqLab, Erlangen:** peq Gold Protein-Marker, dNTPs, peq Gold-Agarose

**Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston (USA):** *SUPER Polyethylen Vials* 20ml, *ULTIMA GOLD XR-LSC*-Szintillator

**Promega, Madison (USA):** Kits *Wizard Plus Minipreps* und *Wizard Plus SV Minipreps*, *Pfu*-DNA-Polymerase mit 10x-Reaktionspuffer, *T4*-DNA-Ligase

**Qbiogene, Heidelberg:** *Taq*-DNA-Polymerase mit 10x-Reaktionspuffer

**Qiagen, Hilden:**  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose, monoklonale Antikörper *mouse anti RGS-His<sub>4</sub>* und *Tetra-His*, *pQE60*-Expressionsvektor, *pRep4*, *Taq*-DNA-Polymerase mit 10x-Puffer

**Roche Diagnostics, Mannheim:** Restriktionsendonucleasen mit 10x Puffern, Alkalische Phosphatase, *Rapid DNA Ligation Kit*, Klenow-Polymerase,  $\lambda$ -DNA, AMP, ADP, ATP, GDP, GTP, dNTPs, Nucleoside und cyclische Nucleotide, *Complete EDTA-free* Proteaseinhibitor-tabletten, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, DTT, Eichproteine für Chromatographie (Aldolase, Katalase, Albumin, Cyt c, Chymotrypsinogen, Ferritin)

**Roth, Karlsruhe:** Brilliant Blue R250 und G250, Glycin, Ampicillin, Kanamycin, LB-Medium (Lennox), Aluminiumfolie, Isopropanol, Tris, Agarose *Rotigarose*, Essigsäure 100%

**Sartorius, Göttingen:** Cellulose-Nitrat-Filter 0,2 µm und 0,45 µm, Konzentratoren *Vivaspin 2* (10.000 MWCO PES)

**Serva, Heidelberg:** Dialyseschlauch *VISKING dialysis tubing 8/32* (Durchmesser: 6 mm) und *27/32* (Durchmesser: 21 mm), Polyethylenglycol, Glaswolle (silanisiert)

**Sigma-Aldrich, Steinheim und Seelze:** Tris, Tween 20, EDTA, TEMED, Bromphenolblau, Xylencyanol, Ethanol absolut, cAMP, cGMP, LB-Broth, LB-Agar (Lennox L agar), Polyethylenimin, Magnesiumformiat-Dihydrat, α-Monothioglycerol, Harnstoff, DMSO, APS, IPTG, X-Gal, Dowex 50WX4-400, Natriumcitrat, BSA, Tetracyclin

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

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

**TPP, Trasadingen (Schweiz):** Falcon-Tubes 15 ml und 50 ml

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

**Whatman International, Maidstone (England):** *Whatman 3 MM Chr 190 mm x 100 m-* Chromatographiepapier

## 2.3. Puffer und Lösungen

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde *MilliQ*-Wasser verwendet. Die pH-Werteinstellung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

### 2.3.1. Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Alle für molekularbiologische Arbeiten verwendeten Lösungen und Puffer wurden entweder sterilfiltriert (0,2 µm Porenweite) oder autoklaviert (20 min, 121°C, 1 bar).

#### 2.3.1.1. Lösungen zum Arbeiten mit DNA

##### TAE-Puffer

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

##### TE-Puffer

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

##### BX-Probenpuffer

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

##### 10x CM-Puffer

100 mM CaCl<sub>2</sub>  
400 mM MgCl<sub>2</sub>

##### dNTPs

20 mM pro dNTP

##### 10x Dephosphorylierungspuffer

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

## Material

---

10x Klenowpuffer BSA-frei  
200 mM Tris/HCl pH 7,9  
60 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Dithiothreitol

10x TBE-Puffer (LI-COR)  
1,34 M Tris  
440 mM Borsäure  
25 mM EDTA

### 2.3.1.2. Nährmedien für *E. coli*

LB-Medium  
20 g/l LB Broth

LB-Medium mit Antibiotika  
100 µg Ampicillin/ml Medium  
und/oder  
50 µg Kanamycin/ml Medium

LB-Plattenagar  
35 g/l LB Agar

LB-Plattenagar mit Antibiotika  
100 µg Ampicillin/ml Plattenagar  
und/oder  
50 µg Kanamycin/ml Plattenagar

### 2.3.2. Puffer und Lösungen für proteinchemische Methoden

#### 2.3.2.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

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

10x Hoefler-Laufpuffer  
192 mM Glycin  
25 mM Tris  
0,1% SDS

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

Coomassie-Färbelösung  
0,1% Brillant Blue R250  
40% Ethanol  
10% Eisessig

4x Probenpuffer  
130 mM Tris/HCl pH 6,8  
10% SDS  
10% β-Mercaptoethanol  
20% Glycerol  
0,06% Bromphenolblau

Entfärber  
10% Eisessig  
30% Ethanol

#### 2.3.2.2. Western Blot

Towbin-Transferpuffer  
25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20% Methanol

primäre Antikörper  
RGS-His<sub>4</sub>-Antikörper  
(monoklonal)  
0,04-0,2 µg/ml in M-TBS-T

TBS-Puffer  
20 mM Tris/HCl pH 7,6  
140 mM NaCl

Tetra-His-Antikörper  
(monoklonal)  
0,1 µg/ml in M-TBS-T

TBS-T

0,1% Tween 20  
in TBS-Puffer

M-TBS-T

5% Milchpulver  
in TBS-T-Puffer

sekundärer Antikörper

Ziege-anti-Maus  
(polyklonal), konjugiert mit  
Meerrettich-Peroxidase  
Verdünnung 1:5000 in M-TBS-T

2.3.2.3. Zellernte, Zelllyse und Proteinreinigung

Die pH-Werteinstellung erfolgte bei 4°C. Die Lösungen wurden auf 4°C gekühlt verwendet.

Zellysepuffer

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
20% Glycerol  
50 mM NaCl  
15 mM Imidazol pH 8,0 (Kristallisation)  
oder 25 mM Imidazol pH 8,0 (AC-Test)  
ev. *Complete EDTA-free* Proteaseinhibitor<sup>1</sup>

Pelletwaschpuffer

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
1 mM EDTA

Waschpuffer A

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
20% Glycerol  
400 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM Imidazol pH 8,0 (Kristallisation)  
oder 35 mM Imidazol pH 8,0 (AC-Test)

Waschpuffer C

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
20% Glycerol  
10 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
45 mM Imidazol pH 8,0 (Kristallis.)  
oder 75 mM Imidazol pH 8,0 (AC-Test)

Waschpuffer B

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
20% Glycerol  
400 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
35 mM Imidazol pH 8,0 (Kristallisation)  
oder 55 mM Imidazol pH 8,0 (AC-Test)

Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl pH 8,0  
20% Glycerol  
10 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
300 mM Imidazol pH 8,0

Dialysepuffer A

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
35% Glycerol  
10 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>

Dialysepuffer C

10 mM Tris/HCl pH 8,5 o. pH 9,0  
10% Glycerol  
10 mM NaCl  
0,05%  $\alpha$ -Monothioglycerol<sup>2</sup>

Dialysepuffer B

10 mM Tris/HCl pH 7,5  
10% Glycerol  
0,02%  $\alpha$ -Monothioglycerol<sup>2</sup>

<sup>1</sup> eine Tablette pro 50 ml Puffer (nach Herstellerangaben)

<sup>2</sup> immer frisch zugegeben

#### 2.3.2.4. Adenylatcyclasetest

Vom zu untersuchenden Protein wurde für den Test ein Master-Mix (Proteinlösung) hergestellt, das aus dem Protein (50-250 ng), dem 0,5-fachen des Gesamtvolumens an Glycerin (87%) sowie je einem Zehntel des Endvolumens an 1 M Tris/HCl pH 7,5 und BSA (10 mg/ml) zusammengesetzt war. Davon wurden für jede Probe jeweils 10 µl eingesetzt.

##### 2x AC-Cocktail

43,5% Glycerol  
100 mM Tris/HCl pH 7,5 bzw. andere Puffer für pH-Abhängigkeit  
1 mg/ml BSA  
25 mM MgCl<sub>2</sub>  
für regenerierendes System zusätzlich<sup>3</sup>: 0,23 mg/ml Kreatinkinase  
6 mM Kreatinphosphat

##### Stopp-Puffer

3 mM cAMP  
3 mM ATP  
1,5% SDS  
pH mit Tris auf 7,5 eingestellt

##### <sup>3</sup>H-cAMP-Lösung (interner Standard)

20 mM cAMP  
mit 10-20 kBq/ml [2,8-<sup>3</sup>H-cAMP] (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Salz)  
mit Tris-Lösung auf pH 7,5 eingestellt

##### 10x ATP-Substrat-Lösung

750 µM ATP pH 7,5  
inkl. 16-30 kBq [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP  
für Kinetik: zusätzlich 200 µM und 2,5 mM ATP pH 7,5

##### Nucleotidlösungen zur allosterischen Aktivierung

40 mM, 10 mM, 1 mM, 100 µM und 10 µM cAMP- bzw. cGMP-Lösungen pH 7,5

#### 2.3.2.5. Sonstige Puffer

##### 20x TEV-Puffer

1 M Tris/HCl pH 8,0  
10 mM EDTA

##### Laufpuffer für Superdex 200

10 mM Tris/HCl pH 8,5 oder 9,0  
10% Glycerol  
150 mM NaCl  
0,05%  $\alpha$ -Monothioglycerol<sup>2</sup>

##### Cross-Linking-Puffer

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,3  
20% Glycerol  
10 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>

Die Laufpuffer für die Äkta wurden durch einen 0,2 µm Filter filtriert und anschließend entgast.

---

<sup>3</sup> nur bei Test des ungereinigten Zellysats

## 2.4. Oligonucleotide

### 2.4.1. Klonierungsprimer

Durch PCR eingeführte Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen sind durch unterstrichene Großbuchstaben, eingeführte Mutationen durch fett geschriebene Großbuchstaben, zusätzlich eingeführte Nucleotide durch fett geschriebene Kleinbuchstaben und DNA-Sequenzen der PDE5 in kursiven Kleinbuchstaben dargestellt. Die Erkennungssequenz der TEV-Protease ist doppelt unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Position (Template)	Bemerkung
<i>Klonierungsprimer für PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimären</i>			
<b>PDE10 BamHI (s)</b>	aaa <u>GGA TCC</u> <b>atg</b> ttg aca gat gaa aaa gtg	1-21 (PDE10)	BamH I
<b>PDE10 SalI (as)</b>	aaa <u>GTC GAC</u> gcg aat tct atg ata cat att	1210-1230 (PDE10)	Sal I
<b>PDE10 GAFb D/A (as)</b>	aaa agc ttt gta aaa tgt ctt ttt gat att gtt tct cga cgc gaa ttc tat gat aca tat tag cac agt gta agg cta aag cac aaa aga cgg caa aca ttt tga agt tgt ttt <b>caG</b> ctg ttt tag a	1144-1267 (PDE10)	D397A- Mutation
<b>XhoBstAPI (s)</b>	aaa <u>CTC GAG</u> ctg tat <b>AAC AaG</b> tgg ggc aaa gaa gcc ttc tgt ctt agt <b>G</b>	31-49 an XhoBstAPI (as)	XhoI (RH-F-HQ zu NK-F-DE)
<b>XhoBstAPI (as)</b>	aaa <u>GCA AGA TTT GCt</u> gtt gca acc tcc <b>tCg tCa</b> cta aga cag aag gct t	31-49 an XhoBstAPI (s)	BstAPI (RH-F-HQ zu NK-F-DE)
<b>PDE10 V63 BamHI (s)</b>	aaa <u>GGA TCC</u> gtc agc agg tac caa gat	151-168 (PDE10)	BamH I
<b>PDE10 G73 BamHI (s)</b>	aaa <u>GGA TCC</u> gga gtt gta tat gaa cta	181-198 (PDE10)	BamH I
<b>PDE10 D87 BamHI (s)</b>	aaa <u>GGA TCC</u> gac aca gga gga gac aac	223-240 (PDE10)	BamH I
<b>PDE10A1 BamHI (s)</b>	aaa <u>GGA TCC</u> <b>atg aga atc gaa gaa</b> <b>cgc aaa agc cag cac tta acc ggc</b> ttg aca gat gaa aaa gtg aag	4-24 (PDE10)	BamH I
<b>PDE10A2 BamHI (s)</b>	aaa <u>GGA TCC</u> <b>atg gaa gac ggc cca</b> <b>tcc aac aac gca agc tgc ttc aga aga</b> <b>tta acc gaa tgc ttc tta agc cca agc</b> ttg aca gat gaa aaa gtg aag	4-24 (PDE10)	BamH I

Material

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Position (Template)	Bemerkung
<b>Klonierungsprimer für PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären</b>			
<b>PDE10 XbaI (as)</b>	aaa <u>TCT AGA</u> gca act atg tta tca aaa	744-761 (PDE10)	Xba I
<b>PDE10/5 Nterm (as)</b>	ata tac aac tcc atg atc aaa cct tgg ag	413-429 (PDE5)	Fusions-PCR
<b>PDE5/10 GAFa (s)</b>	agg ttt gat cat gga gtt gta tat gaa cta	181-198 (PDE10)	Fusions-PCR
<b>PDE10 NaeI (as)</b>	aaa <u>GCC GGC</u> cca ggc aag att tgc tgt	634-651 (PDE10)	Nae I
<b>PDE5 NaeI (s)</b>	aaa <u>GCC GGC</u> att gtt ctt cat aat gct	934-951 (PDE5)	Nae I
<b>PDE10 PDE5 KpnI (s)</b>	aaa <u>GGT ACC</u> aag ata cga ata tgc agg atg aag ggg acc agt gc	430-447 (PDE5)	Kpn I
<b>PDE5 SalI (as)</b>	aaa <u>GTC GAC</u> ctc cac tgc ttc ata cat	1522-1539 (PDE5)	Sal I (von S. Bruder)
<b>PDE5-PDE10 StuI (as)</b>	aaa <u>AGG CCT</u> ctg cat acc tgc acc tga tgt att gct act gaa caa aat gcc aaa taa gc	913-930 (PDE5)	Stu I
<b>PDE5 BglII (s)</b>	aaa <u>AGA TCT</u> atg gag cgg gcc ggc ccc	1-18 (PDE5)	Bgl II (von S. Bruder)
<b>PDE5 T121 BglII (s)</b>	aaa <u>AGA TCT</u> act gtg agc ttc ctc tct gac	361-381 (PDE5)	Bgl II (von S. Bruder)
<b>PDE10/5 Linker (as)</b>	tag aga atc tat aga ttg ttg ttc ttc aaa	1021-1038 (PDE5)	Fusions-PCR
<b>PDE5/10 GAFb (s)</b>	gaa caa caa tct ata gat tct cta ctt gaa	763-780 (PDE10)	Fusions-PCR
<b>PDE11 MfeI (as)</b>	ttt <u>CAA TTG</u> gta caa ttt ccc aaa	1415-1438 (CyaB1)	MfeI (von M. Groß- Langenhoff)
<b>T7 (s)</b>	taa tac gac tca cta tag gg	20-39 (pRSET A)	
<b>Klonierungsprimer für Kristallisationskonstrukte</b>			
<b>PDE10 BamTEV (as)</b>	aaa <u>GGA TCC tcc ctg gaa gta taa</u> <u>gtt ctc</u> gca ctc tga gtg gcg aat	1225-1242 (PDE10)	BamH I TEV-Schnittstelle
<b>PDE10 NcoI Kris (s)</b>	aaa <u>CCA TGG</u> tca gca ggt acc aag at	151-168 (PDE10)	Nco I
<b>PDE10 NcoI KrisI (s)</b>	aaa <u>CCA TGG ATG</u> agg tac caa gat acg	157-171 (PDE10)	Nco I

Tab. 2-1 Klonierungsprimer  
(s) sense Primer; (as) antisense Primer

2.4.2. Sequenzierprimer

Bezeichnung	Orientierung	T <sub>m</sub>	Sequenz (5'→3')	Position	Zielsequenz
<b>T3</b>	s	56°C	aat taa ccc tca cta aag gg	772-791	pBSKII (-)
<b>T7</b>	as	56°C	taa tac gac tca cta tag gg	626-645 20-39 351-370	pBSKII (-) pRSET A pET16b-MCS- pQE60
<b>R-800-pETMCS- pQE30</b>	as	56°C	acc cct caa gac ccg ttt aga	192-212	pET16b-MCS- pQE60
<b>pRSET reverse</b>	as	56°C	tag tta ttg ctc agc ggt gg	295-314	pRSET A
<b>U-IR-800 CyaB1-PAS2</b>	s	56°C	gct tgt cag atg ctg taa ttt c	1190-1211	<i>cyaB1</i> Holo
<b>R-IR-800 CyaB1-GAF</b>	as	56°C	act ttt atg att agc atc acc	1279-1299	<i>cyaB1</i> Holo
<b>U-IR-800 CyaB1-Kat</b>	s	56°C	gat gcc tta atg gtt ggt g	1768-1786	<i>cyaB1</i> Holo
<b>U-IR-800 PDE5 GAF</b>	s	56°C	cat gat gaa ggg gac cag tgc t	427-448	PDE5 Holo

Tab. 2-2 Fluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer

2.5. Plasmide

Für diese Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet: *pBluescript II SK (-)* (Stratagene) und *pRSET A* (Invitrogen). Die genauen Beschreibungen der Plasmide finden sich auf den Homepages der entsprechenden Hersteller. Ein *pET16b*-Vektor (Novagen) mit der MCS des *pQE60*-Vektors (Qiagen) wurde von Anita Schultz kloniert (Abb. 2-1).

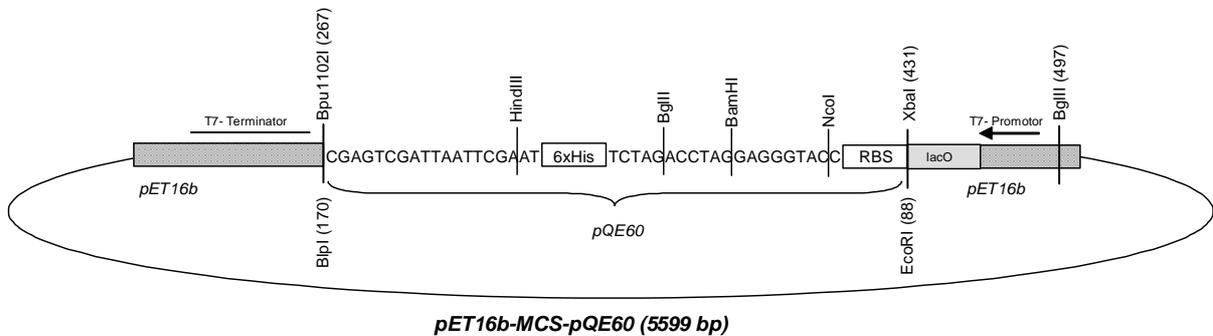


Abb. 2-1 Konstruierter pET16b-MCS-pQE60-Vektor (von Anita Schultz)

### 3. Methoden

#### 3.1. Gentechnologische Methoden

##### 3.1.1. Plasmidisolierung aus *E. coli*

In mit Antibiotika versetztem LB-Medium (5 ml) wurde über Nacht ein Einzelklon oder eine Dauerkultur bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Von der gewachsenen Zellkultur wurden 3-5 ml pelletiert und das darin enthaltene Plasmid nach dem Protokoll des *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification*-Kits isoliert und gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl TE-Puffer, wenn sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion anschloss, oder mit 50 µl Wasser eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C oder -20°C.

##### 3.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente mittels spezifischer Primer der Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte, die für die anschließende Konstruktion verschiedener Chimären, der Einführung von Punktmutationen oder Schnittstellen für Restriktionsenzyme sowie zum Austausch kleiner DNA-Bereiche genutzt wurden.

Für einen PCR-Ansatz mit dem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 5-50 ng (*Taq*-Polymerase) oder 25-100 ng (*Pfu*-Polymerase) zu amplifizierende DNA (Plasmid-DNA nach Plasmidisolierung, siehe 3.1.1.) als Template, je 1,25 µl der beiden spezifischen Primer (je 20 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (je 20 mM), 5 µl des 10x Reaktionspuffers mit MgCl<sub>2</sub> (2 mM) und 1 U *Taq*-Polymerase bzw. 2 U *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Bei der Negativkontrolle wurde statt des Templates Wasser zugegeben. Die Reaktion fand in einem Thermocycler mit dem folgenden Programm statt (Tab. 3-1):

Temperatur	Dauer	Zyklen	Phase
95°C	5 min		initiale Denaturierung
95°C	1 min	30-35	Denaturierung
variabel	1 min		Annealing
72°C	1 min 20 s		Elongation
72°C	10 min		finale Elongation
4°C	Pause		Kühlen

Tab. 3-1 PCR-Programm

Die Annealingtemperatur der Primer wurde nach folgender Formel berechnet:

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

Unterschieden sich die Annealingtemperaturen der beiden verwendeten Primer voneinander, so wurde mit der niedrigeren Temperatur gearbeitet. Bei Verwendung sehr langer Primer wurde ein Temperaturgradient zur Erleichterung des Annealings gewählt. Die ersten 5 Zyklen liefen bei einer meist um 7°C geringeren Annealingtemperatur (z.B. 43°C) als die darauf folgenden 25 Zyklen (z.B. 50°C).

Einer Fusions-PCR gingen immer zwei PCR-Reaktionen voraus, in denen zunächst zwei DNA-Fragmente mit Hilfe der entsprechenden Primer synthetisiert wurden. Die beiden erhaltenen DNA-Fragmente können an einem Ende hybridisieren. Damit dienten sie in einer weiteren PCR-Reaktion, der Fusions-PCR, der Synthese des gewünschten DNA-Fragments, indem die fehlenden DNA-Stränge nach Hybridisierung beider Fragmente synthetisiert wurden. Zur Vervielfältigung der entstandenen Stränge enthielt der PCR-Ansatz zwei flankierende Primer. Bei einer Fusions-PCR wurde ebenfalls wie oben ein Temperaturgradient verwendet.

Die nach einer PCR erhaltenen PCR-Produkte wurden durch eine anschließende Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt.

### 3.1.3. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden PCR-Produkte oder durch Restriktionsenzyme verdaute DNA überprüft, nach ihrer Größe aufgetrennt oder gereinigt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit BX-Puffer im Verhältnis von 3:1 (DNA:BX-Puffer) versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 80-105 V in 1x TAE-Puffer für 30-60 min aufgetrennt. Es folgte die Inkubation des Gels für etwa 2 min in einem Ethidiumbromidbad (10 µg/100 ml Wasser). Nach weiteren 10 min Elektrophorese wurde die DNA im UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) detektiert. Als Größenmarker dienten eine mit *EcoRI/HindIII*-verdaute  $\lambda$ -DNA ( $\lambda$ -Marker) sowie das *MspI/SspI*-verdaute Plasmid *pBluescript II SK (-)* ( $\pi$ -Marker) (Tab. 3-2).

$\lambda$ -Marker (in bp)	$\pi$ -Marker (in bp)
21226	489
5148	404
4973	312
4268	270
3530	242/241
2027	215
1904	190
1584	157
1375	147
947	110
831	67
564	57
125	34
	26

Tab. 3-2 Größenmarker für die Agarosegelelektrophorese

Für die Herstellung eines Agarosegels wurde die entsprechende Menge an Agarose unter Erwärmen in 60 ml 1x TAE-Puffer gelöst und anschließend in einem Gelschlitten abgekühlt. Dabei richtete sich der Agarosegehalt des Gels nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (Tab. 3-3). Je kleiner die zu trennenden Fragmente, umso höher die Agarosekonzentration.

Agarosekonzentration (in % w/v)	effizienter Auftrennungsbereich linearer DNA-Moleküle (in kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2	0,1-2

Tab. 3-3 Übersicht über die Agarosekonzentration in Abhängigkeit von der Fragmentgröße [95]

### 3.1.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

#### 3.1.4.1. *NucleoTrap*®

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem *NucleoTrap*®-Kit nach Protokoll gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit 20-50  $\mu$ l Wasser. Die erhaltene DNA wurde bei 4°C (überhängende Enden) oder bei -20°C (glatte Enden) gelagert.

### 3.1.4.2. Glaswolle

Sehr kleine DNA-Moleküle (z.B. 70-80 bp) wurden mit Hilfe von Glaswolle aus dem Agarosegel isoliert. Diese Methode nutzt die Eigenschaft von DNA, an vorbehandelte Glaswolle zu binden. Dazu wurde in den Boden eines Eppi-Cups ein Loch gestochen, über das die Glaswolle und danach das Agarosegelstück gegeben wurden. Das Ganze wurde für 30-60 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Dann wurde das Eppi-Cup auf einem weiteren Eppi sitzend für mindestens 10 min bei 14000 rpm (12000xg) zentrifugiert. Das Volumen der erhaltenen DNA-Lösung wurde mit Hilfe einer Pipette bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe des 0,375-fachen des Gesamtvolumens einer 10 M Ammoniumacetat-Lösung. Nach dem Vortexen wurde die DNA mit Ethanol wie unter 3.1.5.2. beschrieben, gefällt. Die DNA wurde am Ende in 50  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen.

### 3.1.5. Reinigung, Entsalzung und Aufkonzentrierung von DNA

#### 3.1.5.1. Entsalzung

Mit dem unter 3.1.4.1. beschriebenen Kit konnte DNA auch entsalzt bzw. umpuffered werden. Dazu wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren. Eine Umpufferung war erforderlich, wenn mehrere Reaktionsschritte in verschiedenen Puffern (Mehrfachverdau oder vor Ligation nach Phosphorylierung oder Dephosphorylierung) aufeinander folgten. Elution und Lagerung stimmen mit Punkt 3.1.4.1. überein.

#### 3.1.5.2. Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Beseitigung von Proteinverunreinigungen aus Nucleinsäurelösungen. Dies war vor allem nach der Plasmidisolierung (siehe 3.1.1.) aus *E. coli* BL21 (DE3) [pRep4] erforderlich, da sonst ein schneller DNA-Abbau erfolgte. Dazu wurde zur eluierten DNA das gleiche Volumen Phenol, gesättigt mit Tris/HCl pH 8,0, gegeben. Es folgten 30-60 s Vortexen und Zentrifugation bei 14000 rpm (12000xg) für 1 min. Dabei kam es zu einer Phasentrennung. Es bildete sich eine untere organische Phase, eine weiße Interphase mit den Proteinen und eine obere wässrige Phase, die die DNA enthielt. Letztere wurde vorsichtig abgenommen. Zur Beseitigung von Phenolresten aus der wässrigen DNA-Lösung wurde diese

anschließend zwei- bis dreimal mit dem gleichen Volumen eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) ausgeschüttelt und zentrifugiert.

Die so gereinigte DNA wurde danach durch Ethanol-fällung aufkonzentriert. Dazu wurde zunächst das Volumen der wässrigen DNA-Lösung mit Hilfe einer Pipette bestimmt. Anschließend wurde das 0,1-fache Volumen der DNA-Lösung einer 3 M Natriumacetat- oder das 0,375-fache Volumen einer 10 M Ammoniumacetat-Lösung sowie das 2,5-fache des Gesamtvolumens an 96%igem Ethanol (4°C) zugegeben, gemischt und der Reaktionsansatz bei RT für 30-60 min inkubiert. Der nach 20-30 minütiger Zentrifugation (14000 rpm bzw. 12000xg, 4°C) erhaltene weiße Niederschlag wurde anschließend mit 500 µl 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen und für 10 min wie zuvor zentrifugiert. Nach der Trocknung des Niederschlages bei RT wurde die DNA in 20-40 µl Wasser aufgenommen.

Als Alternative zur Phenol-Chloroform-Extraktion erhält man durch die Verwendung des *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification*-Kits (nach Protokoll des Herstellers verfahren) bereits bei der Plasmidisolierung (siehe 3.1.1.) aus *E. coli BL21 (DE3) [pRep4]* ebenfalls eine gereinigte, stabile DNA unter geringerem Zeitaufwand. Dieser Kit enthält eine Alkalische Protease, die Endonucleasen und andere Proteine, freigesetzt durch die Zelllyse, inaktiviert.

### 3.1.5.3. Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen

Für manche Reaktionen war eine Aufkonzentrierung wässriger DNA-Lösungen notwendig. Dies erfolgte in der *SpeedVac* bei 30-35°C und ca. 100 mbar für 5-20 min.

### 3.1.6. Konzentrationsbestimmung von wässrigen DNA-Lösungen

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis der OD-Werte bei 260 und 280 nm ( $OD_{260/280}$ ) konnte eine Aussage über eine mögliche Verunreinigung der DNA mit Proteinen getroffen werden, da die aromatischen Aminosäuren bei  $\lambda=280$  nm absorbieren. Für eine reine DNA-Lösung liegt das Verhältnis  $OD_{260/280}$  bei 1,8. Als eine weitere Möglichkeit der DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.3.) durch Vergleich der Bandenintensität mit einem aufgetragenen Größenmarker genutzt. Dies wurde vor allem vor einer Ligation bei Fragmenten nach einem Restriktionsverdau angewendet.

### 3.1.7. Restriktionsverdau von DNA

Ein typischer Verdauansatz umfasste in einem Volumen von 10  $\mu$ l 200-800 ng Plasmid-DNA oder PCR-Produkt, 0,2-0,4  $\mu$ l Restriktionsenzym, das 1,5-fache Enzymvolumen an BSA (10 mg/ml), falls zur Stabilisierung mancher Enzyme erforderlich, und den 10x Reaktionspuffer. Der Verdauansatz wurde für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Wenn größere verdaute DNA-Mengen notwendig waren, wurde meist über Nacht verdaut. Durch eine Agarosegelelektrophorese wurde die verdaute DNA aufgetrennt. Gewünschte DNA-Fragmente wurden dann, wie unter 3.1.4. beschrieben, aus dem Gel isoliert.

### 3.1.8. Glätten von überhängenden DNA-Enden

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* wurde verwendet, um Überhänge an DNA-Enden, erzeugt durch einen Restriktionsverdau oder durch PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase, aufzufüllen und somit glatte (*blunt*) Enden zu erzeugen. Dazu wurden 6,7-7,2  $\mu$ l DNA (0,5-1  $\mu$ g) mit 0,8 U Klenowenzym, 1  $\mu$ l 10x Klenowpuffer und 0,5  $\mu$ l BSA (10 mg/ml) in einem Volumen von 10  $\mu$ l versetzt. Um vorhandene 3'-Überhänge zu entfernen, wurde zunächst für 10 min bei 37°C inkubiert. Zum Auffüllen von 5'-Enden und zum Ersetzen von zuviel abgespaltenen Nucleotiden wurde dann 1  $\mu$ l dNTP-Mix (je 20 mM) zugegeben und der Ansatz für weitere 30-40 min bei 37°C inkubiert. Die Denaturierung des Enzyms erfolgte durch anschließendes Erhitzen auf 70°C für 10 min.

### 3.1.9. 5'-Phosphorylierung

Zur Ligation von PCR-Produkten in einen dephosphorylierten Vektor müssen diese am 5'-Ende phosphoryliert sein. Mit Hilfe der *T4-Polynucleotidkinase* können 5'-Phosphatreste eingeführt werden. Dazu wurden 10  $\mu$ l Klenow-Ansatz oder das gereinigte PCR-Produkt nach PCR mit der *Pfu*-Polymerase mit 7-10 U *T4-Polynucleotidkinase* (PNK), 1,5  $\mu$ l 10x PNK-Puffer und 1,5  $\mu$ l 10 mM ATP in einem Volumen von 15  $\mu$ l für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Enzym durch Erhitzen bei 70°C für 10 min inaktiviert oder der Reaktionsansatz, wie unter 3.1.5.1. beschrieben, entsalzt.

### 3.1.10. 5'-Dephosphorylierung

Durch einen Restriktionsverdau linearisierte Plasmide müssen an ihren 5'-Enden dephosphoryliert werden, um eine Religation zu verhindern. Dies wird erreicht durch eine Behandlung mit Alkalischer Phosphatase. Dazu wurde das Plasmid in einem Ansatz mit dem doppelten Volumen der eingesetzten Plasmid-Lösung für 1 h bei 37°C mit 1 U Alkalischer Phosphatase in 10x Reaktionspuffer behandelt. Im Anschluss daran wurde die Plasmid-DNA mit dem *NucleoTrap*-Kit entsalzt (siehe 3.1.5.1.).

### 3.1.11. DNA-Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten (Insert) und einem linearisierten Plasmidvektor wurde das *Rapid DNA Ligation Kit* nach Herstellerangaben verwendet. In einem Ligationsansatz wurden stets 50 ng Vektor eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert variierte zwischen 1:1 bis 1:3. Die Dauer der Ligation betrug in der Regel 30 min bei RT.

### 3.1.12. Transformation von *E. coli*

#### 3.1.12.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Um die Bakterienzellen für eine spätere Transformation kompetent zu machen, wurde  $\text{CaCl}_2$  eingesetzt.

Mit einer Dauerkultur wurden zunächst 5 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln kultiviert. Bei *E. coli XLI Blue*-Zellen wurde Tetracyclin (10 µg/ml), bei *BL21 (DE3) [pRep4]*-Zellen Kanamycin (50 µg/ml) und bei *DH5α*-Zellen kein Antibiotikum zugesetzt. Die Vorkultur wurde dann zu 200 ml frischem LB-Medium gegeben und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5-0,6 inkubiert (ca. 2-3h). Ausschließlich bei *BL21 (DE3) [pRep4]*-Zellen erfolgte ein Antibiotika-Zusatz mit Kanamycin. Die Zellen wurden anschließend für mindestens 10 min auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 4300 rpm (3200xg), 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  (steril, 4°C) resuspendiert und für weitere 20 min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wie zuvor wurde das Zellpellet in 10 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ /20% Glycerol (steril, 4°C) resuspendiert und für 4-6 h auf Eis unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden nach Aliquotierung auf je 100 µl bei -80°C gelagert.

Die Kompetenz der Zellen wurde in einer Testtransformation überprüft. Dazu wurde 1 µl des leeren Vektors *pBSKII* (-) (1 ng/µl) zu einem Aliquot der hergestellten kompetenten Zellen gegeben. Als Positivkontrolle wurde mit bereits getesteten kompetenten Zellen parallel verfahren. Das Ganze wurde dann für 20 min auf Eis, 1 min bei 42°C und wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml frischem LB-Medium erfolgte die Inkubation der Zellen für mindestens 1 h bei 37°C unter Schütteln. Davon wurden anschließend 110 µl auf eine Agarplatte (*DH5α* und *XL1*: Ampicillin, *BL21 (DE3) [pRep4]*: Ampicillin/Kanamycin) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Wenn am nächsten Morgen mindestens 150 Klone auf der Platte gewachsen waren, konnten die hergestellten kompetenten Zellen für eine Transformation verwendet werden.

### 3.1.12.2. Standardtransformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurde der Ligationsansatz (siehe 3.1.11.) mit 10 µl 10x CM-Puffer versetzt und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Dies wurde komplett auf 100 µl auf Eis leicht angetaute kompetente *E. coli*-Zellen gegeben und kurz gemischt. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 20 min auf Eis, 1 min bei 42°C und für weitere 10 min auf Eis. Anschließend wurden 500 µl frisches LB-Medium zugegeben und die Zellen für mindestens 75 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von diesen wurden 100-250 µl auf eine Agarplatte, das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthaltend, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei einer Retransformation eines Plasmids in *E. coli*-Zellen wurde 1 µl der DNA-Lösung (nach Plasmidisolierung, siehe 3.1.1.) auf 100 µl kompetente Zellen gegeben und wie oben beschrieben, weiter verfahren.

### 3.1.12.3. *E. coli*-Dauerkulturen

Zur Lagerung wichtiger Einzelklone wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, mit einem Einzelklon angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. 1,5-3 ml der Übernachtskultur wurden am nächsten Tag abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde dann in 750 µl frischem LB-Medium resuspendiert und zur Lagerung bei -80°C mit 250 µl 87 % Glycerol (steril) versetzt.

### 3.1.12.4. Blau-Weiß-Screen

Zur Unterscheidung der Bakterienzellen mit rekombiniertem *pBSKII* (-)- Vektor von jenen mit religiertem Vektor wurde ein Blau-Weiß-Screen durchgeführt. Dafür wurden transformierte *E. coli XL1 Blue*-Zellen nach ihrer Kultivierung (37°C, ca. 75 min) auf eine Agarplatte mit 40 µl 2% X-Gal und 40 µl 0,1 M IPTG ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht erschienen die Klone mit Insert weiß und diejenigen ohne Insert blau.

### 3.1.13. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Didesoxy-Verfahren nach Sanger durchgeführt [96]. Dazu fand der *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* Verwendung. Dieser Kit enthielt vier Reaktionslösungen mit je einem ddNTP, den vier dNTPs, der *Thermo Sequenase DNA-Polymerase*, Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub> und Pyrophosphatase. Jeweils 2 µl jeder der vier Reaktionslösungen wurden mit 3 µl des folgenden Mixes vermischt:

- DNA nach Plasmidisolierung (1,5-4 µg DNA aus *E. coli XL1 Blue*; 2-7 µg DNA aus *E. coli BL21 (DE3) [pRep4]*)
- 1 bzw. 1,3 µl Sequenzierprimer (5'-IRD 800-markiert, 2 bzw. 4 µM bei T7, siehe 2.4.2.)
- 0,7 µl DMSO
- Wasser ad 13 bzw. 17 µl

Jeder Reaktionsansatz wurde anschließend mit je einem Tropfen *Chill-Out 14 Liquid Wax* überschichtet und kurz zentrifugiert. Die Reaktion wurde dann auf dem TRIO-Thermoblock *Thermocycler* unter dem in Tab. 3-4 angegebenen Programm gestartet.

Temperatur	Dauer	Zyklen	Phase
95°C	2 min		initiale Denaturierung
95°C	20 s		Denaturierung
56°C	20 s	20-25	Annealing
72°C	30 s		Elongation
4°C	Pause		Kühlen

Tab. 3-4 PCR-Programm für die DNA-Sequenzierung

Nach Ende der Reaktion wurden zu jedem Ansatz 6 µl Formamid-Stoppuffer gegeben und kurz zentrifugiert. Auf ein 6% Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff wurden dann von jeder Probe 1-1,2 µl aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung im *LI-COR*-Sequenator erfolgte bei 50°C, 50 W, einer maximalen Spannung von 1500 V und einer Stromstärke von 37 mA. Das

erhaltene Sequenzierergebnis wurde mit der *BaseImagIR version 4.0*- und der *DNA-Star*-Software ausgewertet.

### 3.2. Proteinchemische Methoden

#### 3.2.1. Proteinexpression in *E. coli*

Alle klonierten Konstrukte wurden in *E. coli BL21 (DE3) [pRep4]* exprimiert. Für die Expression wurde eine Vorkultur von 50-150 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Mit der entsprechenden Dauerkultur angeimpft, wurde die Vorkultur über Nacht bei 30°C oder 37°C unter Schütteln kultiviert. Von der gewachsenen Vorkultur wurden dann 1-14 ml in jeweils 200 ml vorgewärmtes und wie oben mit Antibiotika versetztes LB-Medium überimpft. Bei 30°C unter Schütteln (210 rpm) wurden die Hauptkulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Bei dieser OD<sub>600</sub> wurde die gewünschte Expressionstemperatur eingestellt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 wurde mit 100-400 µM IPTG induziert. Ebenso wurde, außer bei Konstrukten ohne CyaB1 AC, jeweils 1 ml 2 M MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Bei einer Expressionstemperatur von 19°C erfolgte die Expression über Nacht (12-20 h) und bei 24°C für 5-7 h.

#### 3.2.2. Zellernte

Zur Ernte wurden die Zellen für 10 min bei 5000 rpm (4100xg) und 4°C zentrifugiert. Die Pellets von je 800 ml Zellkultur wurden in 50 ml Pelletwaschpuffer auf Eis resuspendiert und für 20 min bei 5000 rpm (4300xg) und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets bei -80°C gelagert oder sofort lysiert.

#### 3.2.3. Zelllyse

Das Zellpellet wurde in 25-30 ml Zelllysepuffer unter Vortexen resuspendiert. Bei manchen Konstrukten wurden dem Puffer *Complete EDTA-free* Proteaseinhibitor-Tabletten zugesetzt. Die resuspendierten Zellen wurden in zwei Durchgängen mit Hilfe der *French Press* bei einem Druck von ca. 1000 psi lysiert. Anschließend erfolgte zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile eine Zentrifugation für 45-60 min bei 18500 rpm (41300xg) und 4°C. Der Überstand, der alle löslichen Proteine enthielt, wurde in ein Falcon überführt und weiter aufgereinigt. 100 µl des Überstandes wurden als Probe für die SDS-PAGE aufbewahrt. Vom

Zellpellet wurde ebenfalls für die Analyse auf dem SDS-Gel eine Spatelspitze abgenommen und in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert.

### 3.2.4. Proteinreinigung

#### 3.2.4.1. Reinigung mit Ni<sup>2+</sup>-IDA

Hauptsächlich erfolgte die Proteinreinigung in dieser Arbeit mit Ni<sup>2+</sup>-IDA. Diese ist Bestandteil einer Matrix, in der Ni<sup>2+</sup> an den Chelatliganden Iminodiacetat (IDA) gebunden ist. Über die drei freien Koordinationsstellen des Ni<sup>2+</sup> können Proteine über ihren His-Tag am N- oder C-Terminus selektiv gebunden werden. Dieses Prinzip wird für die Aufreinigung von Proteinen mit einem His-Tag durch die immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) genutzt. Damit wird die Abtrennung unerwünschter Proteine, welche keinen His-Tag besitzen, ermöglicht.

Durch die Verwendung der Expressionsvektoren *pRSET A* und *pET16b-MCS-pQE60* trugen die exprimierten Proteine an ihrem N- bzw. C-Terminus einen His<sub>6</sub>-Tag. Mit diesem war eine Reinigung der gewünschten Proteine durch Metallaffinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-IDA möglich. Dazu wurde der Überstand nach der Zellyse (siehe 3.2.3.) mit 250 µl des *Profinity<sup>TM</sup> IMAC Ni-charged Resin* (Ni<sup>2+</sup>-IDA) versetzt. Zuvor wurde das Nickelmaterial in 750 µl Zellysepuffer (mit 15 oder 25 mM Imidazol) voräquiliert, um die unspezifische Bindung von *E. coli*-Proteinen im Überstand an das Nickelmaterial zu reduzieren bzw. zu verhindern. Aus diesem Grund enthielt für die Nickelbindung auch der Überstand nach Zellyse durch den Zellysepuffer 15 bzw. 25 mM Imidazol. Nach der Zugabe des Nickelmaterials zum Überstand erfolgte eine Inkubation für 2-4 h auf Eis unter Schütteln. Danach wurde das Nickelmaterial mit den gebundenen Proteinen für 5 min bei 2500 rpm (1100xg) und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bei Konstrukten für die Kristallisation erneut in ein bis drei Durchgängen mit Ni<sup>2+</sup>-IDA für 2-4 h oder über Nacht inkubiert. Vom Überstand nach der Zentrifugation wurden 100 µl zur Analyse mittels SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt. Das Pellet aus Nickelmaterial und gebundenen Proteinen wurde auf eine Säule des *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification-Kits* mit aufgeschraubter 10 ml-Spritze gegeben. Danach folgten mehrere Waschschrte mit verschiedenen Waschpuffern mit aufsteigender Imidazolkonzentration:

- 2x 6 ml Waschpuffer A
- 2x 4 ml Waschpuffer B
- 2x 4 ml Waschpuffer C
- 1x 300 µl (oder 2x 500 µl bei Proteinen für die Kristallisation) Elutionspuffer

Die Eluate wurden nochmals über die Säule gegeben, um eine höhere Proteinausbeute zu erreichen. Die gereinigten Proteinlösungen wurden entweder zur Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  direkt mit Glycerol ad 35% versetzt oder dialysiert (siehe 3.2.5.).

### 3.2.4.2. Reinigung mit $\text{Ni}^{2+}$ -NTA

Einige Konstrukte (siehe 3.5.2.1 und 3.5.2.2.) wurden zu Beginn dieser Arbeit mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose aufgereinigt. Diese enthält Nitrilotriacetat, welches über komplex gebundenes  $\text{Ni}^{2+}$  ebenfalls Proteine mit einem His-Tag binden kann. Zur Bindung wurde der Überstand nach Zellyse (Zellysepuffer mit 15 mM Imidazol) mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (in 900  $\mu\text{l}$  Zellysepuffer voräquilibriert) für 2-4 h wie unter 3.2.4.1. inkubiert, zentrifugiert, gereinigt und anschließend dialysiert. Allerdings wurden hier andere Waschpuffer verwendet:

- 2x 3 ml Zellysepuffer (35 mM Imidazol)
- 2x 4 ml Waschpuffer A (70 mM Imidazol)
- 2x 3 ml Waschpuffer C (70 mM Imidazol)
- 1x 300  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer

### 3.2.5. Dialyse

Um vorhandenes Imidazol zu entfernen oder um einen vollständigen Pufferwechsel zu erreichen, wurde das gereinigte Protein (0,3-4 ml) in einem Dialyseschlauch (*VISKING dialysis tubing 8/32* oder *27/32*) bei  $4^{\circ}\text{C}$  in 300-500 ml Dialysepuffer für mindestens 2 h dialysiert. Dabei wurde der Puffer nach 1 h erneuert. Erfolgte die Dialyse über Nacht, so wurde ein Volumen von 0,8-1 l verwendet. Proteine für den Adenylatcyclasetest (siehe 3.3.) wurden sofort nach der Reinigung in Dialysepuffer A und Proteine für die Kristallisation (siehe 3.4.) in Dialysepuffer B oder C dialysiert.

### 3.2.6. Aufkonzentrieren

Nach der Dialyse wurden die Proteine zur Kristallisation je nach Proteinvolumen in verschiedenen Filtersystemen aufkonzentriert. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Volumina von 50-500  $\mu\text{l}$  wurden in *NANOSEP 10k OMEGA*- oder *ULTRAFREE-0.5*-Proteinkonzentratoren bei 10000-11000 rpm (*Kühlzentrifuge 5402, Eppendorf*) und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das Aufkonzentrieren von 2-15 ml Proteinlösungen erfolgte in *Vivaspin 2*- oder

*Amicon Ultra-15*-Konzentratoren durch Zentrifugation bei 4200 rpm (*Megafuge 1.0 R*, *Heraeus*) und 4°C bis zum gewünschten Volumen bzw. Konzentration. Zu Beginn wurde die Filtermembran immer mit Dialysepuffer gewaschen, bevor das Protein in den Konzentrator gegeben wurde.

### 3.2.7. Bradford-Test

Zur Bestimmung der Konzentration einer Proteinlösung nach dem Prinzip von M. Bradford [97] wurde das *BIO-RAD Protein Assay*-Reagenz verwendet. 0,5-30 µl einer Proteinlösung wurden mit Wasser auf ein Volumen von 800 µl gebracht und anschließend mit 200 µl *BIO-RAD*-Reagenz versetzt. Nach dem Vortexen wurde der Ansatz für 5 min inkubiert. Es folgte eine Vermessung der Lösungen bei  $\lambda=595$  nm. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden Ansätze mit 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 µg BSA vermessen.

### 3.2.8. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und anhand dessen auch dem Nachweis und der Identifizierung einzelner Proteine. Hier wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli [98] mit einem Tris/HCl-Tris/Glycin-Puffersystem verwendet. Zunächst wurde das Polyacrylamidgel nach Tab. 3-5 in einer *Hofer*-Gelgießapparatur gegossen:

	Trenngel pH 8,8			Sammelgel pH 6,8
	7,5%	12,5%	15,0%	4,5%
Trenngelpuffer	3 ml	3 ml	3 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	1 ml
H <sub>2</sub> O	6 ml	4 ml	3 ml	2,4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 30%	3 ml	5 ml	6 ml	0,6 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS (10%)	80 µl	80 µl	80 µl	50 µl

Tab. 3-5 Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele

Die angegebenen Mengen sind für zwei Gele ausreichend. Je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine wurden 7,5-15 % Trenngele eingesetzt.

Die Proteinproben (10-15 µl) wurden mit 5 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Wenn nicht anders angegeben, wurden immer 2 µg des

gereinigten Proteins, vom Überstand nach Zellyse und Zentrifugation bzw. nach Nickelbindung 3 µg und vom Zellpellet 8 µg aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x *Hoef*er-Laufpuffer in einer *Hoef*er-Vertikalelektrophoresekammer bei 200-240 V und 20-30 mA/Gel. Danach wurde das Gel entweder für einen Western Blot weiterverwendet oder in einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. Nach der Entfärbung in einer Entfärber-Lösung und anschließend in Wasser wurde das Gel mit Hilfe der *Biocapt Software* dokumentiert.

Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine wurden 5-6 µl Protein-Marker (Tab. 3-6) mit auf das Gel aufgetragen.

Protein	Herkunft	Molekulargewicht [kDA]
β-Galaktosidase	<i>E. coli</i>	116,0
BSA	Rinderserum	66,2
Ovalbumin	Hühnereiweiß	45,0
Laktat-Dehydrogenase	Schweinemuskel	35,0
RE <i>Bsp98I</i>	<i>E. coli</i>	25,0
β-Laktoglobulin	Kuhmilch	18,4
Lysozym	Hühnereiweiß	14,4

Tab. 3-6 Zusammensetzung des Protein-Markers

### 3.2.9. Western Blot

Zum gezielten Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurde der Western Blot eingesetzt. Bei diesem Verfahren wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel nach SDS-PAGE durch *Semi-Dry*-Elektrotransfer nach Towbin [99] auf eine PVDF-Membran übertragen. Zu Beginn wurde die PVDF-Membran (5,5 cm x 8,5 cm) für 10 min in Methanol, 10 min in Wasser und für weitere 10-15 min zusammen mit dem Polyacrylamidgel in *Towbin*-Transferpuffer unter leichtem Schütteln voräquiliert. Ebenso wurden sechs Stück *Whatman*-Papier (je 6 cm x 9 cm) in *Towbin*-Transferpuffer getränkt. Zum eigentlichen Blotten wurden auf die Anodenplatte drei Lagen *Whatman*-Papier, die Membran, das Gel und abschließend wieder drei Lagen *Whatman*-Papier übereinander geschichtet. Nach Auflegen der mit Puffer angefeuchteten Kathodenplatte wurde der Blotvorgang (20 V, 200 mA pro Gel, 3 h) gestartet. Nach dem Blotten wurden die übertragenen Banden des Proteinmarkers mit Bleistift markiert. Danach wurde die Membran zunächst für 30 min oder über Nacht in M-TBS-T unter Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach zweimaligem Waschen für je 2 min in TBS-T erfolgte die Bindung des primären Antikörpers (*pET16b-MCS-pQE60: Tetra-His-AK*, *pREST A: RGS-His<sub>4</sub>-AK*) für etwa 1 h bei RT unter ständigem Schütteln. Anschließend wurde die Membran einmal für 15 min und zweimal für je 5 min in TBS-T gewaschen. Die Membran wurde dann für etwa

1 h mit dem sekundären Antikörper unter Schütteln inkubiert und wieder wie zuvor gewaschen. Zur Detektion des Protein-Antikörperkomplexes wurde das *ECL Plus Western Blotting Detection* Reagenz verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Das entstandene Chemilumineszenzsignal wurde durch Auflegen (2 s bis 5 min) und anschließende Entwicklung eines Films (*Hyperfilm ECL*) sichtbar gemacht und fixiert.

### 3.2.10. Cross-Linking

Mit Hilfe des Cross-Linkings läßt sich die Wechselwirkung von Proteinuntereinheiten untersuchen und gegebenenfalls die Quartärstruktur von Proteinen bestimmen. Dazu setzt man Cross-Linking-Reagenzien wie Glutaraldehyd ein. Dies reagiert spezifisch mit der Aminogruppe von Lysin unter Bildung einer Schiffschen Base und kann so miteinander wechselwirkende Proteinuntereinheiten kovalent verknüpfen [100, 101].

Das gereinigte Protein wurde zunächst in Cross-Linking-Puffer über Nacht bei 4°C dialysiert (siehe 3.2.5.), um enthaltenes Tris/HCl komplett zu entfernen. Dies wirkt hemmend auf die Cross-Linking-Reaktion. Ein Reaktionsansatz enthielt 1,9 µl 56 mM Glutaraldehyd sowie 0,2-0,8 µg Protein, mit oder ohne Zusatz von 1 mM cAMP oder cGMP. Mit Cross-Linking-Puffer wurde auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt. Nach Inkubation des Ansatzes für 30 min bei RT wurde die Reaktion mit 5 µl 4x SDS-Probenpuffer gestoppt. Anschließend wurde das Reaktionsergebnis mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe 3.2.8.) und eines Western Blots (siehe 3.2.9.) analysiert. Als Kontrolle wurde unbehandeltes Protein sowie zur Bestimmung des Molekulargewichtes Markerproteine [siehe Tab. 3-6; Katalase (240 kDa, 2 µg), Aldolase (158 kDa, 2 µg)] aufgetragen.

### 3.2.11. Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie wurde genutzt, um die Reinheit und die Quartärstruktur der Proteine für die Kristallisation zu analysieren. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über eine *Superdex 200 (16/60)*-Säule (Tab. 3-7) an einer *ÄKTA*-Anlage mit Laufpuffer für *Superdex 200*.

Säulendaten	
Säulenmaterial	Dextran an kovalent gebundener Agarose
Partikelgröße	34 µm
Säulenvolumen	120-124 ml
Flussrate	0,3-1,6 ml/min
Probenvolumen	0,6-4,8 ml

Tab. 3-7 Säulendaten der Superdex 200 (16/60)

Vom konzentrierten Protein wurden 0,5-1 ml auf die Säule aufgetragen. Die Fraktionsgröße betrug 0,25-1 ml und die Flussrate 1 ml/min. Zur Kalibrierung der Säule wurden verschiedene Markerproteine (2 mg/ml) über die Säule aufgetrennt: BSA, Phosphorylase b, Ovalbumin und Aldolase.

### 3.2.12. Verdau mit der TEV-Protease

Zur Abspaltung des C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags des Kristallisationskonstrukts PDE10A1 V63 GAFA/B TEV (siehe 3.5.4.3.) wurde eine TEV-Protease verwendet. Dazu wurde zwischen dem Ende der PDE10 GAFB-Sequenz und dem His<sub>6</sub>-Tag die Erkennungssequenz ENLYFQG der TEV-Protease kloniert. Diese Protease spaltet zwischen Glutamin und Glycin [102-104].

Es wurde mit Hilfe der AcTEV-Protease von Invitrogen ein Protokoll für die Anwendung einer in unserem Labor von Ursula Kurz exprimierten und gereinigten stabilen S219V-Mutante der TEV-Protease entwickelt. Durch die eingeführte Mutation wird verhindert, dass sich die TEV selbst spaltet und inaktiviert [105]. Für einen Verdau mit der S219V-TEV-Protease wurden pro 50 µg gereinigtem und in Dialysepuffer C pH 9 dialysiertem Protein 4-5 µg Protease eingesetzt. Der Verdau erfolgte in 1x TEV-Puffer sowie mit 1 mM DTT über Nacht bei 4°C. Zur Abtrennung von EDTA und DTT erfolgte anschließend eine Dialyse in Dialysepuffer C pH 8,5 (siehe 3.2.5.). Da die TEV-Protease einen His-Tag besitzt, wurde diese dann mit 0,25-1 ml Ni<sup>2+</sup>-IDA/8 ml Dialysat (zwei- bis dreimal für 2-4 h oder über Nacht) vom Protein abgetrennt. Das verdaute Protein wurde nach Dialyse in Dialysepuffer C pH 8,5 und Aufkonzentrieren (siehe 3.2.6.) für die Kristallisation (siehe 3.4.) verwendet.

### 3.3. Adenylatcyclasetest

Die Adenylatcyclaseaktivität wurde nach dem Verfahren von Salomon et al. bestimmt [106]. Dazu wurde der Umsatz des Substrats [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP zu radioaktiv markiertem cAMP durch das Enzym gemessen. Dies erfolgte nach chromatographischer Abtrennung von nicht umgesetztem Substrat über zwei Säulen. Als interner Standard wurde [2,8- $^3\text{H}$ ]-cAMP verwendet.

Jeder Test wurde als Zweifachmessung durchgeführt. Ein Testansatz von 100  $\mu\text{l}$  beinhaltete 40  $\mu\text{l}$  AC-Cocktail, Wasser ad 100  $\mu\text{l}$ , Zusätze wie z.B. cAMP oder cGMP, 10  $\mu\text{l}$  Proteinlösung und 10  $\mu\text{l}$  750  $\mu\text{M}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP (bei Kinetik verschiedene Konzentrationen). AC-Cocktail, Zusätze und Wasser wurden vorgelegt und gemischt. Nach Proteinzugabe wurden die Ansätze für 10 min auf Eis vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von je 10  $\mu\text{l}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP. Nach kurzem Vortexen wurde für 10 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde dann auf Eis mit 150  $\mu\text{l}$  AC-Stopp beendet. Damit keine mögliche allosterische Aktivierung erfolgt, wurden je 10  $\mu\text{l}$  [2,8- $^3\text{H}$ ]-cAMP erst nach dem Test zugesetzt. Nach Zugabe von 750  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  wurden die Proben über *Dowex*-Säulen (mit 1,2 g *Dowex-50WX4*) gegeben. Nach dem Einsickern der Proben wurde je nach Elutionsprofil der Säulen mit 3-4 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde mit 5 ml Wasser auf *Alox*-Säulen (mit 1 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  90 aktiv, neutral) eluiert. Die Elution des gebundenen radioaktiven cAMP erfolgte mit 4,5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 in mit 4 ml Szintillator *Ultima Gold XR* gefüllten Szintillationsvials. Diese wurden nach Schütteln im *Liquid Szintillation Counter* ausgezählt.

Zur Bestimmung des Säulenhintergrunds wurden zwei Proben ohne Protein angesetzt (Blank). Ebenso wurde zur Messung der eingesetzten Mengen an [2,8- $^3\text{H}$ ]-cAMP und [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP ein  $^3\text{H}$ - und ein  $^{32}\text{P}$ -Total mit 4 ml Szintillator und 4,5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 ausgezählt.

Zur Regeneration wurden die Säulen wie folgt gewaschen:

- Dowex: 5 ml 2 N HCl, 10 ml Wasser, 5 ml Wasser
- Alox: 2x 4,5 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5

Die Berechnung der Enzymaktivität A erfolgte nach folgender Formel:

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

### 3.4. Kristallisation

Die Proteinkristallisation erfolgte nach der hanging drop-Methode (Abb. 3-1).

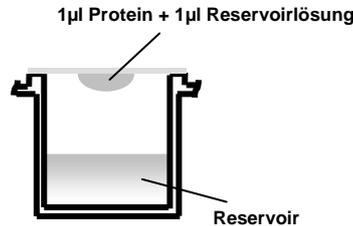


Abb. 3-1 Prinzip der hanging drop-Methode

In VDX 24-well Kristallisationsplatten wurden 500 µl des jeweiligen Kristallisationspuffers (Reservoir) vorgelegt. Davon wurde 1 µl entnommen und auf einem Deckglas mit 1 µl Protein (2-16 µg/µl) vermischt. In manchen Fällen war die Proteinlösung mit 2-5 mM cAMP versetzt. Das Deckglas wurde dann umgekehrt auf das Reservoir gelegt und luftdicht verschlossen. Die Platten wurden erschütterungsfrei bei 4, 12 oder 18°C gelagert und unter dem Lichtmikroskop *Axioskop 40* ausgewertet. Entstandene Kristalle wurden photographisch festgehalten.

### 3.5. Klonierungen

In den gezeichneten Konstrukten sind die N-Termini hellgrau, die GAF-Domänen schwarz und die katalytischen Domänen dunkelgrau dargestellt. Alle Teile der PDE10 sind jeweils einfarbig ohne Schraffur, die der CyaB1 mit Schraffur und die der PDE5 gepunktet gezeichnet. Die klonierten Endkonstrukte sind durch einen Rahmen hervorgehoben. Die Nummerierung der mutierten ASn bezieht sich auf die humane PDE10A1.

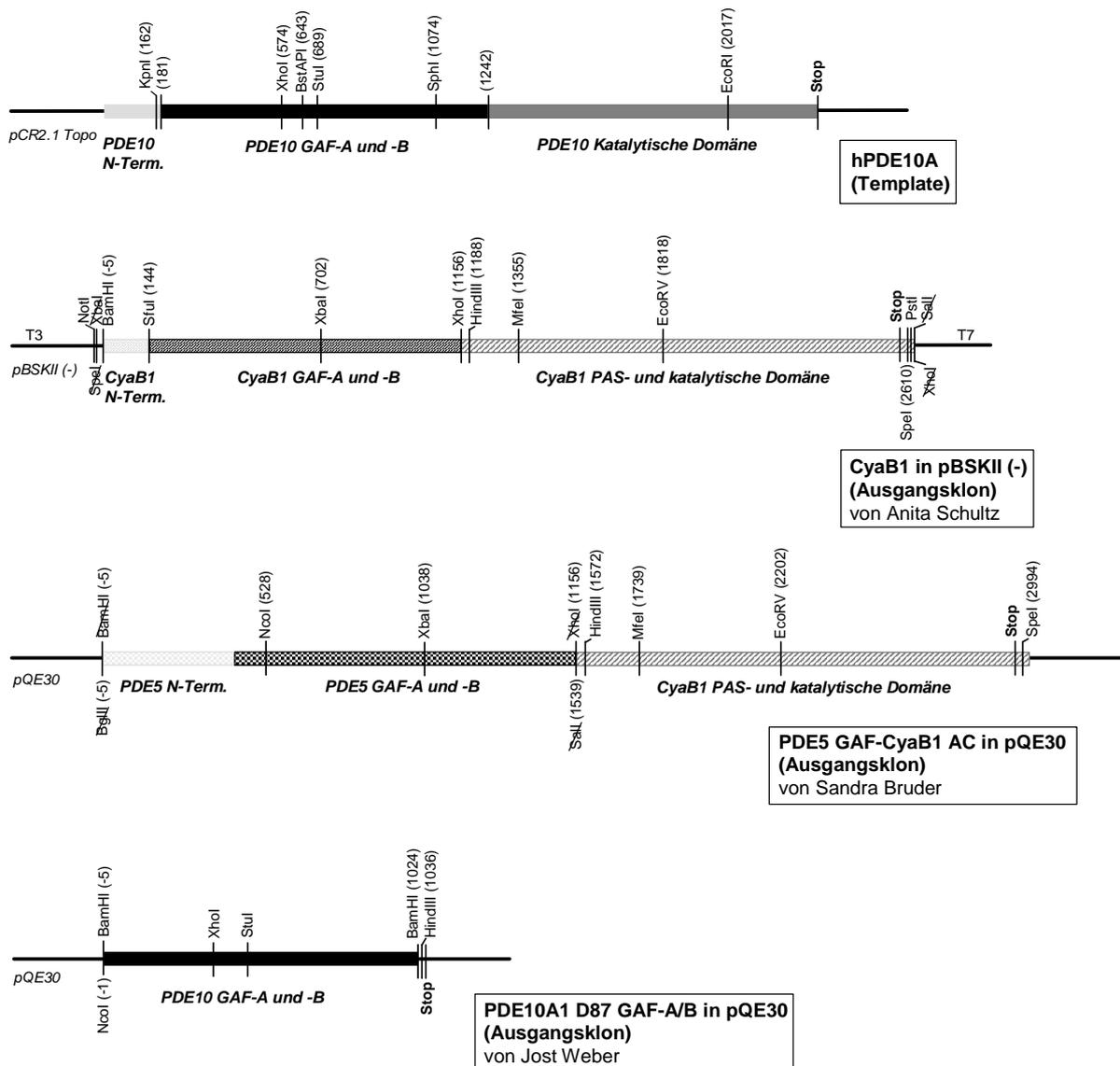
Durch die letzte Klonierung in die entsprechenden Expressionsvektoren wurden die exprimierten Proteine mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehen. Bei Verwendung des Expressionsvektors *pRSET A* trugen die Proteine N-terminal die AS-Sequenz MRGS(H)<sub>6</sub>. Beim Vektor *pET16b-MCS-pQE60* wurden C-terminal sechs Histidine angehängt.

Die meisten Konstrukte wurden in *E. coli XL1 Blue* oder *DH5α* (Konstrukt 3.5.4.3.) kloniert und anschließend in *E. coli BL21 (DE3) [pRep4]* transformiert. Manche wurden auch direkt in *E. coli BL21 (DE3) [pRep4]* transformiert.

Einige Konstrukte wurden von Anita Schultz, Dr. Jost Weber oder Ursula Kurz kloniert.

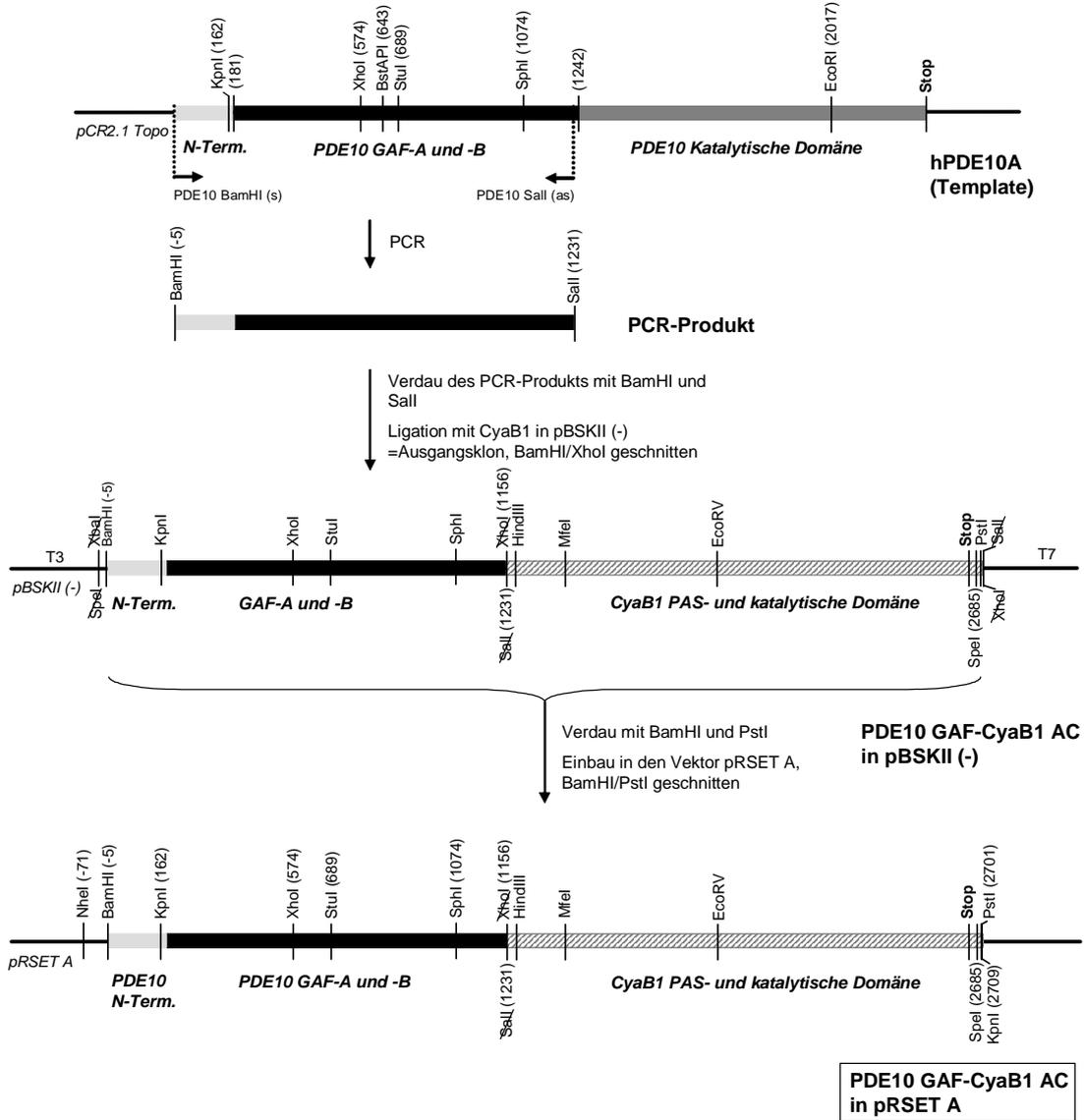
3.5.1. Ausgangsklone

Die folgenden vier Ausgangskonstrukte stammen von: Dr. Quintini, ALTANA Pharma, Konstanz (Gen für hPDE10A), Anita Schultz (CyaB1-Konstrukt), Dr. Jost Weber (PDE10A1 D87 GAF-A/B) und Dr. Sandra Bruder (PDE5 GAF-CyaB1 AC) [107]. Der Originalklon mit dem Gen für CyaB1 (DDBJ/EMBL/GenBank accession No. D89623; siehe Anhang B-4) wurde von Prof. Ohmori aus Tokio zur Verfügung gestellt [94].

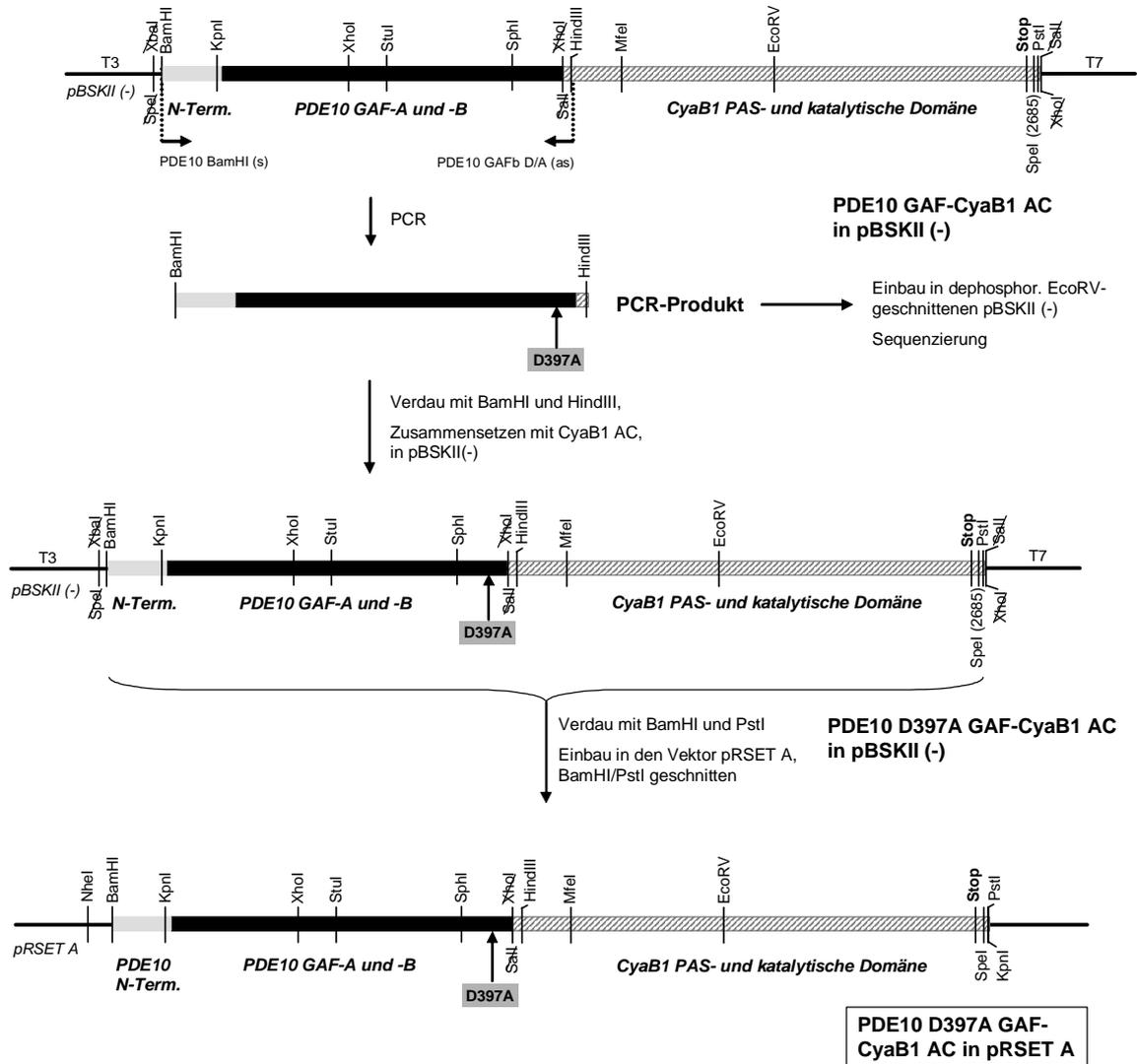


3.5.2. PDE10-CyaB1-Chimären

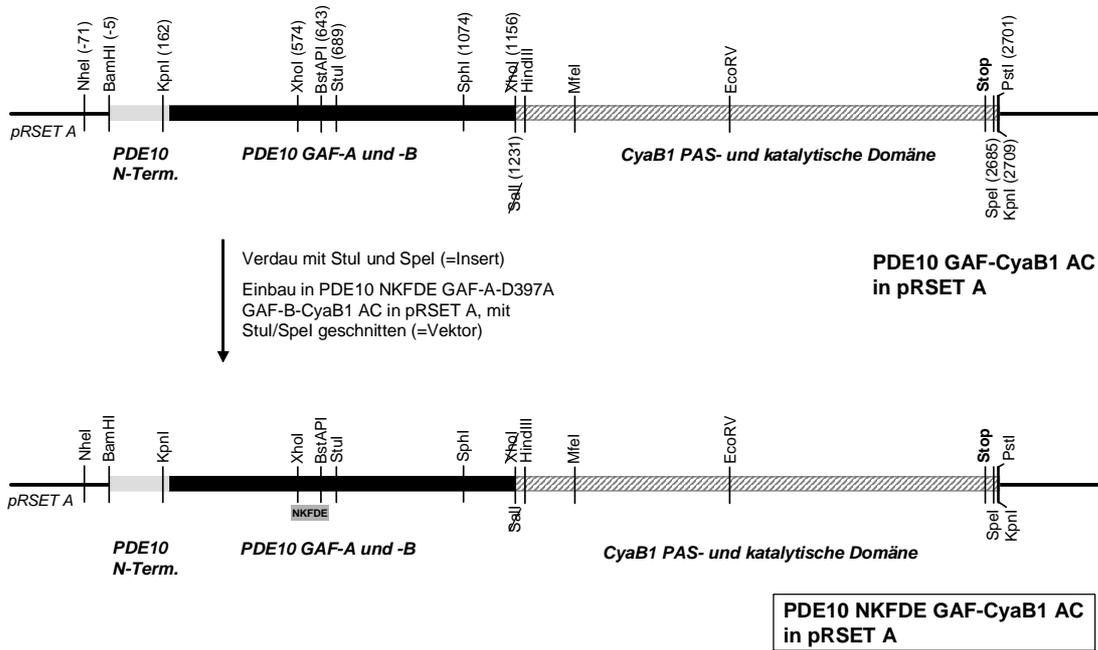
3.5.2.1. PDE10 GAF-CyaB1 AC



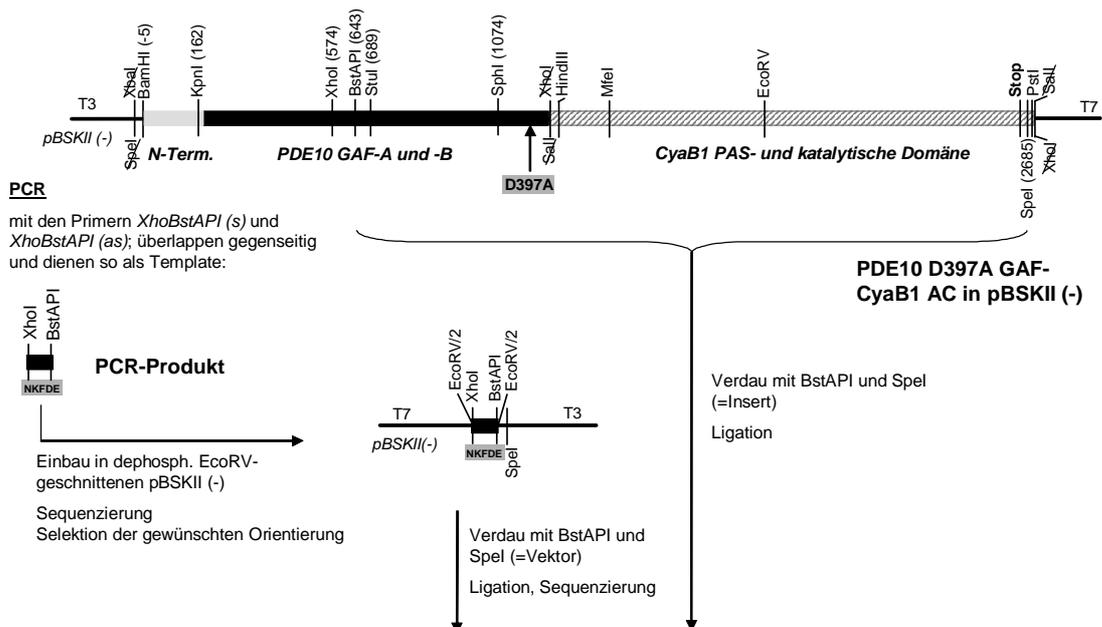
3.5.2.2. PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC

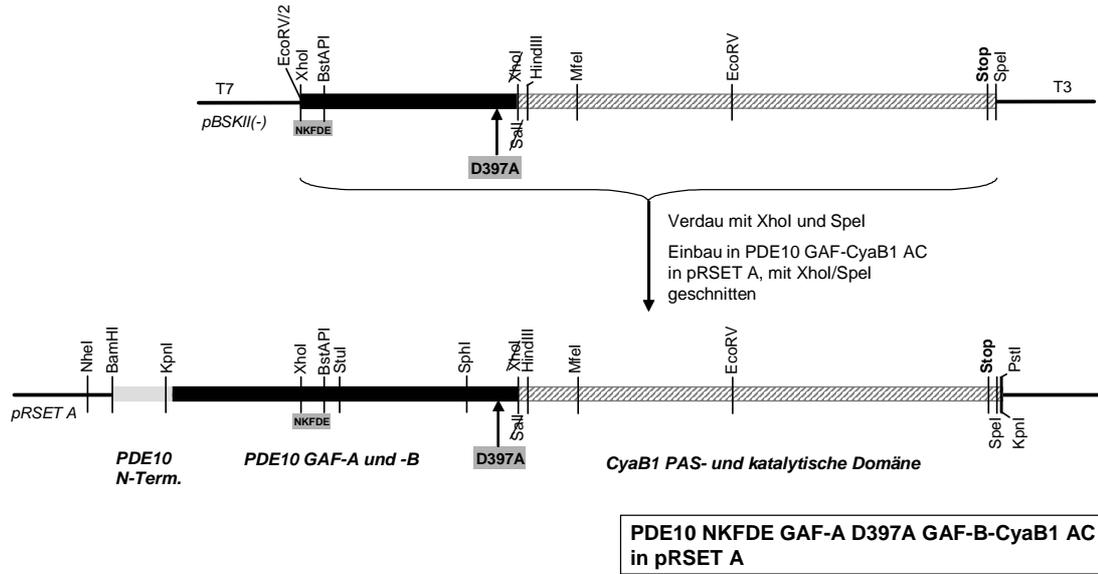


3.5.2.3. PDE10 NKFDE GAF-CyaB1 AC

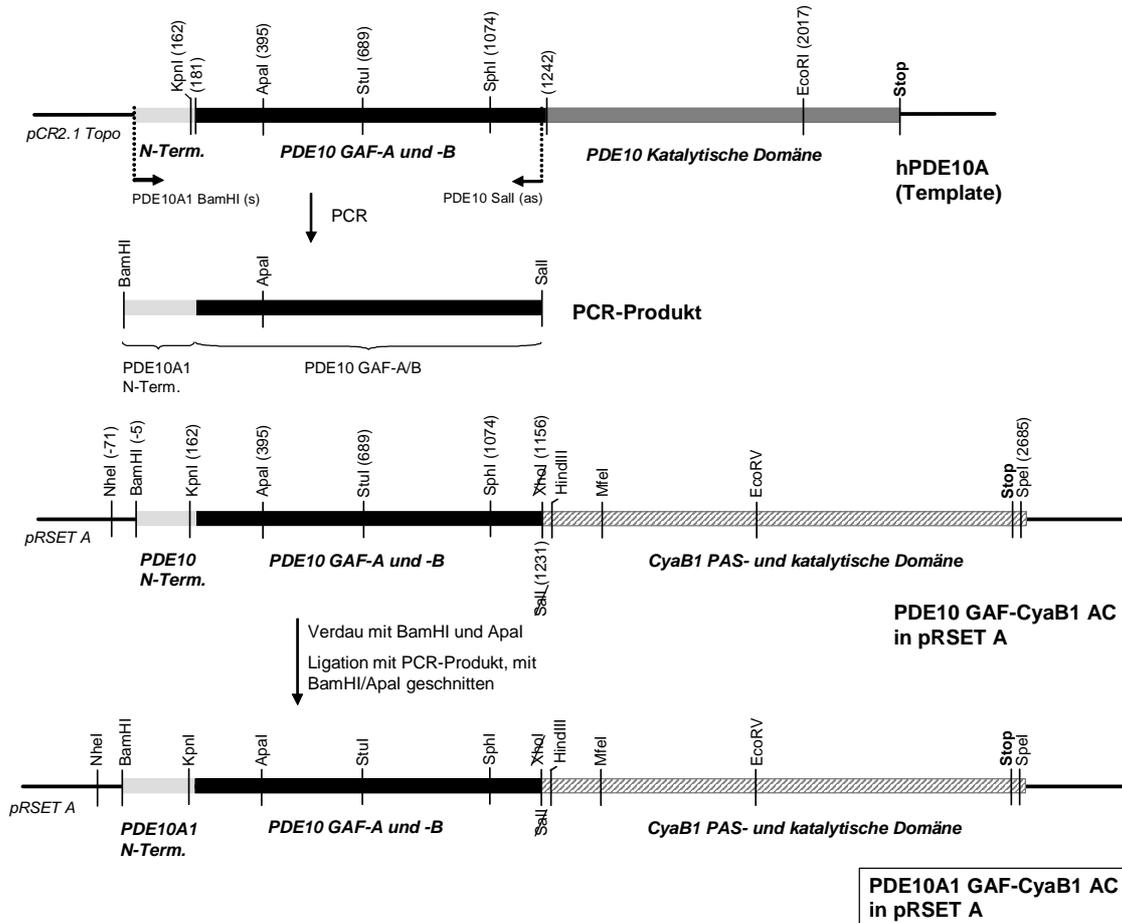


3.5.2.4. PDE10 NKFDE GAF-A D397A GAF-B-CyaB1 AC

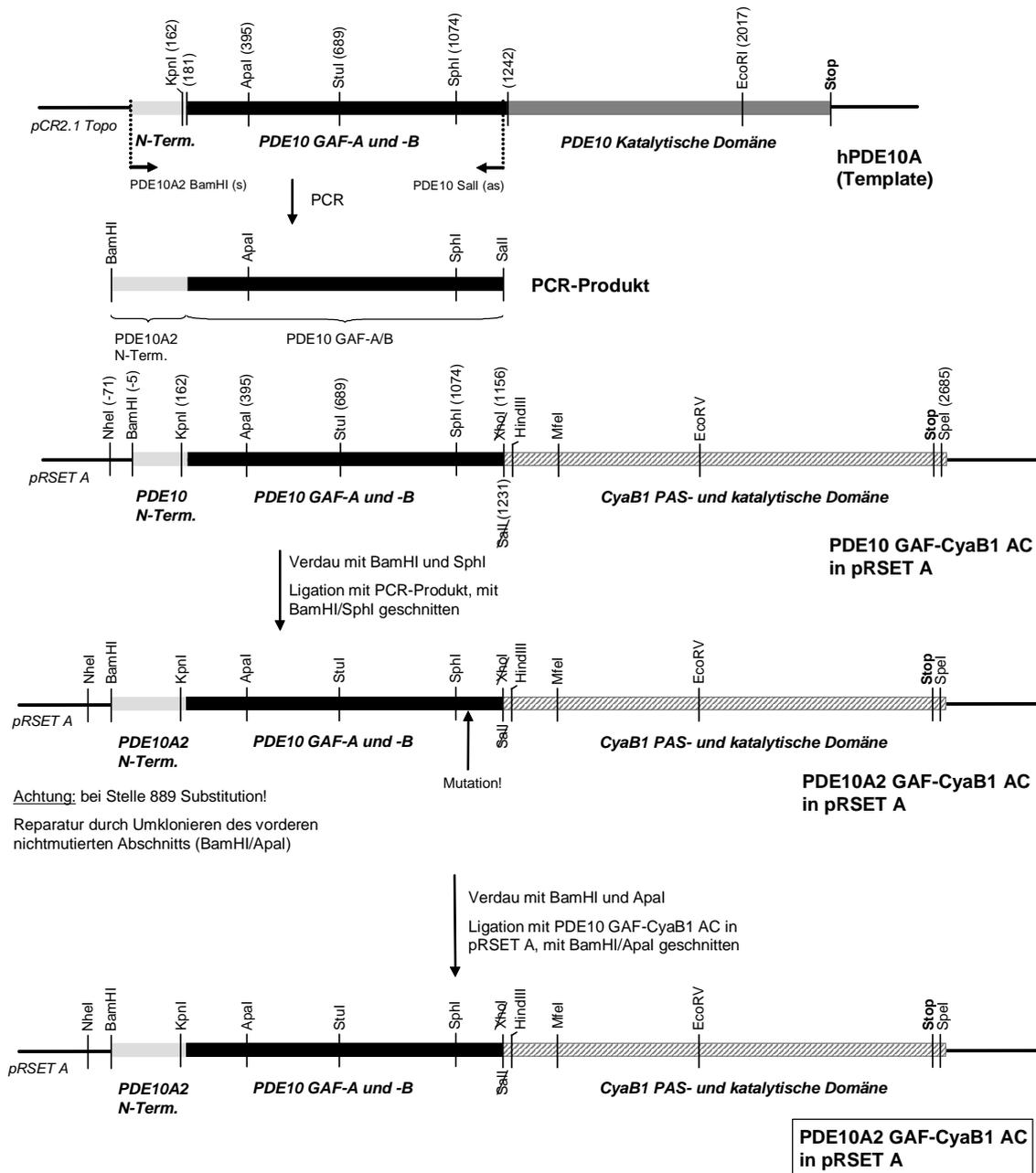




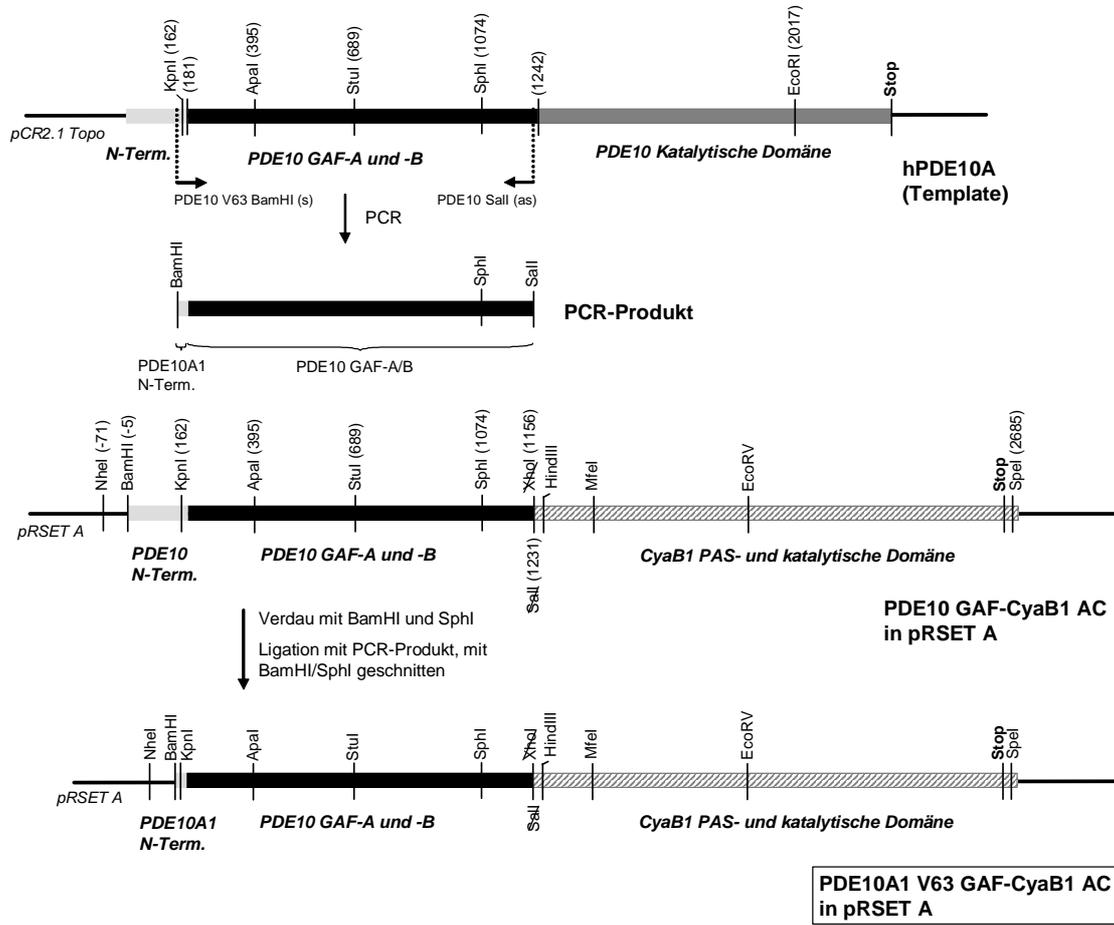
### 3.5.2.5. PDE10A1 GAF-CyaB1 AC



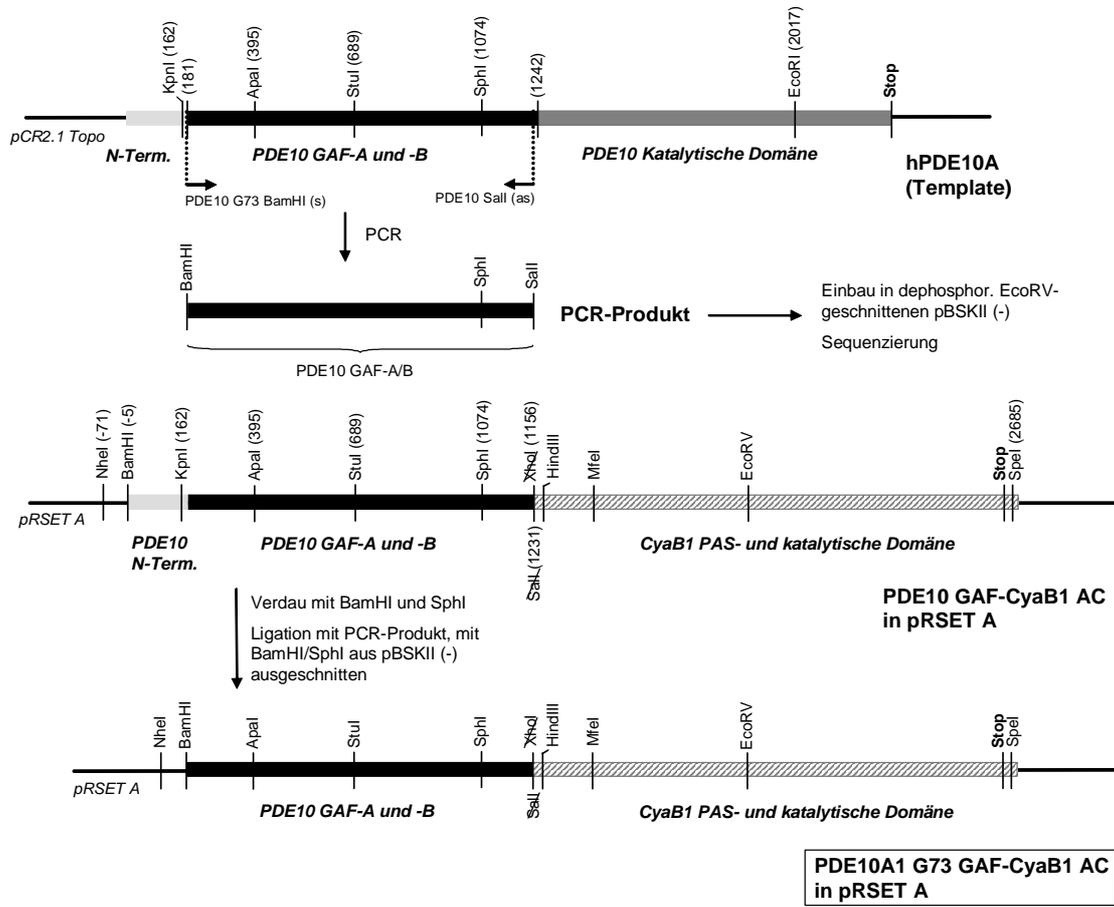
3.5.2.6. PDE10A2 GAF-CyaB1 AC



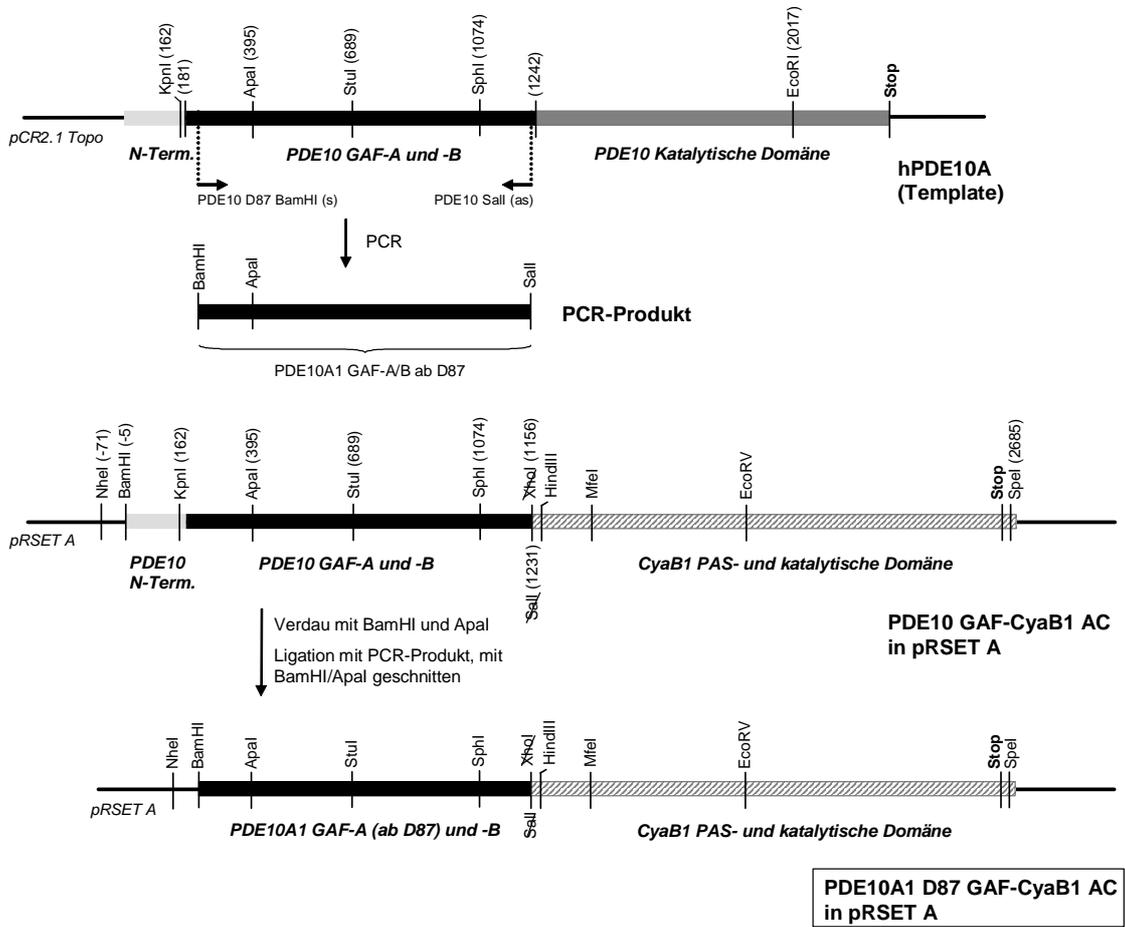
3.5.2.7. PDE10A1 V63 GAF-CyaB1 AC



3.5.2.8. PDE10A1 G73 GAF-CyaB1 AC

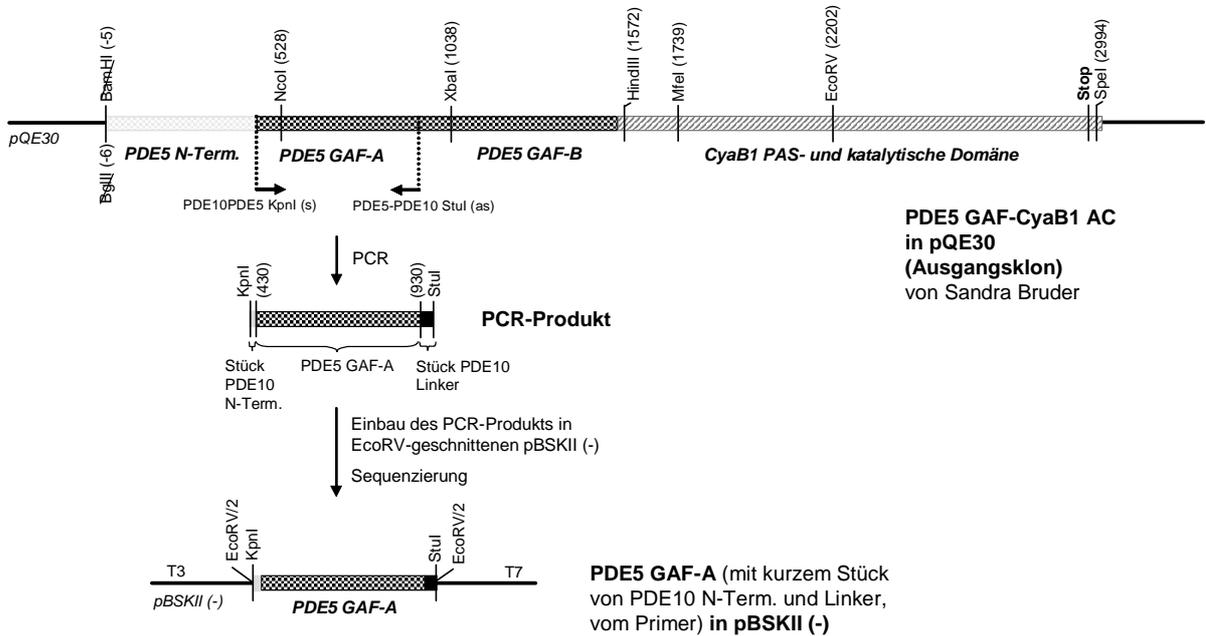


3.5.2.9. PDE10A1 D87 GAF-CyaB1 AC



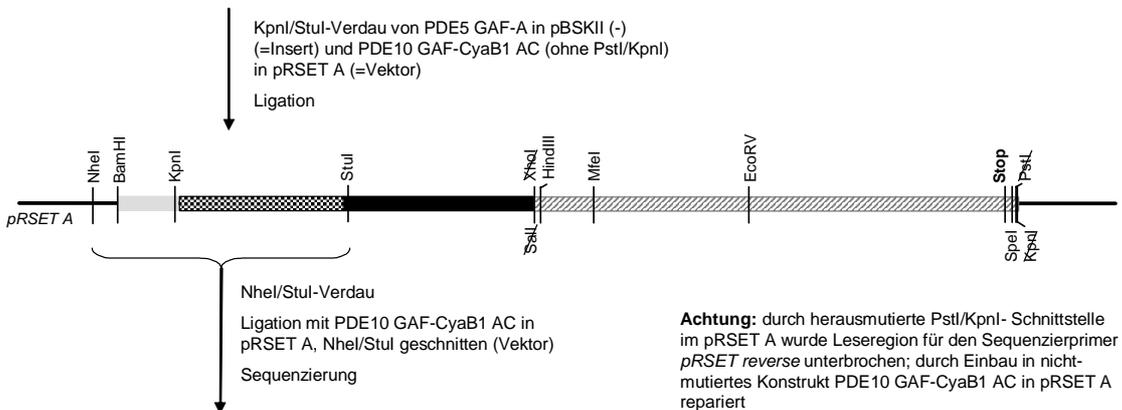
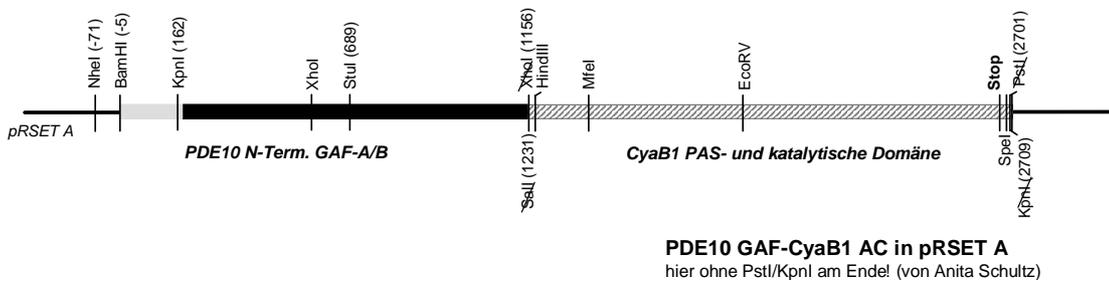
3.5.3. PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären

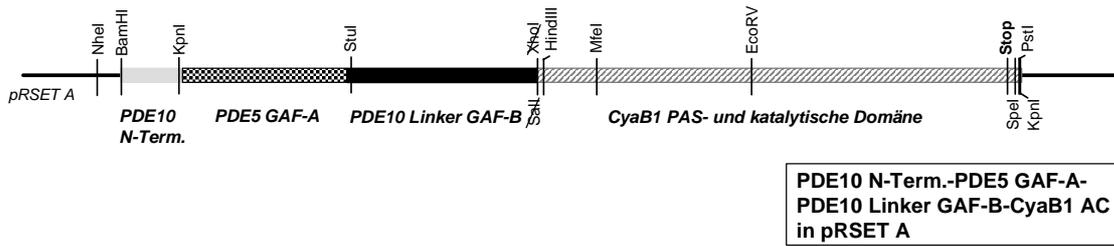
3.5.3.1. PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A-PDE10 Linker GAF-B



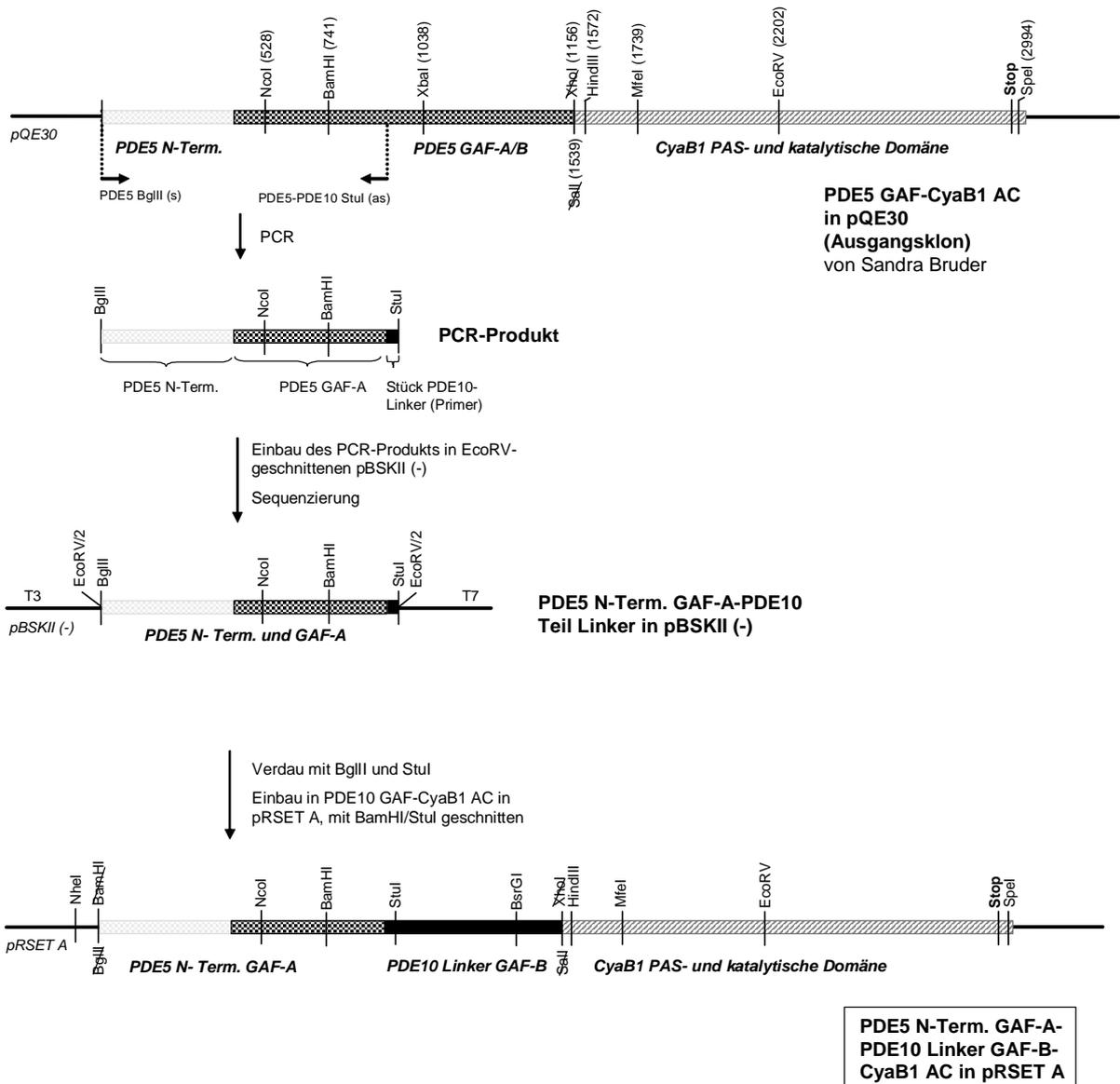
**Nächster Schritt:** Zusammensetzen des PCR-Produkts über KpnI/StuI mit PDE10 N-Term., Linker und GAF-B und CyaB1 AC in pRSET A, aber in PDE10 GAF-CyaB1 AC – pRSET A befinden sich zwei KpnI-Schnittstellen; Vektor mit mutierter KpnI/PstI verwendet (von Anita Schultz): Zwischenschritt

**Zwischenschritt:**

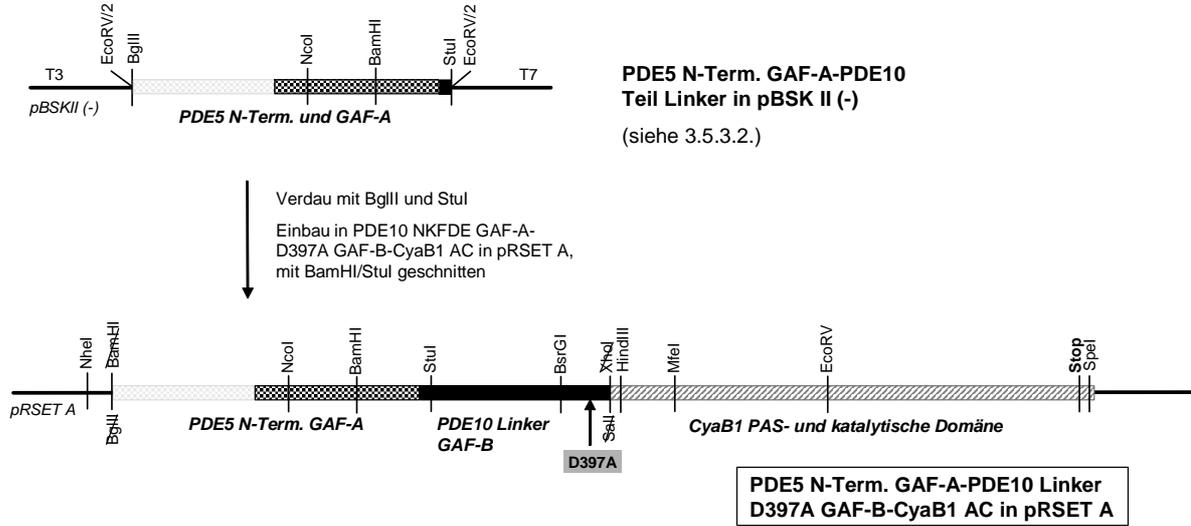




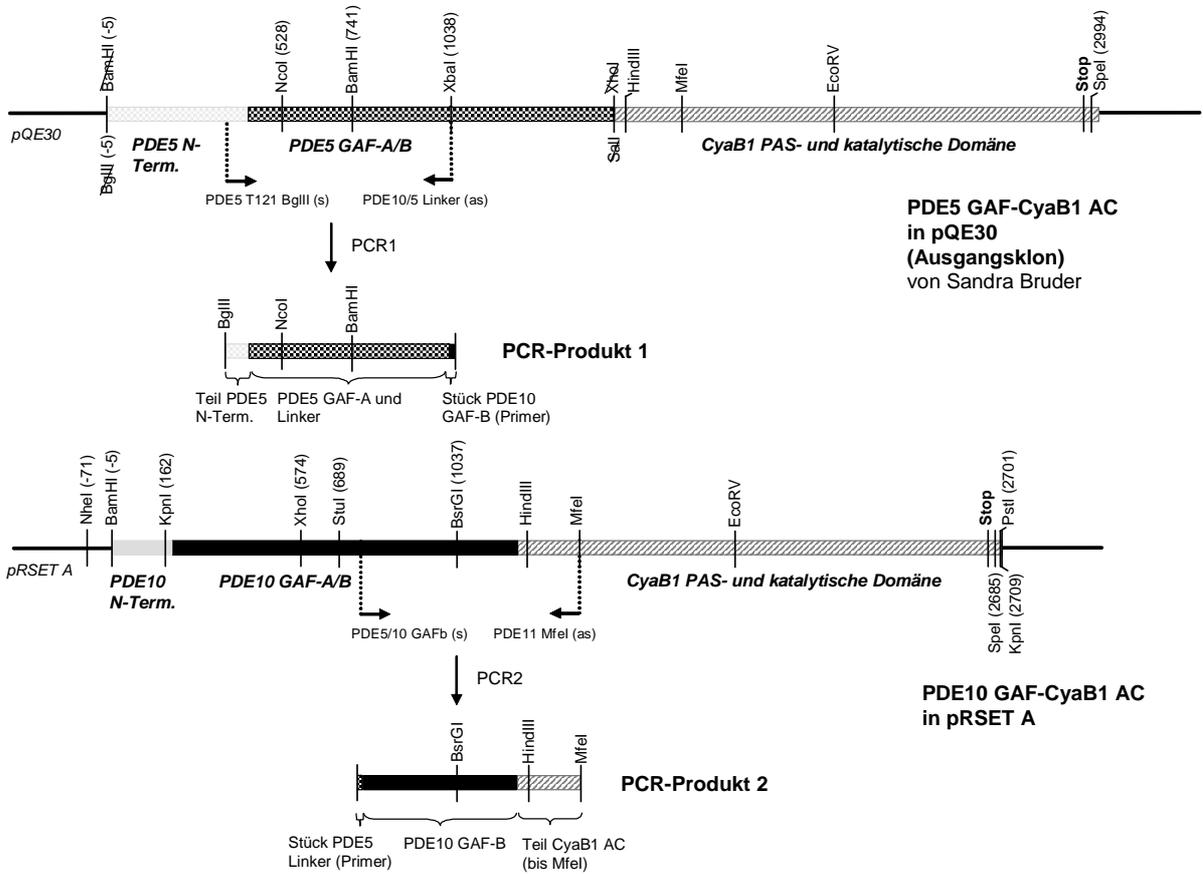
3.5.3.2. PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B

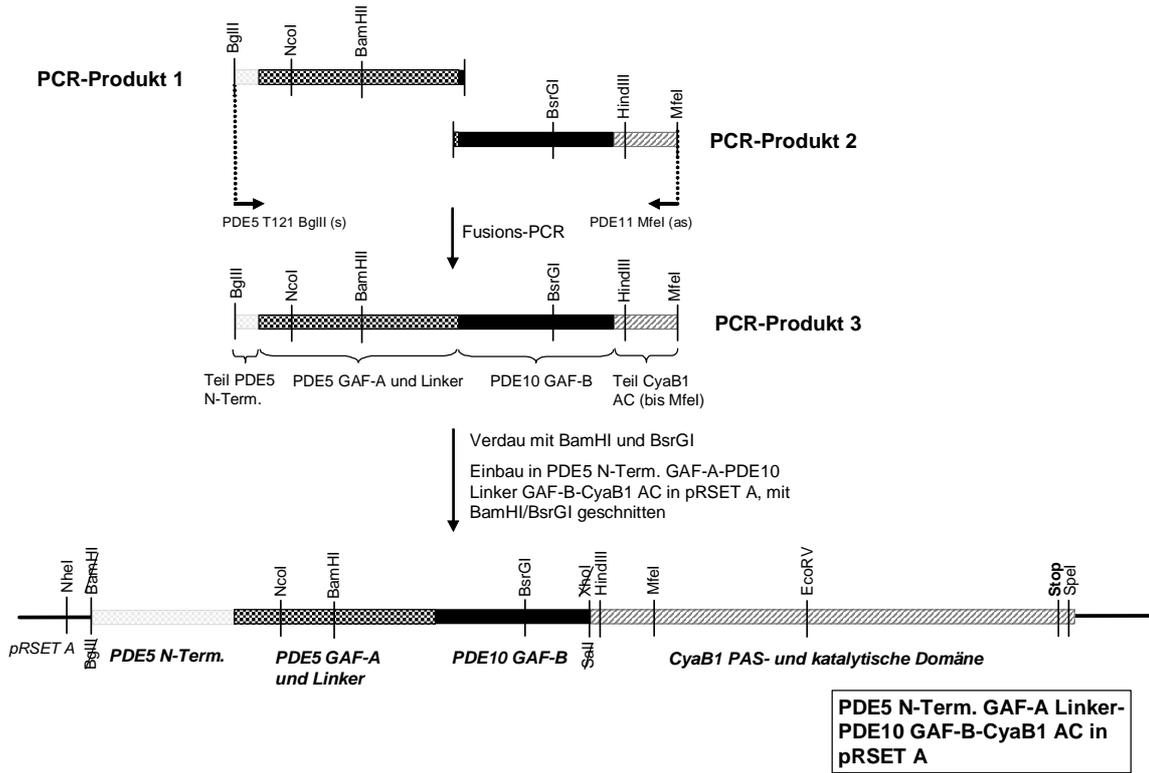


3.5.3.3. PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker D397A GAF-B

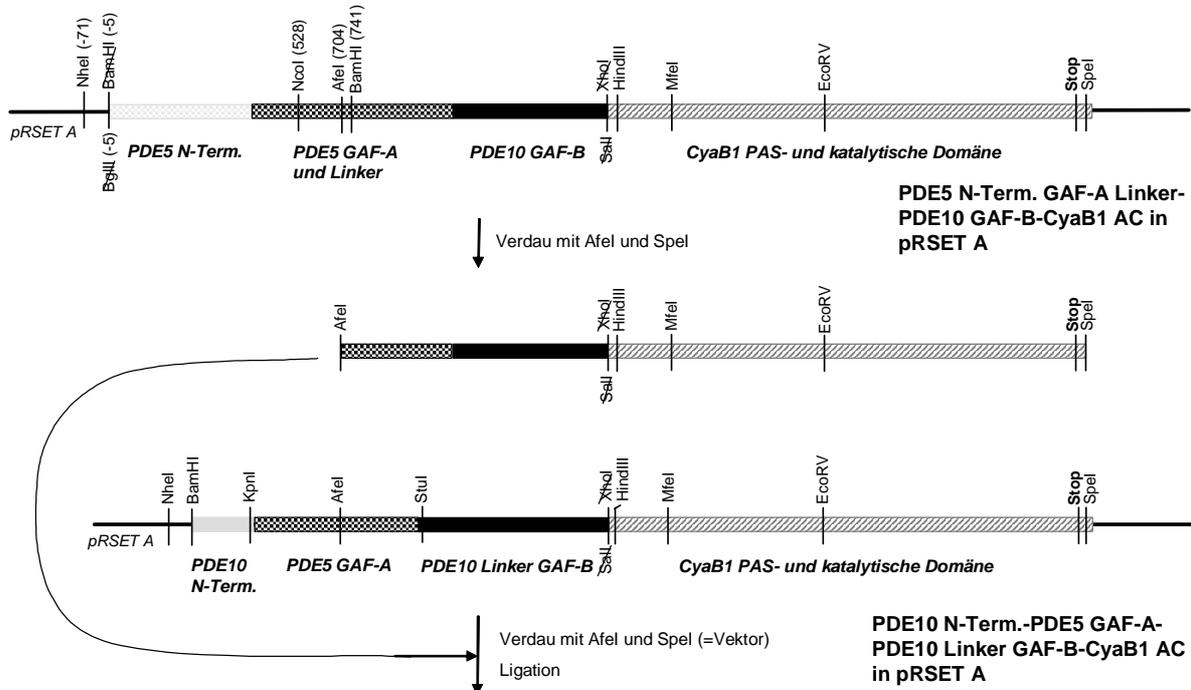


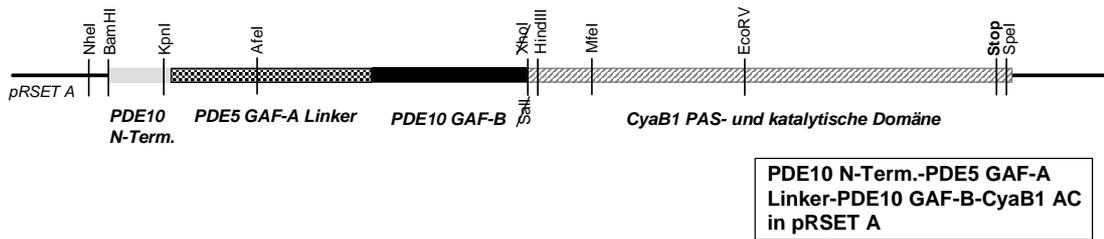
3.5.3.4. PDE5 N-Term. GAF-A Linker-PDE10 GAF-B



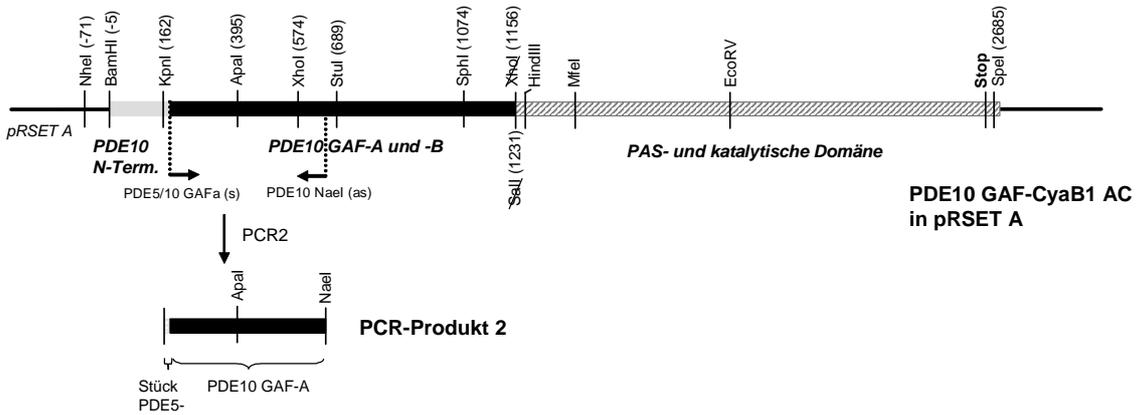
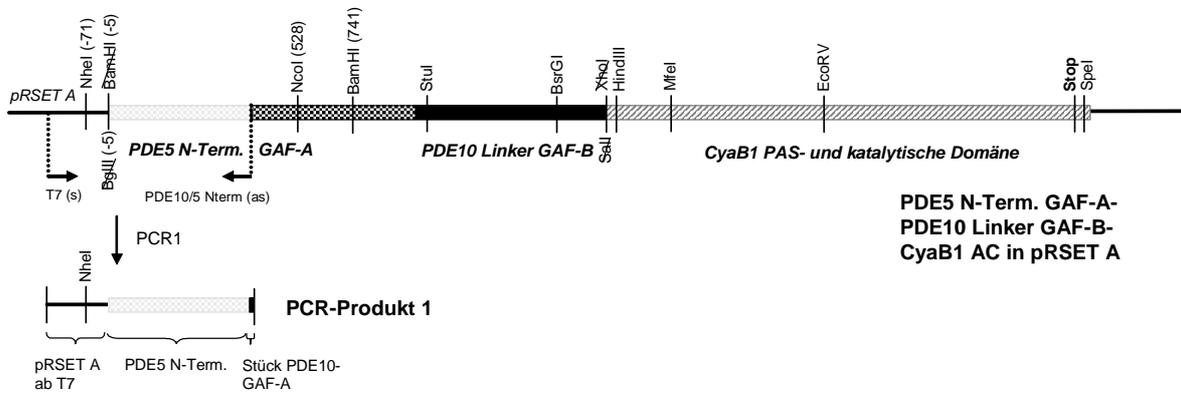


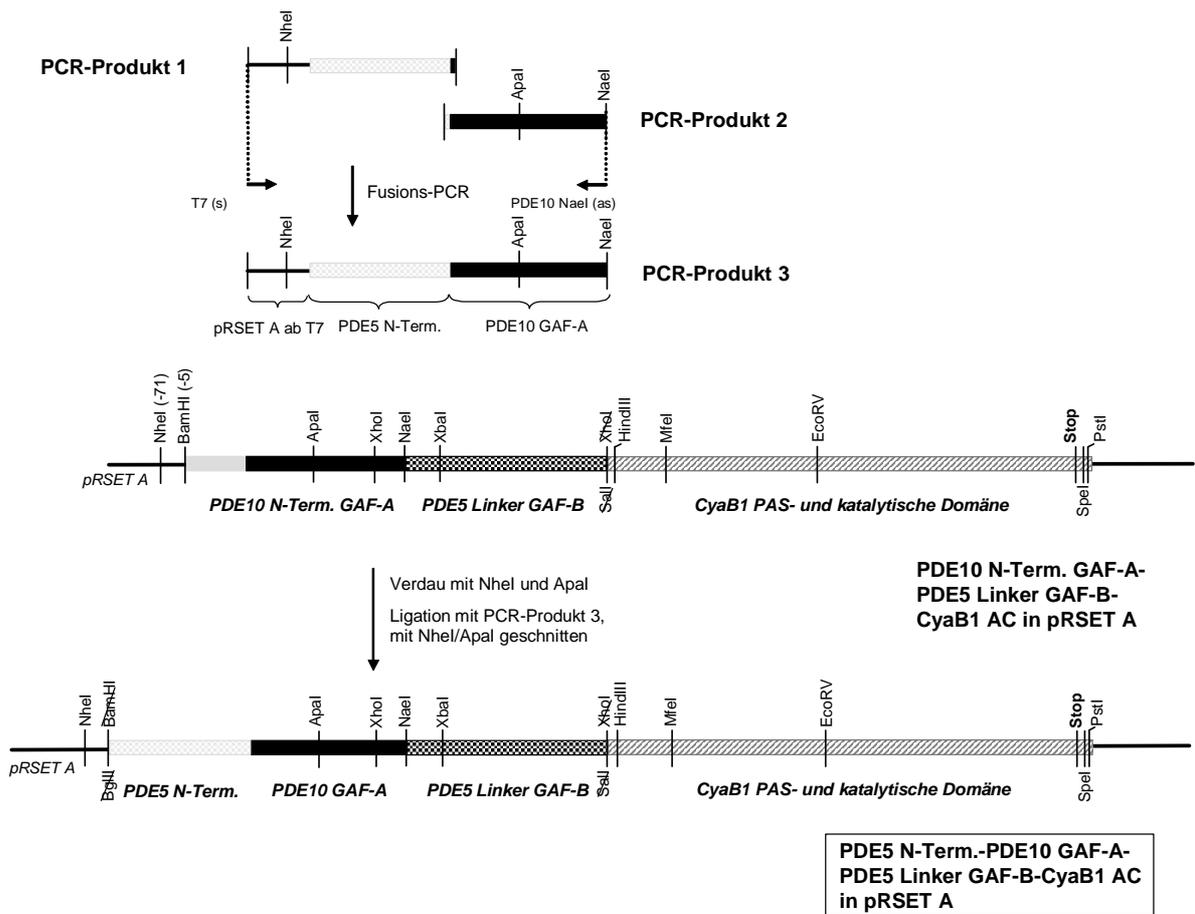
3.5.3.5. PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A Linker-PDE10 GAF-B



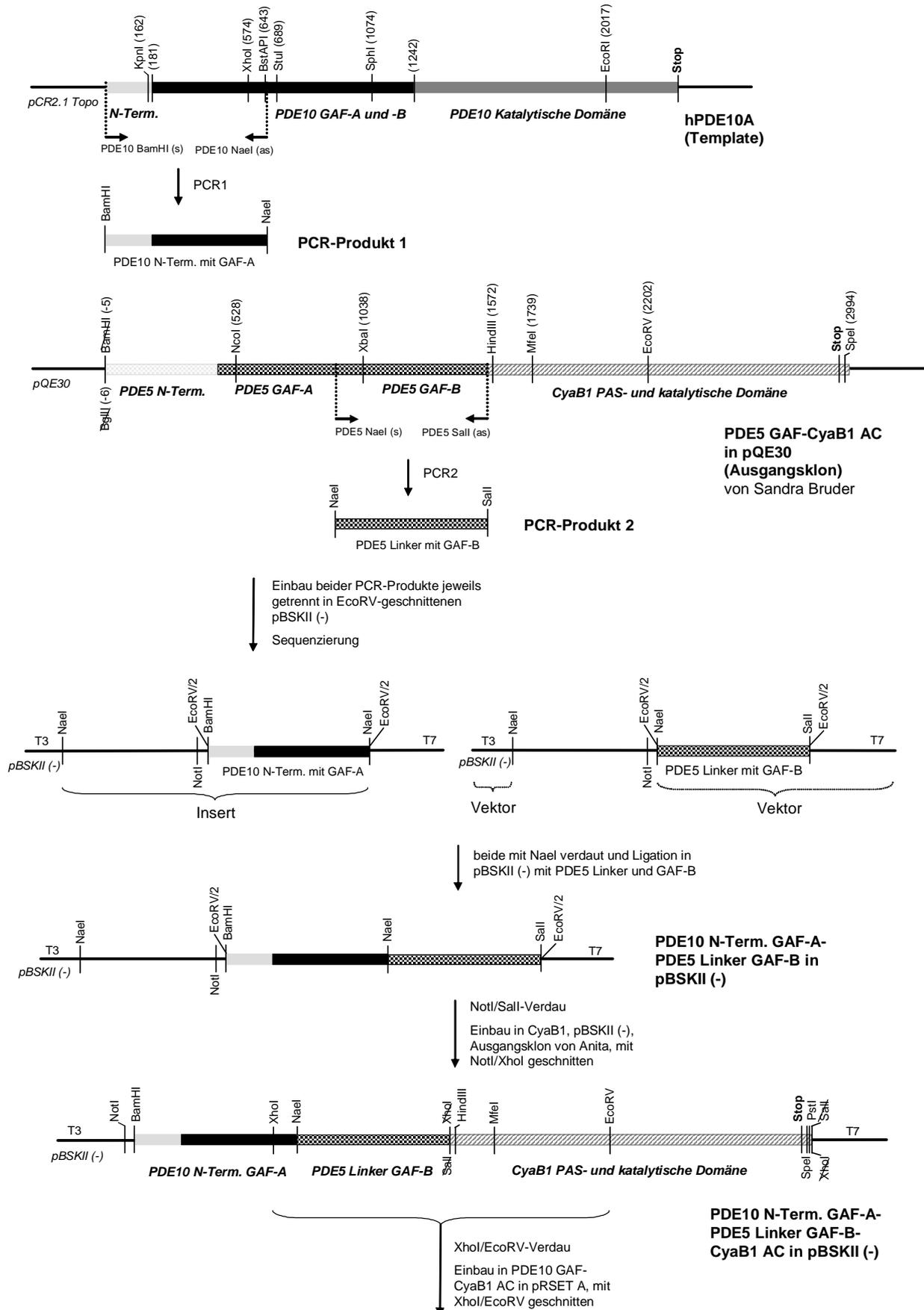


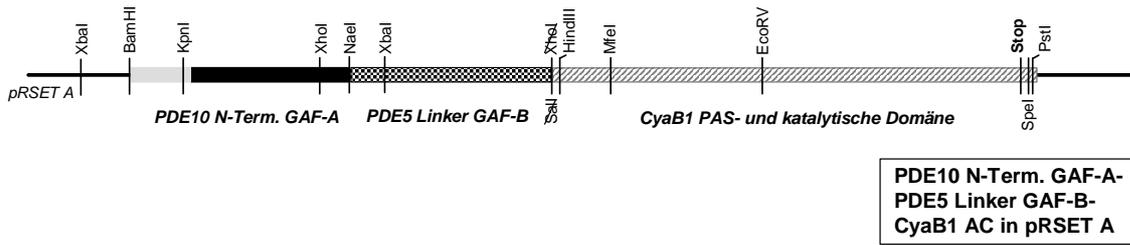
3.5.3.6. PDE5 N-Term.-PDE10 GAF-A-PDE5 Linker GAF-B



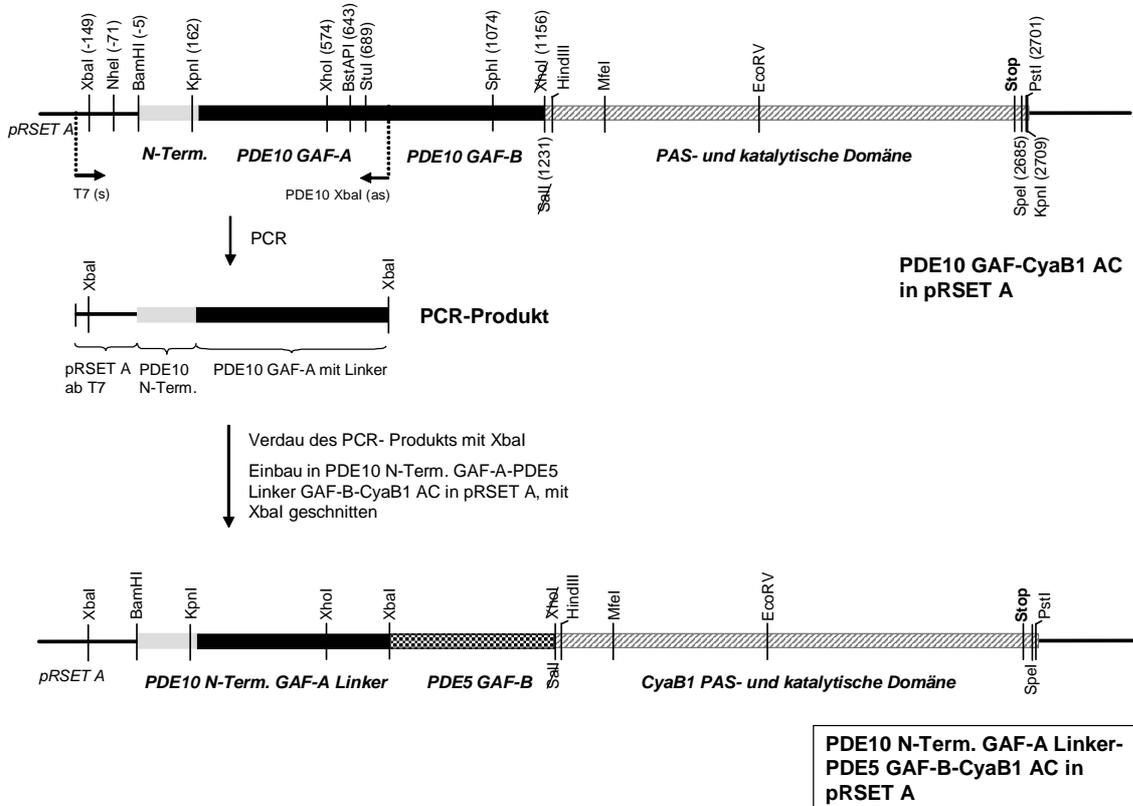


3.5.3.7. PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker GAF-B

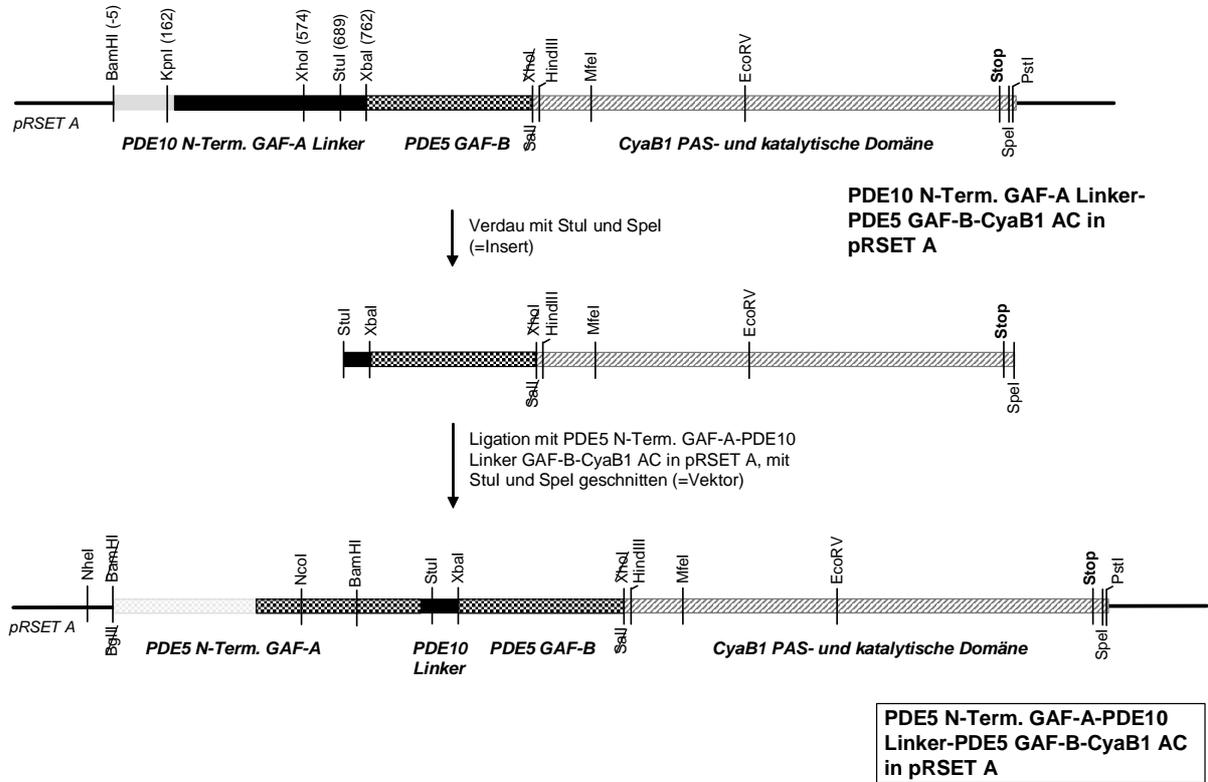




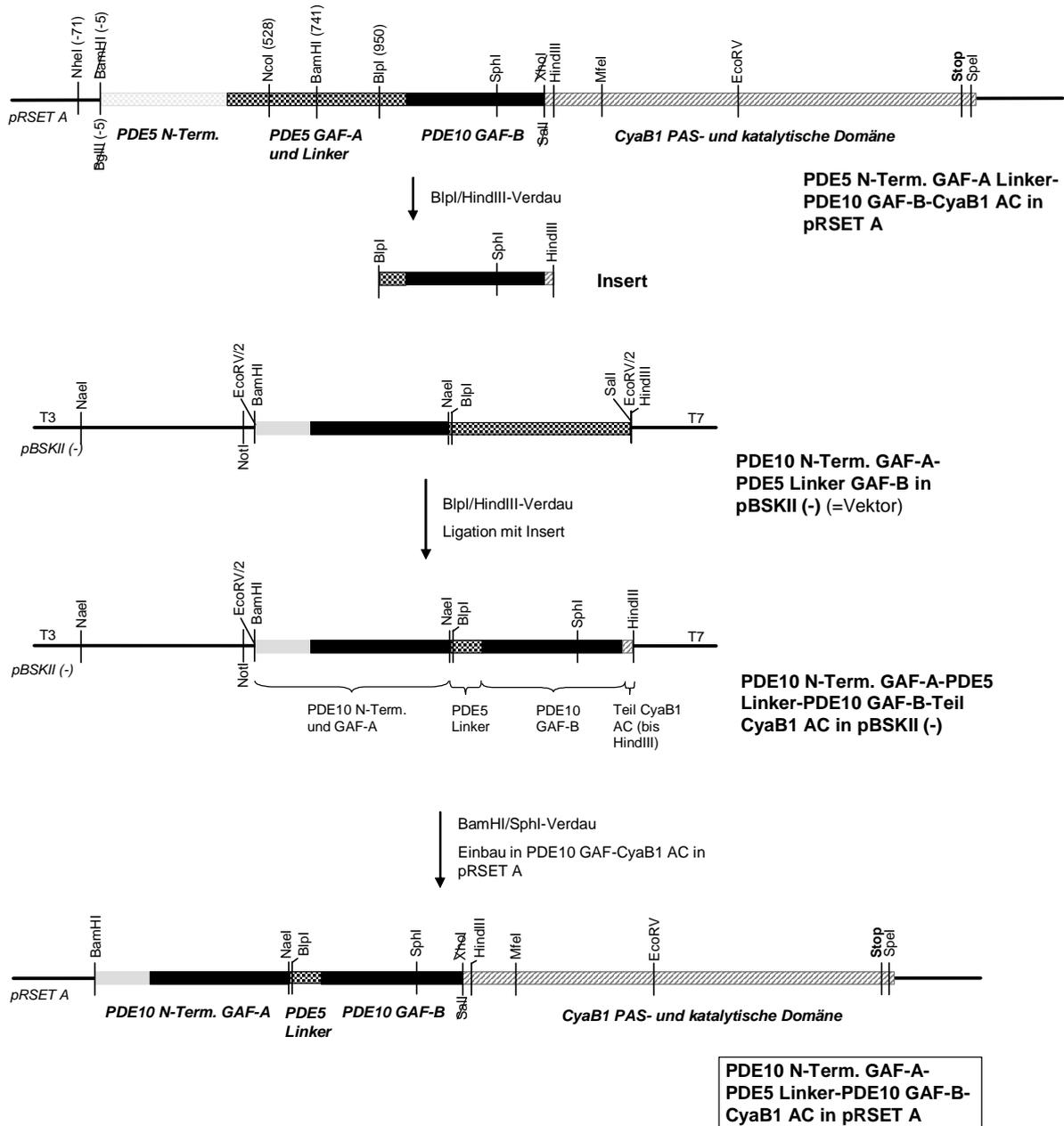
### 3.5.3.8. PDE10 N-Term. GAF-A Linker-PDE5 GAF-B



3.5.3.9. PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker-PDE5 GAF-B

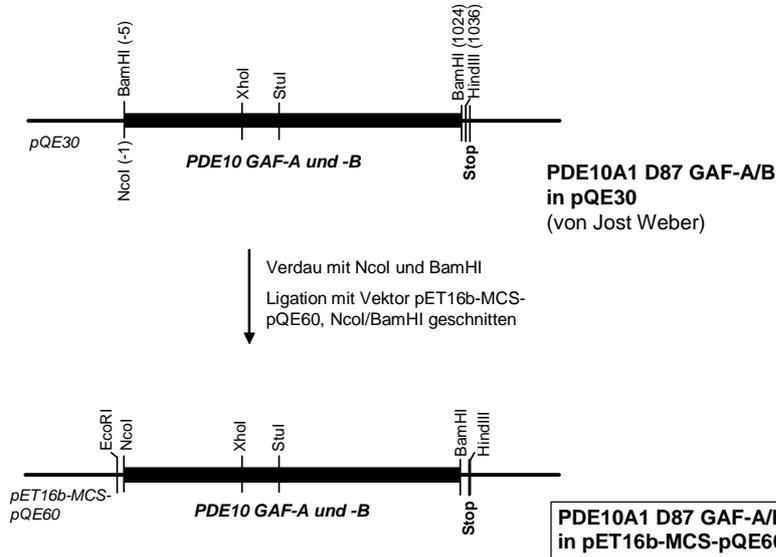


3.5.3.10. PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker-PDE10 GAF-B

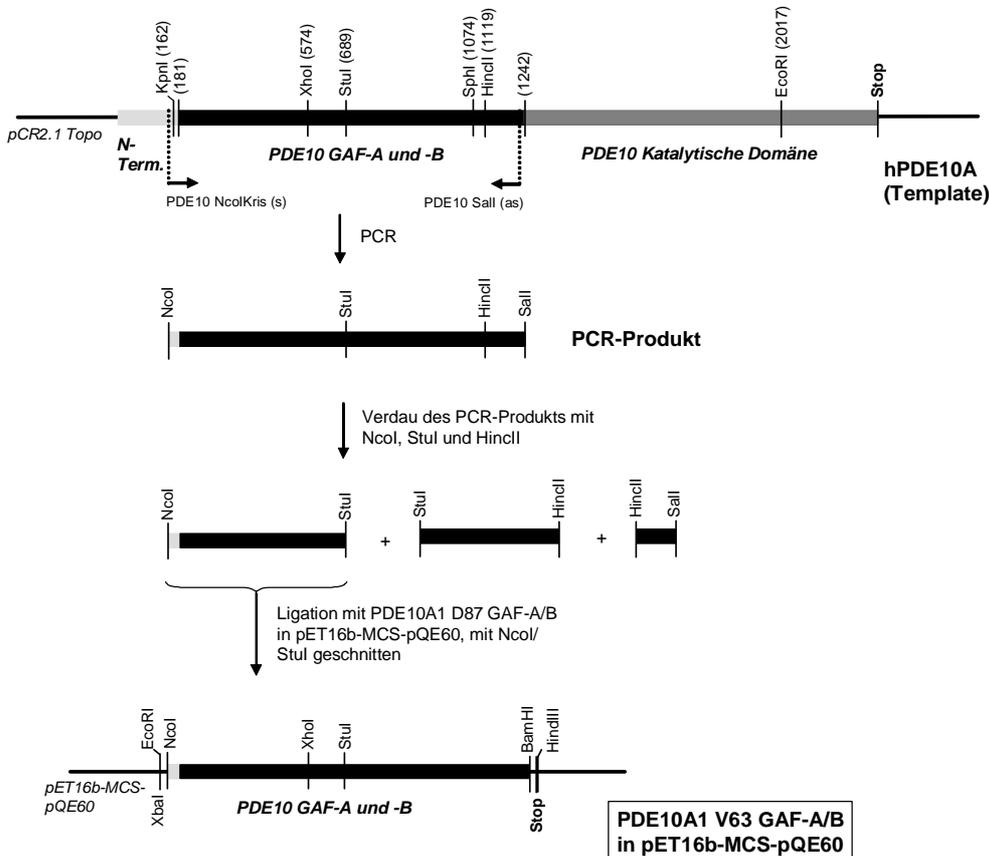


3.5.4. PDE10 GAF-Konstrukte zur Kristallisation

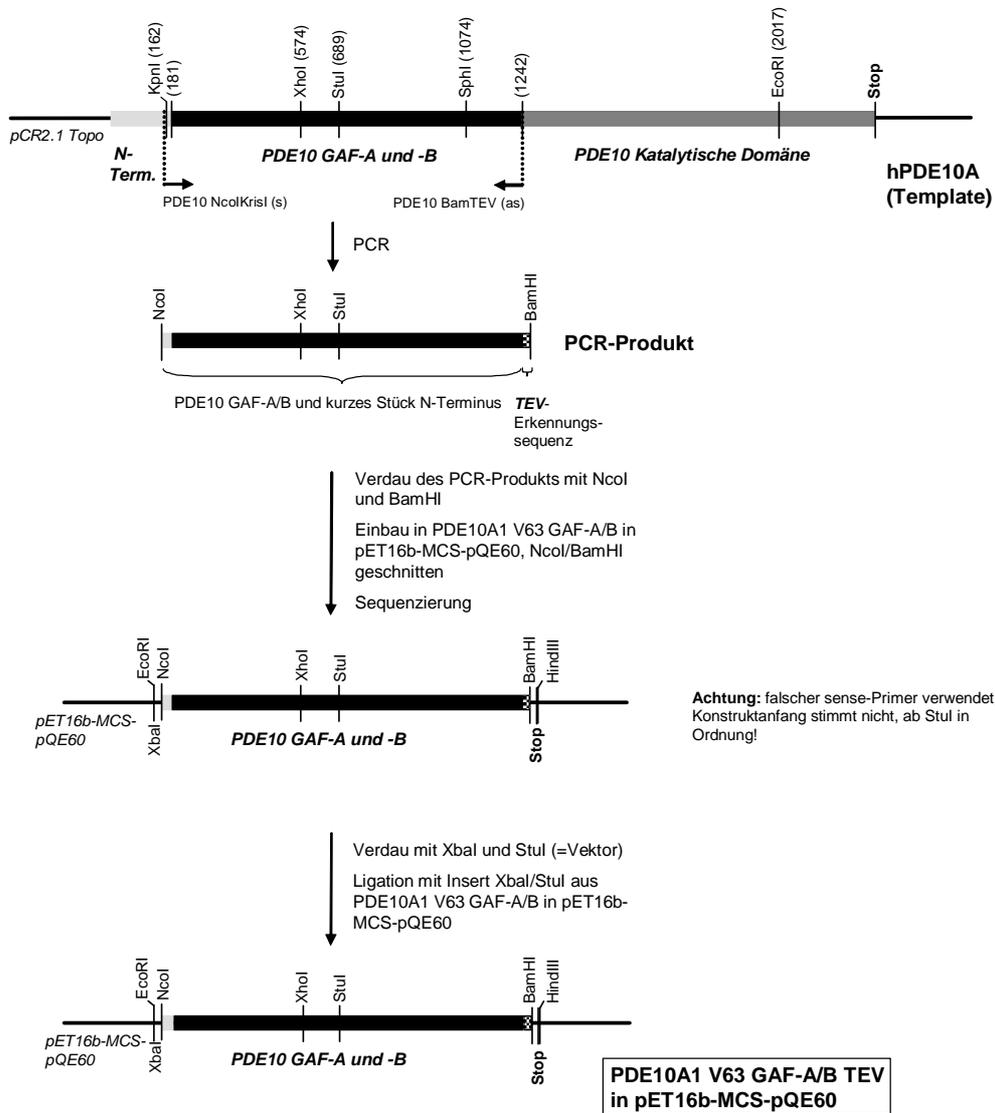
3.5.4.1. PDE10A1 D87 GAF-A/B



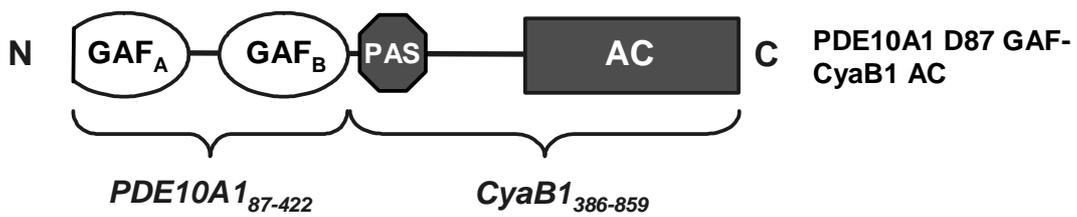
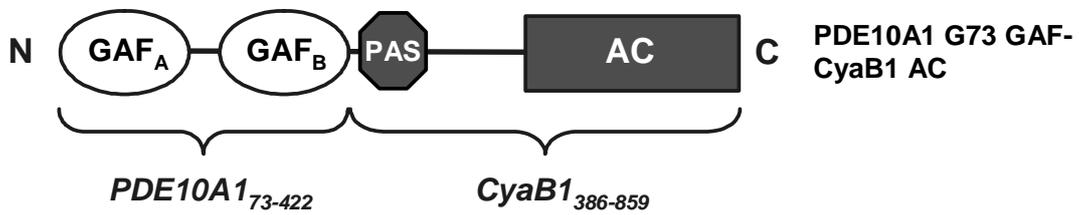
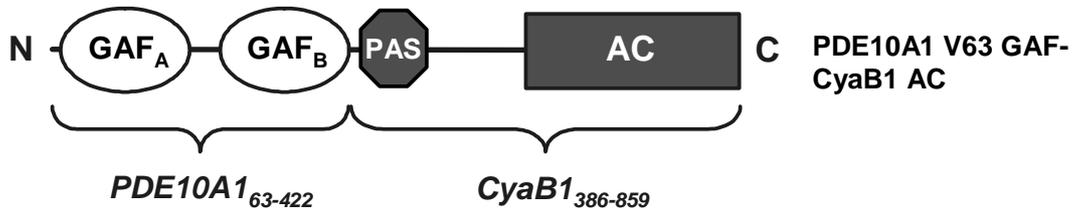
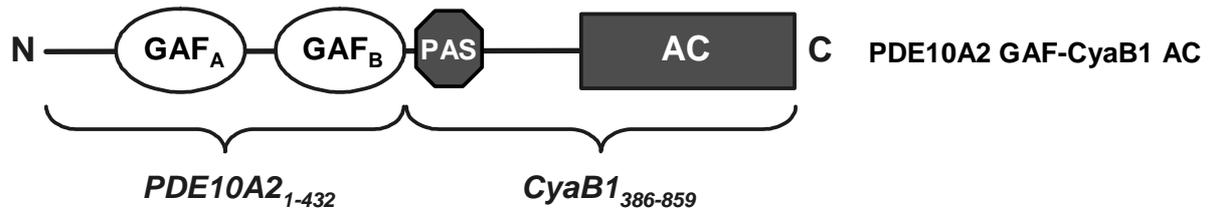
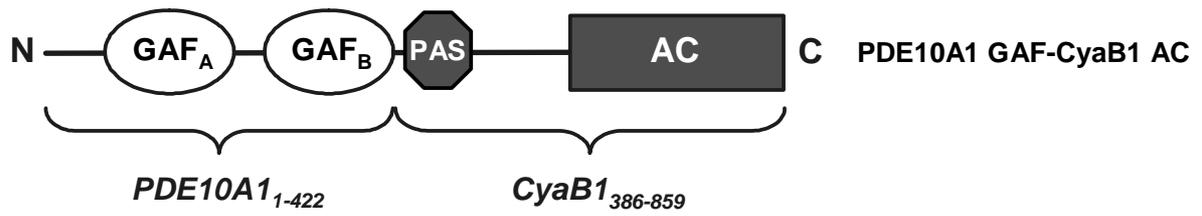
3.5.4.2. PDE10A1 V63 GAF-A/B



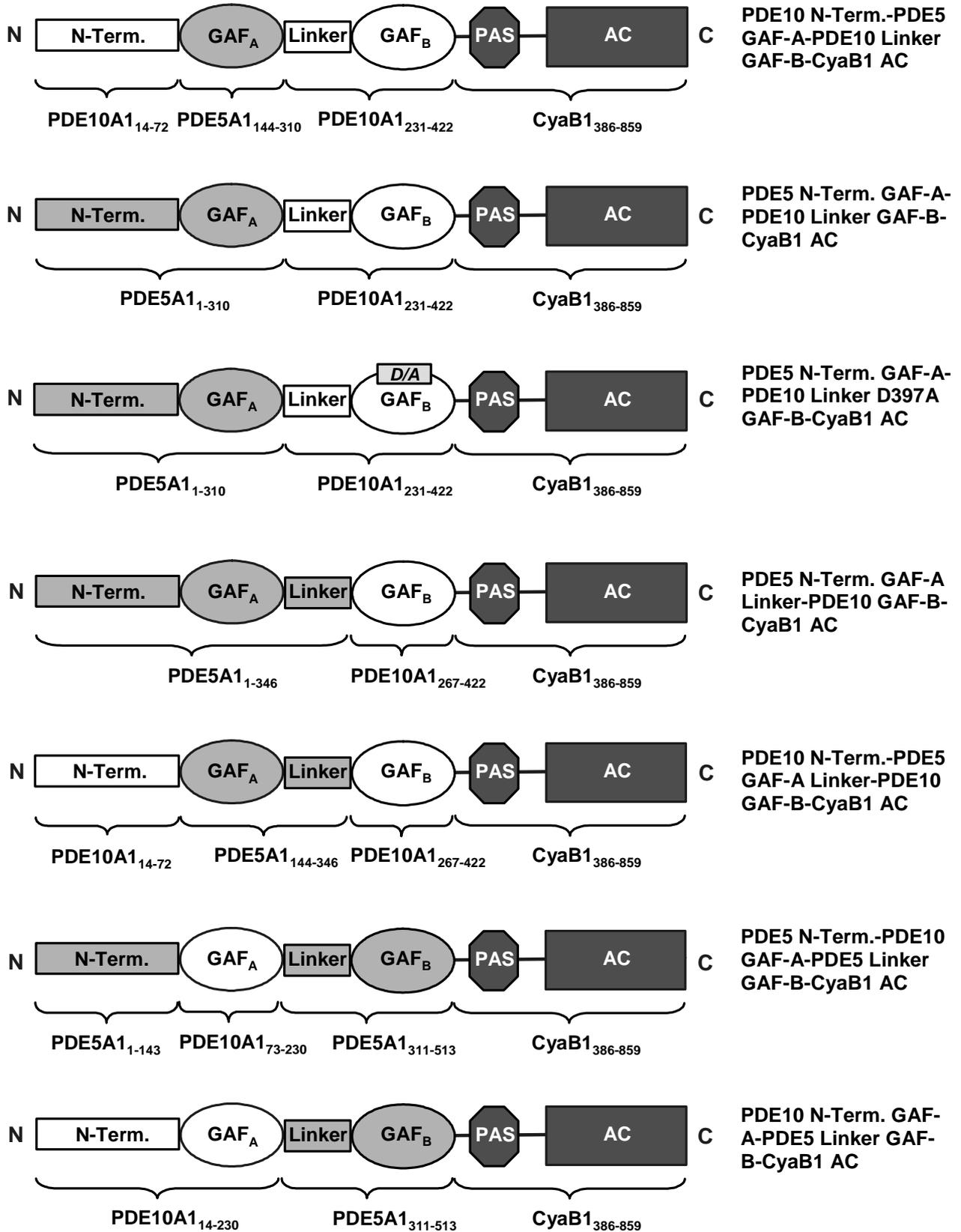
3.5.4.3. PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV

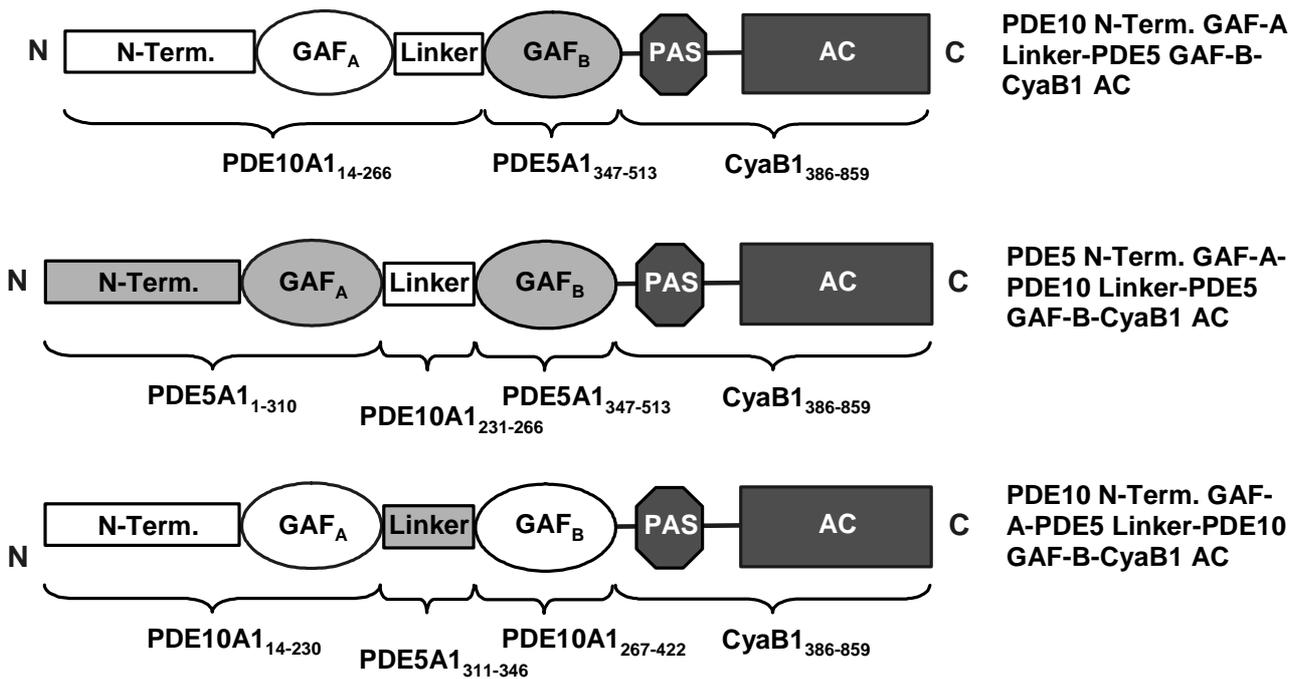






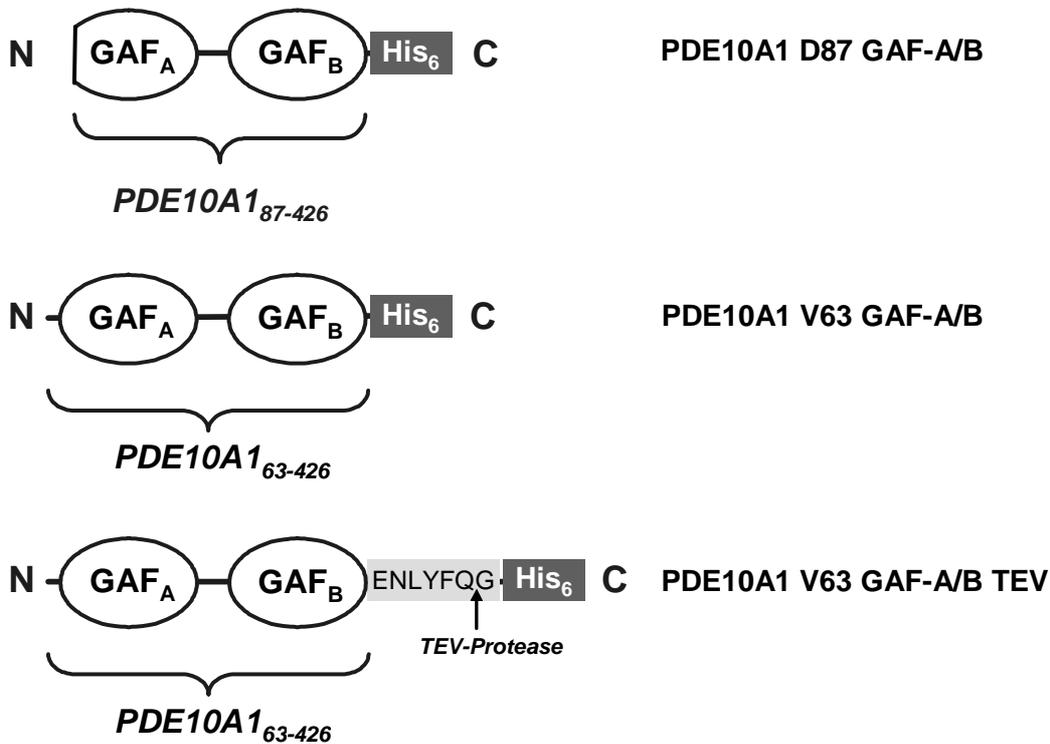
3.5.5.2. PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären





### 3.5.5.3. PDE10 GAF-Konstrukte zur Kristallisation

Bei allen drei Proteinen ist der C-terminale His<sub>6</sub>-Tag eingezeichnet.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Untersuchung der PDE10-CyaB1-Chimären

#### 4.1.1. Biochemische Charakterisierung der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Dr. Tobias Kanacher konnte in seiner Arbeit zeigen, dass ein Austausch der GAF-Domänen der CyaB1 aus dem Cyanobakterium *Anabaena* gegen die GAF-Domänen einer Säuger-PDE, der PDE2 der Ratte, ohne einen funktionellen Verlust möglich ist. Aus einer cAMP-stimulierbaren wurde eine cGMP-stimulierbare AC. Bei beiden erfolgte die Ligandenbindung an die GAF-B [14, 94]. Ebenso konnten Dr. Sandra Bruder für die GAF-Domänen der humanen PDE5 sowie Dr. Marco Groß-Langenhoff für das humane PDE11 GAF-Tandem zeigen, dass in beiden Fällen eine funktionelle Chimäre mit der CyaB1 AC erzeugt werden kann. Eine Stimulation der katalytischen Domäne der AC erfolgte bei beiden durch die Bindung von cGMP an die GAF-A. Dies verdeutlichte zudem, dass auch eine Signalübertragung von der GAF-A aus über eine größere Entfernung zum katalytischen Zentrum möglich ist [79, 107, 108].

Für die GAF-Domänen der PDE10 konnte mit Hilfe von Bindungsstudien bisher noch kein Ligand bestimmt werden [84]. Daher stellte sich die Frage, ob es möglich ist, ebenfalls mit den PDE10 GAF-Domänen und der CyaB1 AC eine funktionelle Chimäre als Testsystem zu erzeugen und mit dieser den Liganden der PDE10 GAF-Domänen zu bestimmen.

Dazu wurde wie unter 3.5.2.1. beschrieben, eine Chimäre aus den GAF-Domänen der humanen PDE10A und der PAS- und katalytischen Domäne der CyaB1<sup>4</sup> aus *Anabaena* kloniert (Abb.4-1).

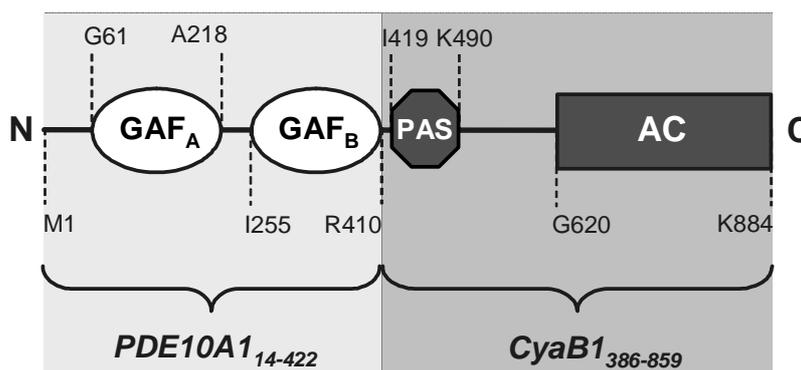


Abb. 4-1 Domänenstruktur der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Der PDE10 N-Terminus beginnt hier mit Leu-14 der PDE10A1. Das erste Methionin (M1) wurde als Start zusätzlich eingeführt (siehe auch die Konsensussequenz in Abb. 4-2). Die fortlaufend nummerierten ASn über den vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen den Beginn und das Ende der einzelnen Domänen im exprimierten Protein. Die Positionen der verwendeten Sequenzabschnitte in den jeweiligen Ausgangssequenzen (PDE10A1 bzw. CyaB1) sind unter den geschweiften Klammern angegeben. Der Beginn und das Ende der PDE10 GAF-A- und GAF-B-Domänen wurde mit Hilfe von Alignments der PDE10 mit CyaB1, CyaB2, PDE2, 5, 6 und 11 bestimmt.

<sup>4</sup> Zur Vereinfachung werden in der Arbeit beide zusammen als CyaB1 AC bezeichnet.

## Ergebnisse

Im Menschen stellen die PDE10A1 und die PDE10A2 die Hauptisoformen dar. Sie unterscheiden sich nur in der Länge ihres N-Terminus [87]. Ab der AS-Sequenz LTDEKV stimmen beide in ihren Sequenzen überein (Abb. 4-2). Um die PDE10 GAF-Domänen zunächst unabhängig von der Länge des N-Terminus zu charakterisieren, wurde als Konstruktbeginn LTDEKV gewählt.

hPDE10A1:	-----MRIEERKSQHLTGLTDEKVKAYLSLHPQVLDEFVS	35
hPDE10A2:	MEDGPSNNASCFRRLTECFLSPLTDEKVKAYLSLHPQVLDEFVS	45
Consensus:	-----MLTDEKVKAYLSLHPQVLDEFVS	23
hPDE10A1:	ESVSAETVEKWLKRKNNKSEDESAPKEVSRyQDTNMQGVVYELNS	80
hPDE10A2:	ESVSAETVEKWLKRKNNKSEDESAPKEVSRyQDTNMQGVVYELNS	90
Consensus:	ESVSAETVEKWLKRKNNKSEDESAPKEVSRyQDTNMQGVVYELNS	68

→ GAF-A

Abb. 4-2 Alignment der N-Termini der humanen PDE10A1 und PDE10A2

Ab der grau unterlegten Sequenz stimmen PDE10A1 und PDE10A2 in ihrer AS-Sequenz überein. Der Beginn der GAF-A ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (siehe dazu auch Abb. 4-38). h=human (Mensch).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre und deren D397A-Mutante mit Ni<sup>2+</sup>-NTA gereinigt und für die biochemische Charakterisierung der PDE10 GAF-Domänen verwendet. Die daraus erhaltenen Ergebnisse führten zusammen mit Dr. Marco Groß-Langenhoff, der die PDE11 GAF-Domänen untersuchte, zu folgender Veröffentlichung:

Groß-Langenhoff, M., Hofbauer, K., Weber, J., Schultz, A., Schultz, J. E.

cAMP Is a Ligand for the Tandem GAF Domain of Human Phosphodiesterase 10 and cGMP for the Tandem GAF Domain of Phosphodiesterase 11. *J Biol Chem* 2006; 281: 2841-46.

Da im Laufe der Arbeit festgestellt wurde, dass mit Ni<sup>2+</sup>-IDA ein besseres Reinigungsergebnis erzielbar war (siehe 4.1.1.1.), wurden alle nachfolgenden Konstrukte mit diesem Material gereinigt. Um einen Vergleich der Ergebnisse des PDE10 GAF-CyaB1 AC-Konstrukts und deren D397A-Mutante mit anderen Konstrukten zu ermöglichen, wurden alle Untersuchungen mit beiden Proteinen wiederholt. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden nachfolgend präsentiert. Die bereits veröffentlichten Daten sind im Anhang A-2 zu finden.

Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte sind Mittelwerte aus n Einzelwerten ± SEM (*standard error of the mean*).

4.1.1.1. Expression und Reinigung der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre besitzt einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag für die Aufreinigung mit Ni<sup>2+</sup>-NTA oder Ni<sup>2+</sup>-IDA. Das Molekulargewicht des exprimierten Proteins beträgt 103,8 kDa. Der IEP liegt bei 5,85.

Die Expression des PDE10 GAF-CyaB1 AC-Konstrukts wurde zu Beginn durch Variation der Temperatur (16°C und 19°C über Nacht; 22°C, 24°C, 27°C und 30°C für 5 h) sowie der IPTG-Konzentration (50 µM, 200 µM, 400 µM, 750 µM und 1 mM IPTG) optimiert. Die optimale Expressionsbedingung lag bei 24°C für 5-7 h. Die Induktion erfolgte mit 400 µM IPTG. Nach der Zellernte (siehe 3.2.2.) und Lyse (siehe 3.2.3.) wurde der Überstand mit 250 µl Ni<sup>2+</sup>-IDA (anfangs mit 100 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA) für 2-4 h auf Eis inkubiert. Die anschließende Reinigung wurde durch Variation der Imidazolkonzentrationen in den Wasch- und Elutionspuffern sowie der Wasch- und Elutionsvolumina optimiert. Die optimierte Reinigung erfolgte wie unter 3.2.4.1. bzw. 3.2.4.2. angegeben. Wie aus dem Western Blot ersichtlich wird, war eine Verwendung von Proteaseinhibitor nicht erforderlich (Abb. 4-3). Zur Entfernung des Imidazols wurde das Protein sofort nach der Reinigung in Dialysepuffer A für 2-4 h dialysiert (siehe 3.2.5.). Eine Lagerung des dialysierten Proteins erfolgte bei -20°C.

Die Reinigung unter Verwendung von Ni<sup>2+</sup>-IDA führte zu einem viel besser gereinigten Protein im Vergleich zum Ni<sup>2+</sup>-NTA (Abb. 4-3). Daher wurde für weitere Versuche Ni<sup>2+</sup>-IDA verwendet.

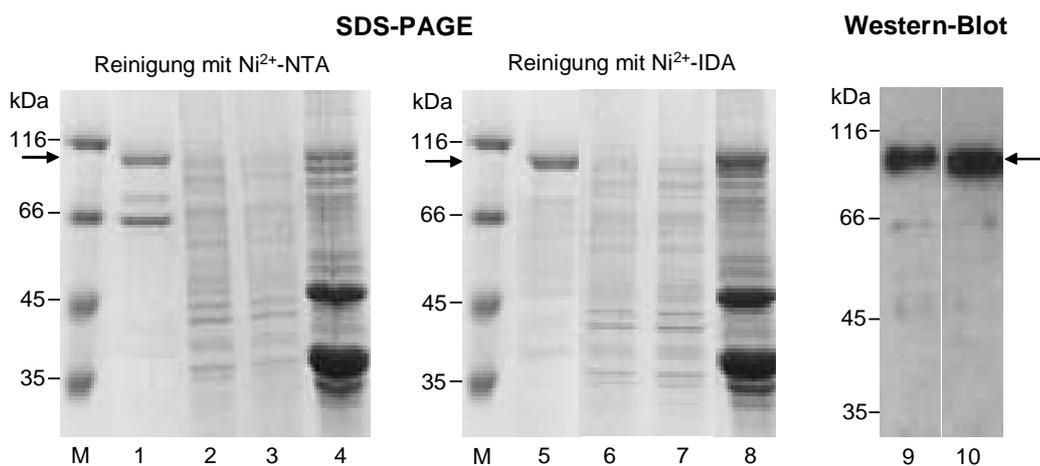


Abb. 4-3 SDS-PAGE-Gel und Western Blot von PDE10 GAF-CyaB1 AC

SDS-PAGE-Gel: **M**: Marker, **1+5**: Proteineluat (2 µg), **2+6**: Überstand nach Lyse/Zentrifugation (3 µg),

**3+7**: Überstand nach Nickelbindung (3 µg), **4+8**: Zellpellet (8 µg)

Western Blot: **9**: Protein nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung (0,1 µg), **10**: Protein nach Ni<sup>2+</sup>-IDA-Reinigung (0,05 µg)

4.1.1.2. Proteinabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die Proteinabhängigkeit für die PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre wurde mit einer Proteinmenge von 10 bis 1000 ng (1-96 nM Protein) bestimmt. Dazu wurde die spezifische Aktivität sowohl stimuliert (300  $\mu$ M cAMP) als auch unstimuliert (ohne cAMP) gemessen. Unstimuliert stieg die spezifische Aktivität mit zunehmender Proteinmenge leicht an (Abb. 4-4). Dies könnte daraus resultieren, dass aufgrund der steigenden Proteinmenge auch mehr cAMP durch die AC gebildet wird, welches das Protein wiederum stimuliert. Bei einer Stimulation mit 300  $\mu$ M cAMP sank die spezifische Aktivität mit zunehmender Proteinmenge um insgesamt 58% (Abb. 4-4). Dabei wurde ein wachsender Substratverbrauch beobachtet, was zur steigenden Bildung von Pyrophosphat als Nebenprodukt führt. Das wirkt wiederum hemmend auf die AC zusätzlich zur sinkenden Substratmenge [94]. Eine Ausbildung von Oligomeren bei hohen Proteinmengen wäre auch denkbar, was zur zunehmenden Hemmung des Proteins führen könnte. Dies wurde mit einem Cross-Linking-Versuch (siehe 4.1.1.11.) überprüft.

Aufgrund der beschriebenen Effekte wurden alle Tests daher im vorderen Bereich der Kurve, d.h. mit 50-100 ng Protein durchgeführt. Dies entspricht einem Substratumsatz von maximal 10%.

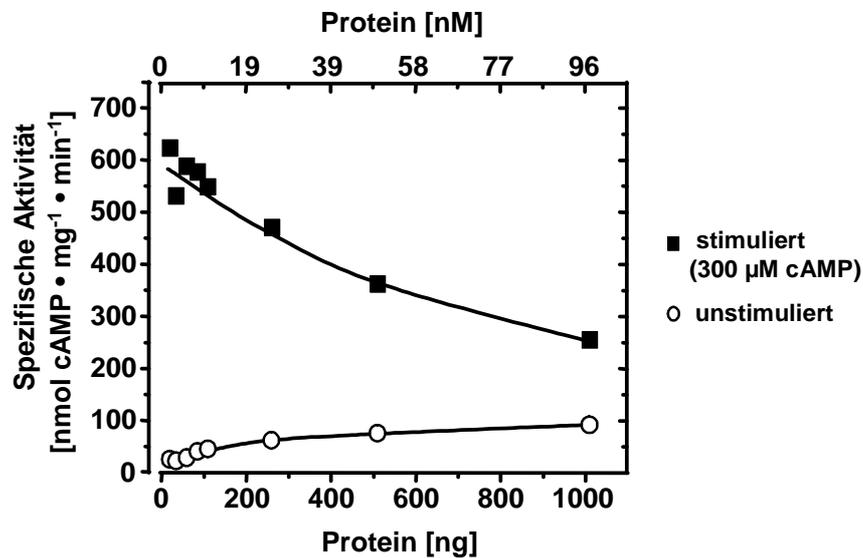


Abb. 4-4 Proteinabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die Testbedingungen waren: 10-1000 ng Protein, 10 min, 37°C, 75  $\mu$ M ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4, Fehlerbalken nicht angegeben.

4.1.1.3. Dosis-Wirkungskurve der PDE10 GAF-CyaB1 AC

In mehreren AC-Tests (n=4) wurde die spezifische Aktivität der Chimäre bei verschiedenen cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen als mögliche Liganden getestet.

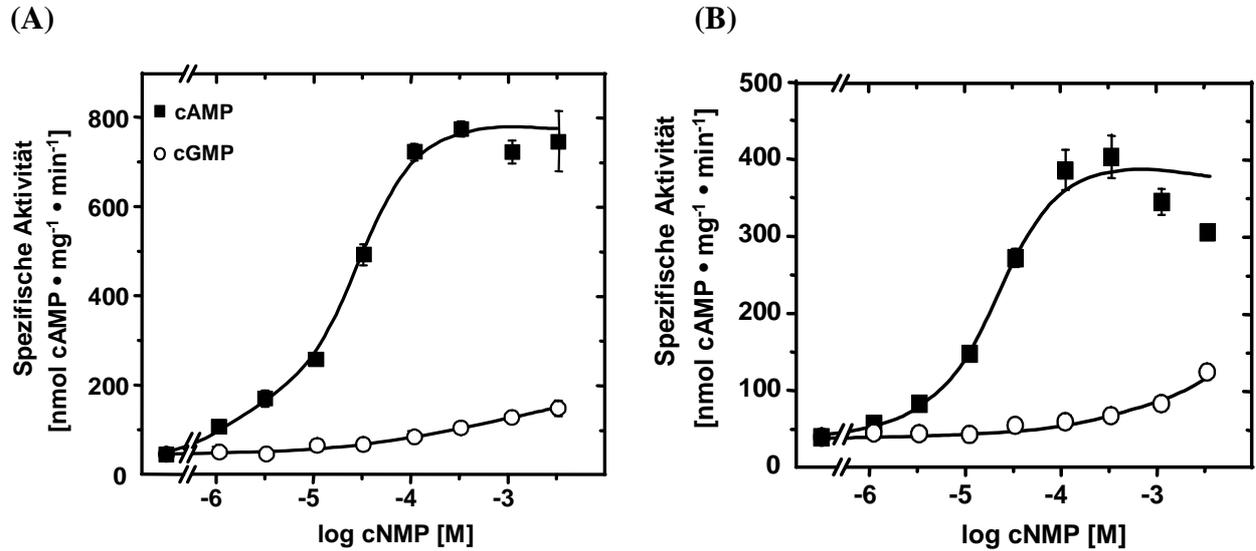


Abb. 4-5 Dosis-Wirkungskurve der PDE10 GAF-CyaB1 AC

nach (A) Ni<sup>2+</sup>-IDA-Reinigung und (B) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung [27], siehe Anhang A-2. Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4.

Die Chimäre zeigte eine enzymatische Aktivität mit einem Basalwert von  $51,7 \pm 5,3$  nmol cAMP/mg·min. Zudem ließ sie sich um einen Faktor von  $15,5 \pm 1,4$  mit 300 µM cAMP maximal stimulieren. Mit cGMP wurde die spezifische Aktivität nur um das  $4 \pm 0,8$ -fache bei 3 mM cGMP erhöht (Abb. 4-5A). Der EC<sub>50</sub>-Wert für cAMP lag bei  $18,1 \pm 1$  µM. Alle Messwerte für cAMP unterscheiden sich signifikant vom Basalwert ( $p < 0,005$ ). Für cGMP gilt dies erst ab 100 µM ( $p < 0,05$ ). Das mit Ni<sup>2+</sup>-NTA gereinigte Protein zeigte ebenfalls eine höhere Stimulation mit cAMP im Vergleich zu cGMP (Abb. 4-5B und Anhang A-2).

4.1.1.4. Kinetik der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die Bestimmung der kinetischen Parameter der PDE10 GAF-CyaB1 AC für ATP mit Mg<sup>2+</sup> als Cofaktor erfolgte nach Lineweaver-Burk sowie in An- und Abwesenheit von 300 µM cAMP. Die K<sub>m</sub>-Werte betragen  $23,5 \pm 1,1$  µM (unstimuliert) bzw.  $22,2 \pm 1,2$  µM (stimuliert). Eine Stimulation der AC verändert demnach nicht den K<sub>m</sub>. Die erhaltenen K<sub>m</sub>-Werte sind vergleichbar

## Ergebnisse

mit dem  $K_m$  des CyaB1-Holoenzym von  $38 \mu\text{M}$  [94]. Zudem zeigen sie, dass auch weiterhin mit  $75 \mu\text{M}$  ATP als Substrat getestet werden kann.  $V_{\max}$  lag für die unstimulierte Chimäre bei  $25,9 \pm 0,8 \text{ nmol/mg}\cdot\text{min}$  und wurde durch Stimulation mit  $300 \mu\text{M}$  cAMP auf  $559 \pm 25,6 \text{ nmol/mg}\cdot\text{min}$  erhöht (Abb. 4-6B). Die Hill-Koeffizienten betragen  $0,9 \pm 0,1$  (unstimuliert) sowie  $1 \pm 0,04$  (stimuliert), d.h. es liegt keine Kooperativität vor (Abb. 4-6C).

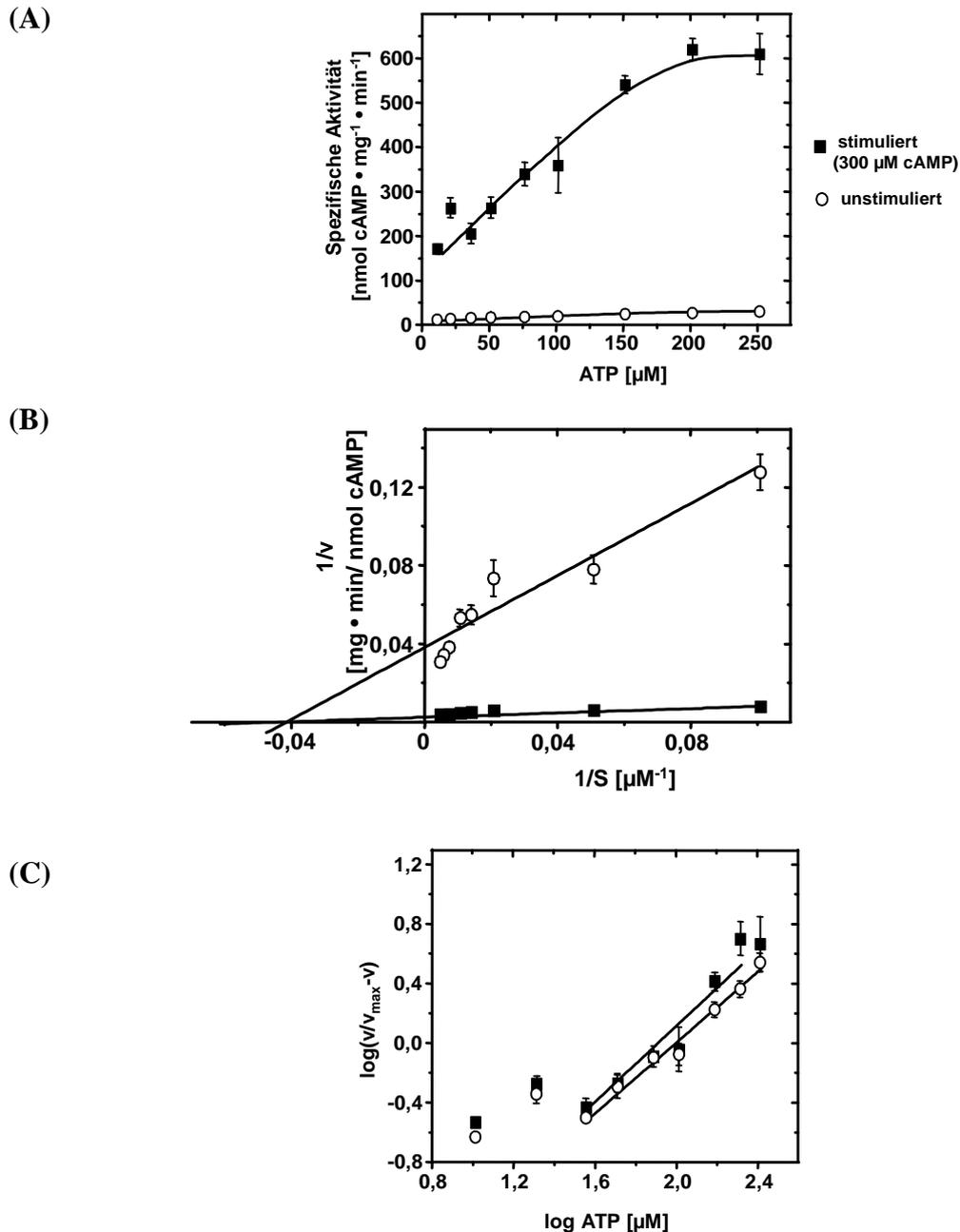


Abb. 4-6 Substratkinetik der PDE10 GAF-CyaB1 AC

(A) nach Michaelis-Menten (n=4), (B) Lineweaver-Burk (n=4) und (C) Hill-Plot (n=4). Testbedingungen: 10 min,  $37^\circ\text{C}$ ,  $10\text{-}250 \mu\text{M}$  ATP, Tris/HCl pH 7,5.

4.1.1.5. pH-Abhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Das pH-Optimum der PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre wurde mit verschiedenen Puffern in einem pH-Bereich von 5,6 bis 9,9 bestimmt. Die Chimäre zeigte in unterschiedlichen Puffersystemen bei annähernd gleichem pH-Wert ähnliche spezifische Aktivitäten. Die Kurven überschneiden sich in diesem Bereich. Das pH-Optimum der PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre liegt bei pH 7,0. Dort war die spezifische Aktivität sowohl stimuliert (300  $\mu\text{M}$  cAMP) als auch unstimuliert in Tris/HCl am höchsten (Abb. 4-7). Für alle nachfolgenden Tests wurde Tris/HCl als Puffersystem mit pH 7,5 aufgrund des pH-Optimums des CyaB1-Holoenzym verwendet [94].

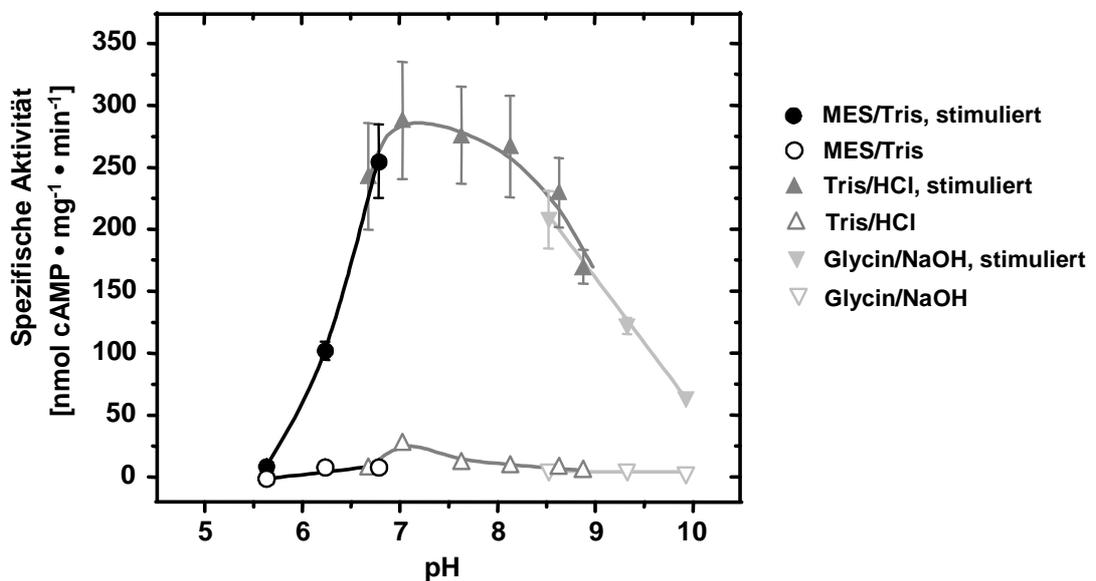


Abb. 4-7 pH-Abhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die Testbedingungen waren: 10 min, 37°C, 75  $\mu\text{M}$  ATP, pH 5,6-9,9, Stimulation mit 300  $\mu\text{M}$  cAMP; n=4.

4.1.1.6. Temperaturabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Das Temperaturoptimum liegt stimuliert (300  $\mu\text{M}$  cAMP) als auch unstimuliert bei 50°C und ist damit um 10°C höher als das des CyaB1-Holoenzym mit 40°C (Abb. 4-8) [94].

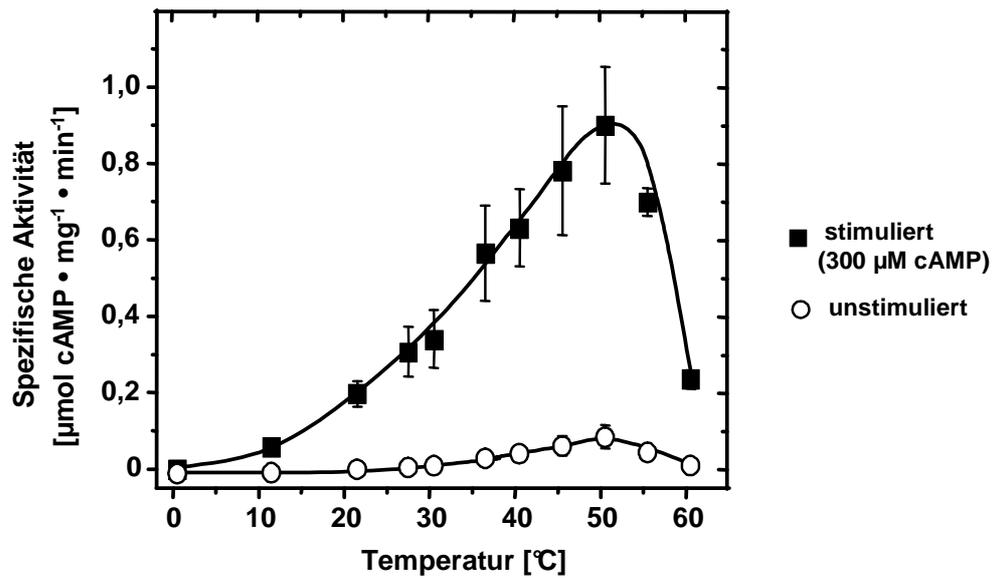


Abb. 4-8 Temperaturabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die Testbedingungen waren: 10 min, 0-60°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4.

Zur Berechnung der Aktivierungsenergie  $E_A$  wurden die im linearen Bereich der Temperaturabhängigkeitskurve (Abb. 4-8) liegenden Werte für das stimulierte (300 µM cAMP) und unstimulierte Protein verwendet. Die aus dem Arrheniusplot berechneten Aktivierungsenergien betragen für das unstimulierte Protein  $70 \pm 6,1$  kJ/(K·mol) (Abb. 4-9A) und für das mit 300 µM cAMP stimulierte Protein  $62,7 \pm 0,9$  kJ/(K·mol) (Abb. 4-9B). Diese Werte liegen im Bereich des CyaB1-Holoenzym mit  $E_A=65$  kJ/(K·mol) [94].

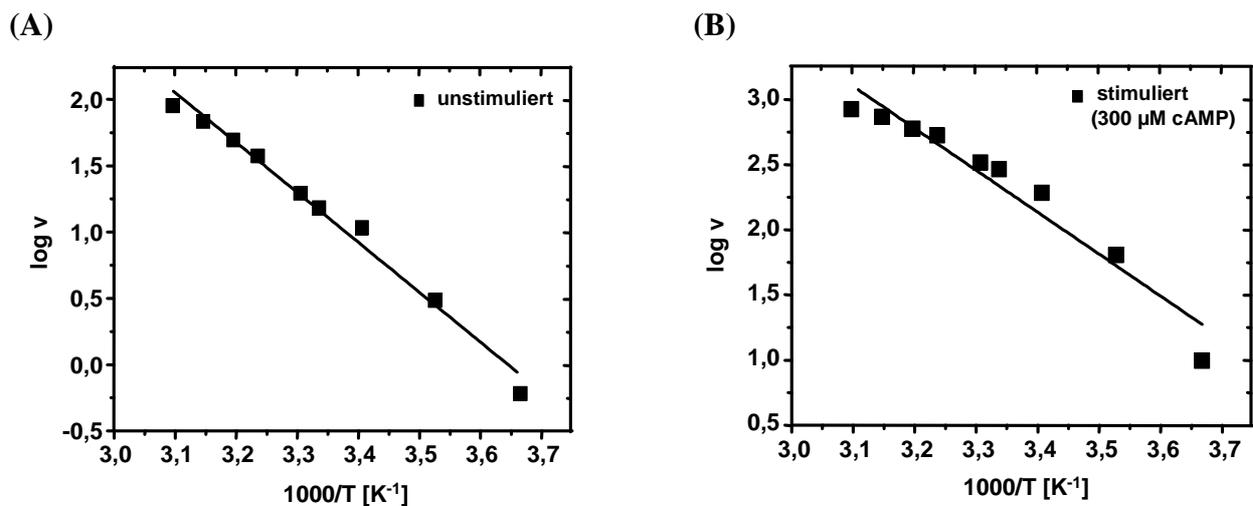


Abb. 4-9 Arrheniusplot der PDE10 GAF-CyaB1 AC

(A) unstimuliert, (B) stimuliert mit 300 µM cAMP; n=4.

4.1.1.7. Zeitabhängigkeit und  $K_{on}$ -Wertbestimmung der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung durch PDE10 GAF-CyaB1 AC verläuft unstimuliert und stimuliert (300  $\mu$ M cAMP) linear (Abb. 4-10A und B). Damit kann eine Stimulation durch von der CyaB1 AC gebildetes cAMP ausgeschlossen werden. Abb. 4-10B zeigt bei Auftragung der spezifischen Aktivität gegen die Zeit, dass mit 300  $\mu$ M cAMP die Kurve nach der vierten Testminute linear verläuft. Alle in der Arbeit durchgeführten Tests wurden für 10 min inkubiert.

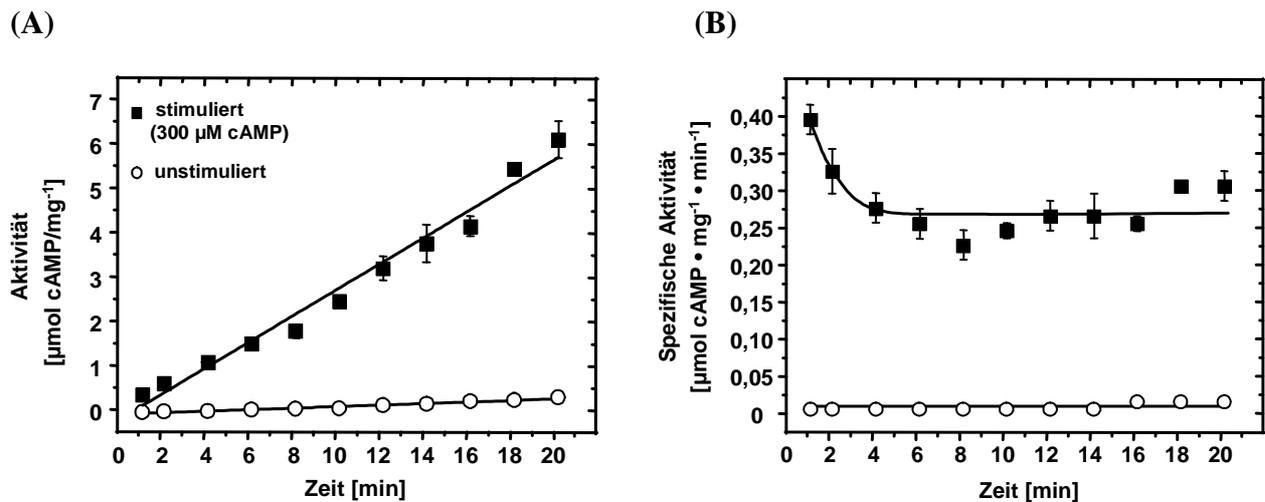


Abb. 4-10 Zeitabhängigkeit der PDE10 GAF-CyaB1 AC

(A) Auftragung der Aktivität gegen die Zeit, (B) Auftragung der spezifischen Aktivität gegen die Zeit. Testbedingungen: 10 min vorinkubiert, 1-20 min Reaktionszeit, 37°C, 75  $\mu$ M ATP, Tris/HCl pH 7,5, Stimulation mit 300  $\mu$ M cAMP; n=4.

Der  $K_{on}$ -Wert gibt an, wie schnell cAMP an die GAF-Domänen der PDE10 bindet und zu einer Stimulation der AC führt. Um diesen zu bestimmen, wurde der Reaktionsansatz nicht wie bei der Zeitabhängigkeit für 10 min auf Eis vorinkubiert. Er wurde lediglich 30 s bei 37°C vorgewärmt, um einen möglichen Temperatureffekt auszuschließen. Zudem erfolgte der Start der Reaktion hier durch Proteinzugabe und nicht durch Substratzugabe. Der Reaktionsansatz wurde wie bei der Zeitabhängigkeit bei 37°C für 1-20 min inkubiert. Abb. 4-11A weist ebenso wie Abb. 4-10A einen linearen Kurvenverlauf auf. Dies zeigt, dass die Stimulation durch cAMP sofort erfolgt und keiner Vorinkubation bedarf. Abb. 4-11B verdeutlicht zusätzlich, dass die Variation der Vorinkubationszeit keinen Einfluss auf die spezifische Aktivität hat.

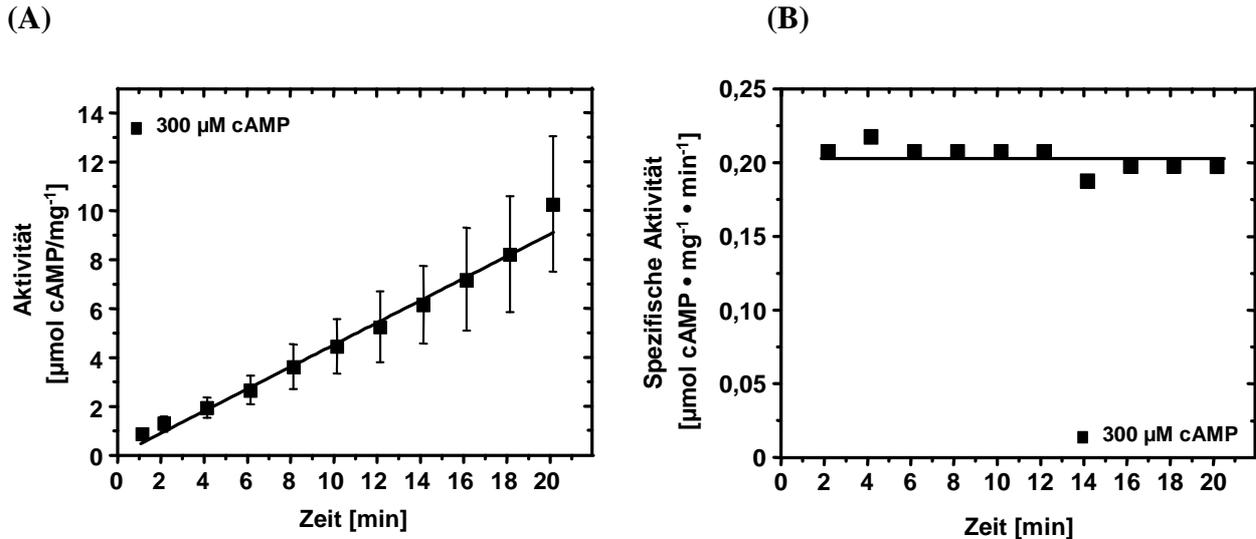


Abb. 4-11  $K_{on}$ -Wertbestimmung der PDE10 GAF-CyaB1 AC

(A) ohne Vorinkubation, Variation der Reaktionszeit für 1-20 min, n=4; (B) Variation der Vorinkubationszeit für 2-20 min, 10 min Reaktionszeit, n=2. Testbedingungen: 37°C, 75 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5, Stimulation mit 300 μM cAMP.

#### 4.1.1.8. $K_{off}$ -Wertbestimmung der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Mit Hilfe des  $K_{off}$ -Wertes lässt sich die Geschwindigkeit der Abdissoziation von cAMP von den PDE10 GAF-Domänen bestimmen. Zunächst wurde das Protein für 10 min zur Stimulation mit 100 μM cAMP inkubiert. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Ansätze auf 0,5 μM cAMP. Nach 1, 2, 5, 10, 30 und 60 min wurde die Reaktion durch ATP-Zugabe gestartet.

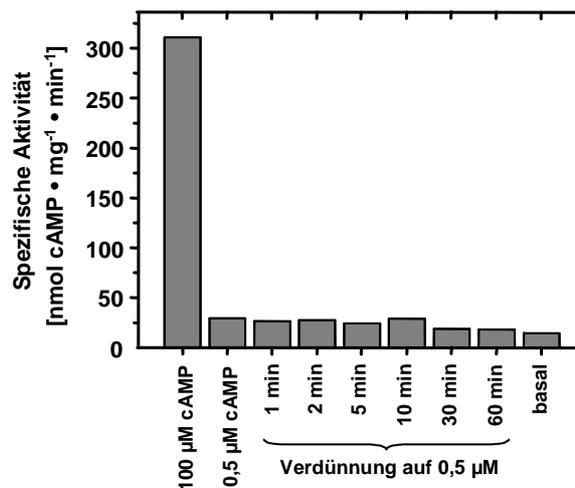


Abb. 4-12  $K_{off}$ -Wertbestimmung der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die Testbedingungen waren: 10 min, 37°C, 75 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5, n=2.

Abb. 4-12 zeigt, dass cAMP bereits innerhalb der ersten Minute nach Verdünnen abdissoziiert. Die geringen Unterschiede der spezifischen Aktivitäten nach 1-60 min sind im Vergleich zum Ansatz mit 0,5  $\mu\text{M}$  cAMP nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

#### 4.1.1.9. Einfluss anderer Nucleoside und Nucleotide

Um zu untersuchen, ob es neben cAMP noch weitere Liganden für die PDE10 GAF-Domänen gibt, die vielleicht sogar mit einer noch höheren Affinität binden als cAMP, wurden verschiedene Nucleoside und Nucleotide mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  getestet. Zudem wurden auch einige cAMP-Analoga verwendet, um so einen Hinweis auf wichtige Gruppen am cAMP für die Bindung an die GAF-Domänen zu bekommen.

Keine der untersuchten Verbindungen besaß eine höhere stimulatorische Wirkung im Vergleich zu cAMP. Die untersuchten cAMP-Analoga zeigten eine Reduktion der Stimulation um 10-83%. Die Entfernung des N-7-Stickstoffs am Purin hatte den geringsten Einfluss, das Entfernen oder Ersetzen der Aminogruppe durch Chlorid an der C-6-Position, deren Versetzen zum C-2 des Adenins sowie ein verändertes N-1 hatten den größten Einfluss auf die Stimulation. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Aminogruppe des Adenins bei der Bindung von cAMP an die PDE10 GAF-Domänen hin. Die mit den untersuchten Verbindungen erhaltenen Stimulationen sind alle signifikant verschieden zu der mit 100  $\mu\text{M}$  cAMP außer mit 7-CH-cAMP (Abb. 4-13).

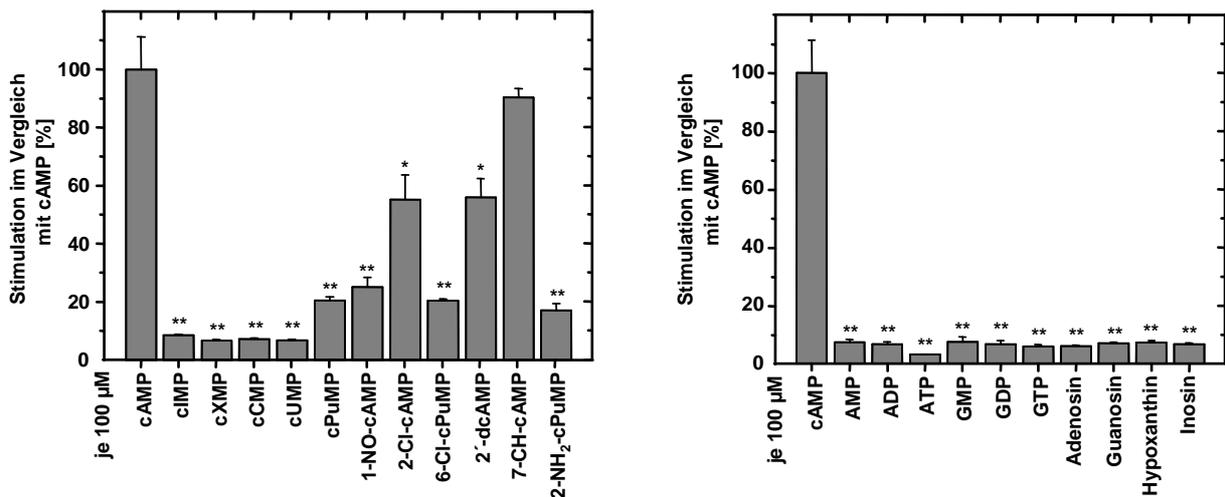


Abb. 4-13 Übersicht über die Stimulation durch verschiedene Nucleoside und Nucleotide im Vergleich mit cAMP

Die Testbedingungen waren: 10 min, 37°C, 75  $\mu\text{M}$  ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4; t-Test: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Die Stimationsfaktoren sind in Bezug auf die Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  cAMP dargestellt (=100%).

#### 4.1.1.10. Stabilität und Lagerung der PDE10 GAF-CyaB1 AC

Die gereinigte und dialysierte PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre ließ sich für bis zu vier Monate ohne Beeinträchtigung ihrer Stimulierbarkeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit 35% Glycerin lagern. Erst nach einer Lagerung von länger als vier Monaten war eine Verringerung der Stimulation mit  $300\ \mu\text{M}$  cAMP zu verzeichnen (Abb. 4-14). Das Protein ist somit über einen längeren Zeitraum stabil.

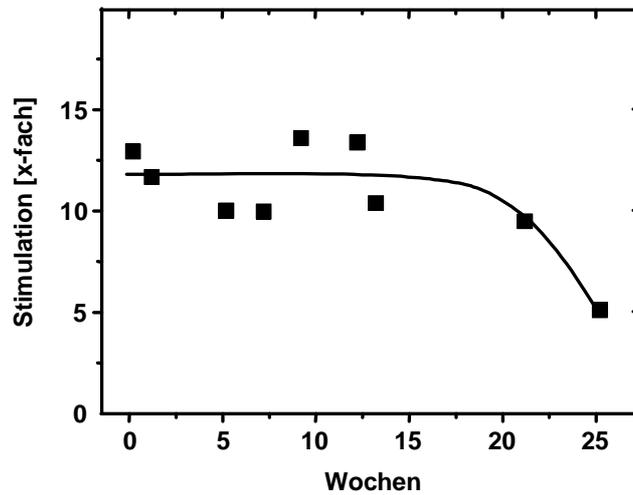
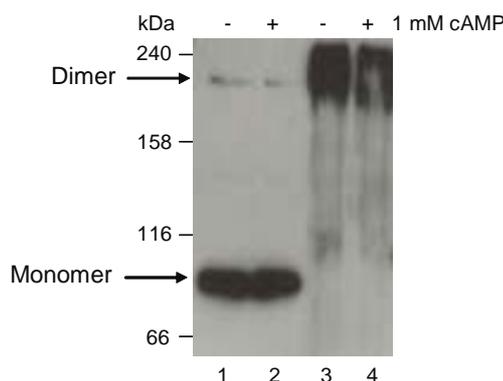


Abb. 4-14 Abhängigkeit der Stimulation der PDE10 GAF-CyaB1 AC mit  $300\ \mu\text{M}$  cAMP von der Lagerungsdauer. Die Testbedingungen waren: 10 min,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $75\ \mu\text{M}$  ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=2.

#### 4.1.1.11. Cross-Linking

Die mögliche Ausbildung von Dimeren oder Oligomeren der PDE10 GAF-CyaB1 AC wurde in einer Cross-Linking-Reaktion überprüft. Es wurde dabei wie unter 3.2.10. beschrieben, verfahren. Der Einfluss von cAMP auf die Dimerbildung wurde durch Zugabe von  $1\ \text{mM}$  cAMP zum Reaktionsansatz untersucht. Als Kontrollen diente Protein ohne Glutaraldehyd jeweils mit und ohne  $1\ \text{mM}$  cAMP. Der Western Blot in Abb. 4-15 zeigt deutlich eine Dimerbildung (MW:  $207,6\ \text{kDa}$ ) der Chimäre unabhängig vom Zusatz von cAMP. Eine dünne Dimerbande ist bereits bei den Kontrollen zu erkennen. Die Banden über dem Dimer könnten auf ein Tetramer hindeuten.



*Abb. 4-15 Western Blot nach Cross-Linking-Reaktion mit PDE10 GAF-CyaB1 AC*

(1) Protein ohne Glutaraldehyd und ohne 1 mM cAMP (Kontrolle), (2) Protein ohne Glutaraldehyd und mit 1 mM cAMP (Kontrolle), (3) Protein mit Glutaraldehyd und ohne 1 mM cAMP, (4) Protein mit Glutaraldehyd und mit 1 mM cAMP; Reaktionsbedingungen: 7 mM Glutaraldehyd, 200 ng Protein  $\pm$  1 mM cAMP, 30 min, RT.

#### 4.1.1.12. Regenerierendes System

Um auszuschließen, dass in den gereinigten und getesteten Proteinen eventuell vorhandene *E. coli*-Proteine ebenfalls zur gemessenen Aktivität beitragen, wurde der leere Expressionsvektor *pRSET A* in *E. coli BL21 (DE3) [pRep4]*-Zellen exprimiert. Der lysierte Zellüberstand nach Zentrifugation wurde in Anwesenheit von Kreatinkinase und Kreatinphosphat getestet. Die gemessenen Werte lagen im Bereich des Säulenhintergrunds (nicht gezeigt). Damit ist ein Einfluss von *E. coli*-Proteinen auf die gemessenen Aktivitäten auszuschließen.

#### 4.1.2. Untersuchung der Rolle des NKFDE-Motivs

Wie bereits unter 1.2.2. beschrieben, besitzen 12 der 14 GAF-Domänen der Säuger-PDEn ein NKFDE-Motiv. Über die Rolle dieses konservierten Sequenzmotivs gibt es verschiedene Aussagen. Zum einen wird ihm eine Bedeutung bei der Bindung cyclischer Nucleotide zugesprochen [33, 34], zum anderen wird dessen Funktion bei der Ausbildung und Stabilisierung der Bindungstasche diskutiert [30, 35].

Bei der humanen PDE10 besitzt nur die GAF-B ein vollständiges NKFDE-Motiv. Die GAF-A enthält an dieser Stelle ein RHFHQ, in dem nur das Phe konserviert ist (siehe Abb. 1-3). Es ist daher denkbar, dass nur die GAF-B an der Ligandenbindung beteiligt ist und die GAF-A eine andere Funktion besitzt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Mutationen in beiden Domänen eingeführt.

4.1.2.1. PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC

Zunächst wurde in der GAF-B das konservierte Asp-397<sup>5</sup> im NKFDE-Motiv zu Ala mutiert, um zu sehen, welchen Einfluss dies auf die Ligandenbindung und die Stimulation der katalytischen Aktivität der AC hat.

PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC wurde wie unter 3.5.2.2. beschrieben, kloniert. Das Molekulargewicht des exprimierten und gereinigten Proteins beträgt 103,7 kDa (Domänenstruktur unter 3.5.5.1.). Der IEP liegt bei 5,9. Die Expression erfolgte bei 19°C über Nacht nach Induktion mit 200-400 µM IPTG, weil eine Expression bei 24°C für 5 h aufgrund des sehr langsamen Wachstums der Kulturen nicht möglich war. Die Reinigung des exprimierten Proteins wurde mit 100 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA oder 250 µl Ni<sup>2+</sup>-IDA wie unter 3.2.4.1. bzw. 3.2.4.2. beschrieben, durchgeführt. Mit Ni<sup>2+</sup>-IDA war die Ausbeute an Protein höher im Vergleich zum Ni<sup>2+</sup>-NTA. Nach der Reinigung wurde das Protein für mindestens 2 h im Dialysepuffer A bei 4°C dialysiert und bei -20°C gelagert. Die Abb. 4-16 zeigt einen Western Blot mit Protein nach der Reinigung mit Ni<sup>2+</sup>-NTA bzw. Ni<sup>2+</sup>-IDA. Die Verwendung von Protease-Inhibitor konnte die unteren Banden auf dem Western Blot nicht beseitigen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um C-terminale Abbruchprodukte, die eine verkürzte katalytische Domäne besitzen und dadurch nicht mehr funktionsfähig sind. Der His<sub>6</sub>-Tag hängt am N-Terminus, weshalb diese Produkte detektierbar sind.

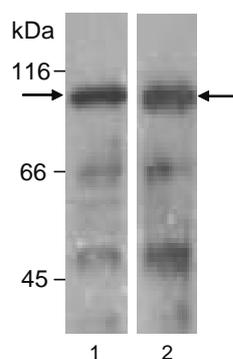


Abb. 4-16 Western Blot der PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC

Western Blot mit (1) Protein nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung (0,5 µg) und (2) Protein nach Ni<sup>2+</sup>-IDA-Reinigung (0,5 µg).

Die Mutation von Asp zu Ala in GAF-B führte zu einer um 99% verringerten Basalaktivität von  $0,29 \pm 0,02$  nmol cAMP/mg·min, einer mit 3 mM cAMP erhöhten maximalen Stimulation um das  $33,9 \pm 4,1$ -fache und einem 33-fach erhöhten EC<sub>50</sub>-Wert von  $596 \pm 113$  µM für cAMP im Vergleich zur PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre (Abb. 4-17). Die Bindung von cAMP an die

<sup>5</sup> Nummerierung bezieht sich immer auf PDE10A1

GAF-B ist damit stark reduziert, ermöglicht aber dennoch eine Aktivierung der AC. Mit 3 mM cGMP war der Stimulationsfaktor von  $2,2 \pm 0,1$ -fach etwas verringert (Abb. 4-17). Die Unterschiede zur PDE10 GAF-CyaB1 AC sind alle signifikant ( $p < 0,05$ ).

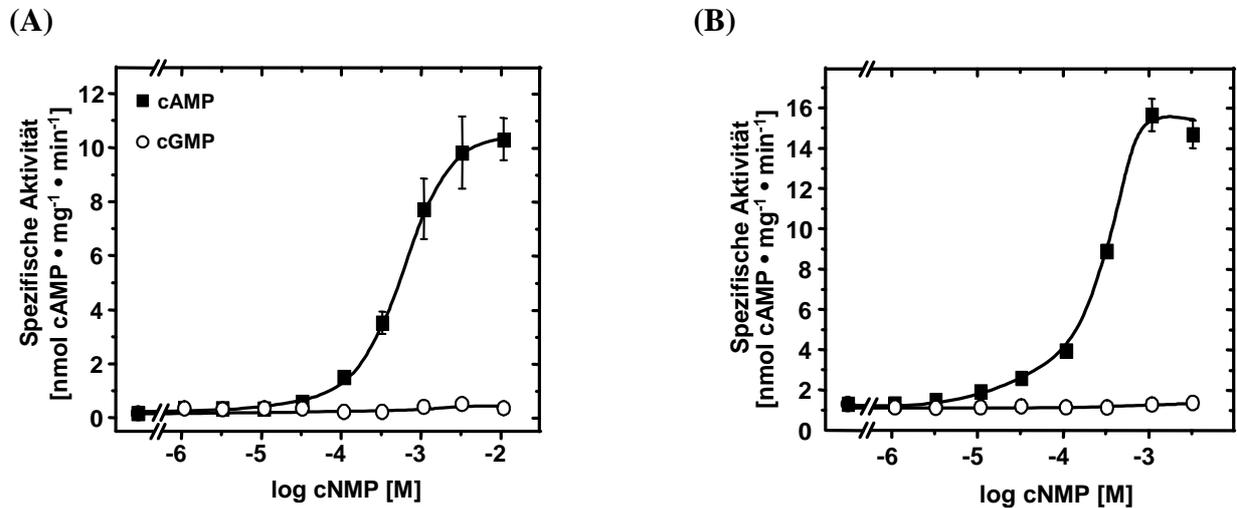
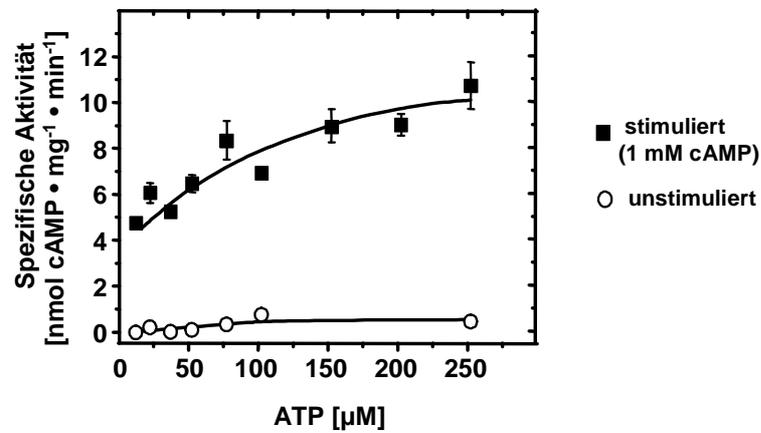


Abb. 4-17 Dosis-Wirkungskurve der PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC-Chimäre

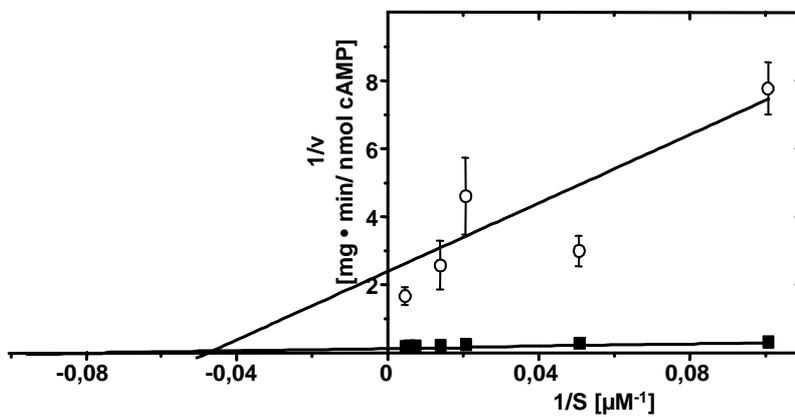
Nach (A) Ni<sup>2+</sup>-IDA-Reinigung und (B) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung [27], siehe Anhang A-2. Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten der PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC unterscheiden sich signifikant vom Basalwert ab 10 μM cAMP ( $p < 0,05$ ). Alle Messwerte sind signifikant verschieden von PDE10 GAF-CyaB1 AC ( $p < 0,05$ ).

Um eine Auswirkung der D/A-Mutation auf die enzymatischen Eigenschaften der AC ausschließen zu können, wurden die kinetischen Parameter der Mutante bestimmt. Der  $K_m$ -Wert (nach Lineweaver-Burk) lag für das unstimulierte Protein bei  $20,6 \pm 1,2$  μM (mit 1 mM cAMP:  $11,4 \pm 0,4$  μM) und liegt damit im Bereich der PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre.  $V_{max}$  war deutlich verringert mit  $0,4 \pm 0,05$  nmol/mg-min (unstimuliert) und  $10 \pm 0,5$  nmol/mg-min (1 mM cAMP). Laut den aus dem Hill-Plot bestimmten Hill-Koeffizienten von  $0,62 \pm 0,13$  (unstimuliert) und  $0,44 \pm 0,09$  (mit 1 mM cAMP) liegt wie bei PDE10 GAF-CyaB1 AC keine Kooperativität vor (Abb. 4-18).

(A)



(B)



(C)

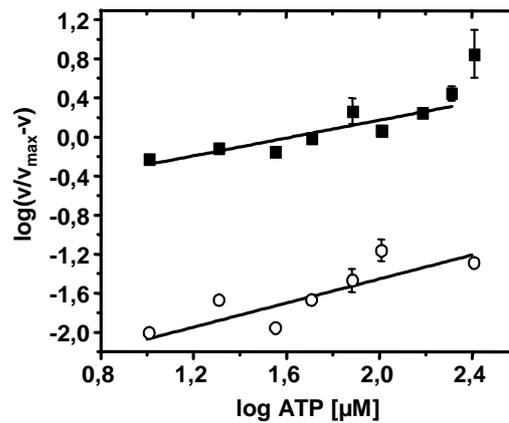


Abb. 4-18 Substratkinetik der PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC-Chimäre

(A) nach Michaelis-Menten (n=4), (B) Lineweaver-Burk (n=4) und (C) Hill-Plot (n=4). Testbedingungen: 10 min, 37°C, 10-250 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5. Es wurden hier bis 250 ng Protein verwendet, da mit 50 ng Protein ohne Stimulation mit cAMP die Messwerte für eine Auswertung zu niedrig waren.

4.1.2.2. PDE10 NKFDE GAF-CyaB1 AC

Zur Klärung der Frage, ob ein vollständiges NKFDE-Motiv in der GAF-A der PDE10 zur Zunahme der Stimulation der CyaB1 AC führt oder sogar die Affinität der PDE10 GAF-Domänen für cAMP oder cGMP erhöht, wurde in GAF-A das RHFHQ-Motiv durch NKFDE ersetzt (siehe 3.5.5.1.). Das nach 3.5.2.3. klonierte Konstrukt wurde über Nacht bei 19°C nach Induktion mit 400 µM IPTG exprimiert und wie unter 3.2.4.1. beschrieben, gereinigt und anschließend in Dialysepuffer A dialysiert. In Abb. 4-19 ist der Western Blot des gereinigten Proteins (MW: 103,7 kDa) dargestellt, auf dem neben der gewünschten Proteinbande auch einige Abbruchprodukte zu erkennen sind.

Die im AC-Test gemessene Basalaktivität des Proteins lag bei  $0,3 \pm 0,2$  nmol cAMP/mg-min und ist damit um mehr als 99% geringer als die der PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre. Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde mit 3 mM cAMP um einen Faktor von  $14,4 \pm 5,8$  und mit 3 mM cGMP um das  $3,2 \pm 1,1$ -fache maximal erhöht. Der  $EC_{50}$ -Wert ist mit  $30,5 \pm 10,7$  µM für cAMP etwas größer im Vergleich zur nicht-mutierten PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre (Abb. 4-19). Bis auf die stark verringerte Basalaktivität liegen alle gemessenen Werte in etwa in der Größenordnung der vergleichbaren Werte der PDE10 GAF-CyaB1 AC. Die Stimulation der katalytischen Aktivität der AC sowie die Affinität der GAF-Domänen für cAMP oder cGMP wurde durch die Mutation nicht erhöht.

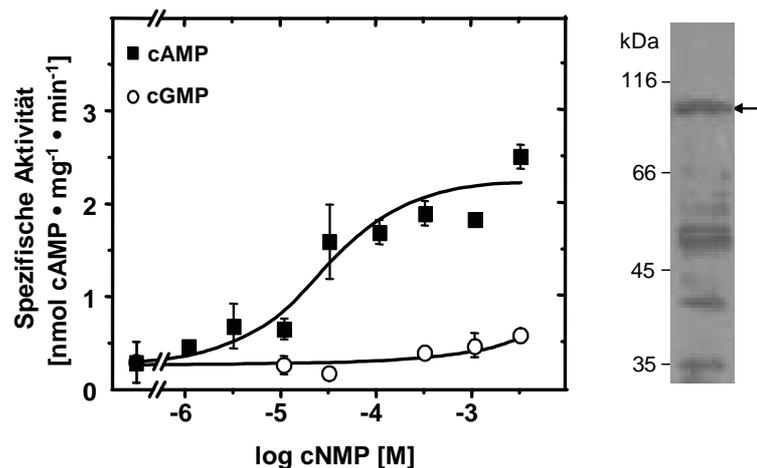


Abb. 4-19 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10 NKFDE GAF-CyaB1 AC

Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4; Western Blot (rechts): 0,5 µg Protein.

4.1.2.3. PDE10 NKFDE GAF-A D397A GAF-B-CyaB1 AC

Um den Einfluss eines vollständigen NKFDE-Motivs in GAF-A in Kombination mit der D/A-Mutation im NKFDE-Motiv in GAF-B auf die cAMP- bzw. cGMP-Bindung sowie die Stimulation der katalytischen Aktivität der AC zu untersuchen, wurde das RHFHQ-Motiv zum NKFDE in der GAF-A der PDE10 zusammen mit dem Asp-397 in GAF-B zu Ala mutiert (siehe 3.5.2.4. und 3.5.5.1.). Die Expression des Proteins erfolgte bei 24°C für 5-6 h nach Induktion mit 400 µM IPTG. Die Reinigung (siehe 3.2.4.1.) und die Dialyse (siehe 3.2.5.) wurden wie bisher durchgeführt. Ein Nachweis des gereinigten und dialysierten Proteins (MW: 103,7 kDa) erfolgte über einen Western Blot (Abb. 4-20).

Die Basalaktivität ( $1,9 \pm 0,5$  nmol cAMP/mg·min) ist um 96% im Vergleich zur PDE10 GAF-CyaB1 AC verringert. Mit 3 mM cAMP wurde eine maximale Stimulation von nur  $2,7 \pm 0,3$ -fach erreicht. Mit 3 mM cGMP erfolgte gar keine Stimulation mehr ( $0,44 \pm 0,16$ -fach). Der virtuelle  $EC_{50}$ -Wert ist mit  $662 \pm 120$  µM für cAMP um das 37-fache höher im Vergleich mit der PDE10 GAF-CyaB1 AC und liegt etwas über dem  $EC_{50}$ -Wert der PDE10 D397A-Mutante (Abb. 4-20). Diese Ergebnisse zeigen eine stark reduzierte Affinität des Proteins für cAMP und cGMP. Die maximale Stimulation der katalytischen Aktivität der AC mit cAMP ist im Vergleich zur PDE10 NKFDE GAF-CyaB1 AC und der PDE10 D397A GAF-Mutante um 81-92% verringert.

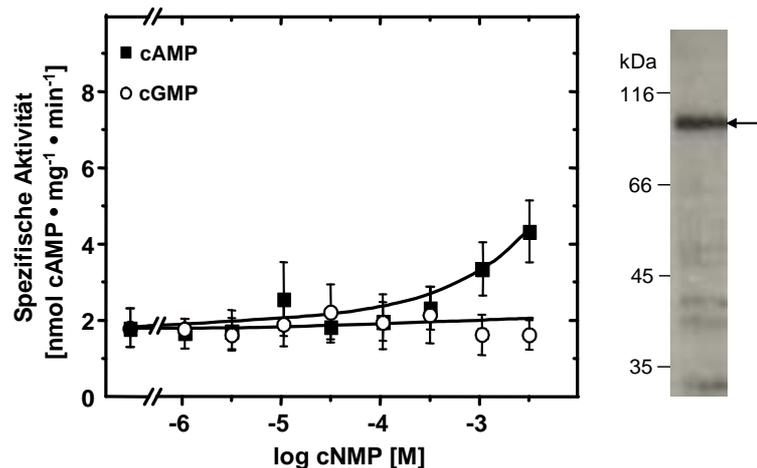


Abb. 4-20 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10 NKFDE GAF-A D397A GAF-B-CyaB1 AC  
 Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=6; Western Blot (rechts): 0,4 µg Protein.

4.1.3. Untersuchungen zum N-Terminus

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die beiden humanen PDE10-Hauptisoformen PDE10A1 und PDE10A2 im Beginn ihrer N-Termini [87]. Bisher wurde in dieser Arbeit der Effekt der Bindung cyclischer Nucleotide an die PDE10 GAF-Domänen auf die katalytische Domäne der CyaB1 unabhängig vom Sequenzunterschied im N-Terminus untersucht. Der Einfluss der 13 AS (PDE10A1) bzw. 23 AS (PDE10A2) am Anfang des N-Terminus der PDE10-Varianten auf die cAMP- bzw. cGMP-Bindung an die GAF-Domänen und die Stimulation der katalytischen Domäne der AC ist nun hier von Interesse.

Zudem wurde durch Dr. Marco Groß-Langenhoff gezeigt, dass eine Verkürzung des 197 AS langen N-Terminus der PDE11 um mehr als 168 AS zu einer deutlichen Zunahme der Affinität der GAF-Domänen für cGMP führt [108]. Dieser Effekt war Anlass für die Entfernung des kompletten 72 AS (PDE10A1) bzw. 82 AS (PDE10A2) langen N-Terminus der PDE10. In Abb. 4-21 sind die Startpunkte der verschiedenen N-terminalen PDE10-Konstrukte mit Hilfe eines Alignments dargestellt. Der Beginn der PDE10 GAF-A wurde aus dem Alignment der GAF-Domänen mit Teilen der N-Termini von PDE2, 5, 6, 10, 11, CyaB1 und CyaB2 in Abb. 4-38 (siehe 4.3.) ermittelt, welches in Anlehnung an ein Alignment von Martinez et al. mit Kenntnissen über die Kristallstruktur der PDE2 GAF-Domänen der Maus erstellt wurde [35].

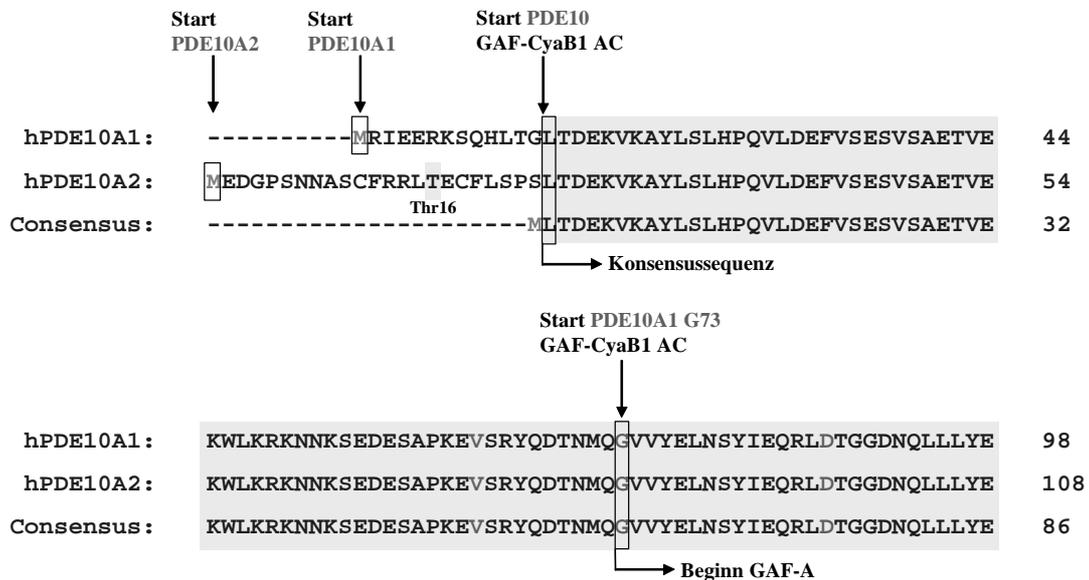


Abb. 4-21 Alignment der N-Termini der humanen PDE10-Hauptisoformen

Der grau unterlegte Bereich stellt die Sequenz dar, ab der PDE10A1 und PDE10A2 in ihrer AS-Sequenz übereinstimmen. Die Startpunkte der verschiedenen N-terminalen Konstrukte sind mit Pfeilen sowie einem Rahmen gekennzeichnet und entsprechend beschriftet. Ebenso ist der Beginn der GAF-A eingezeichnet. Bei der einzelnen, grau unterlegten AS im PDE10A2 N-Terminus handelt es sich um Thr16, der Phosphorylierungsstelle der PDE10A2. h=human (Mensch).

4.1.3.1. PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC

Die Klonierung beider Konstrukte ist unter 3.5.2.5. und 3.5.2.6. beschrieben. Die Expression (24°C), Reinigung und Dialyse erfolgte wie bisher. Das Molekulargewicht der PDE10A1 GAF-CyaB1 AC beträgt 105,2 kDa und das der PDE10A2 GAF-CyaB1 AC-Chimäre 106,2 kDa. Die Domänenstruktur beider Proteine ist in Abschnitt 3.5.5.1. dargestellt. Die Ausbeuten an gereinigtem Protein waren im Vergleich zur PDE10 GAF-CyaB1 AC niedriger. Vor allem bei PDE10A2 GAF-CyaB1 AC waren die verwendbaren Proteinmengen sehr gering, jedoch für die Durchführung der AC-Tests ausreichend. Die SDS-Gele in Abb. 4-22 zeigen die gewünschten Proteinbanden. In Abb. 4-23 sind die Dosis-Wirkungskurven zusammen mit den entsprechenden Western Blots der beiden Proteine dargestellt. PDE10A2 GAF-CyaB1 AC zeigt eine vergleichbare Reinheit mit der PDE10 GAF-CyaB1 AC. PDE10A1 GAF-CyaB1 AC weist dagegen einige dünne Abbruchbanden auf. Tabelle 4-1 liefert eine Übersicht über die Basalaktivitäten, die Stimulationsfaktoren mit cAMP und cGMP sowie die EC<sub>50</sub>-Werte der beiden Chimären im Vergleich mit der PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre.

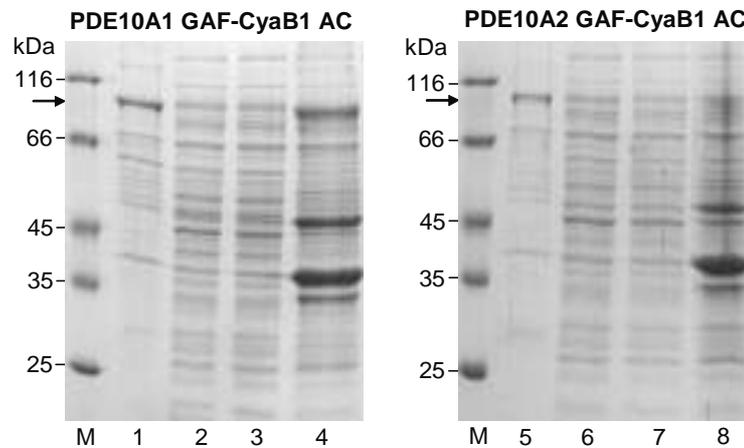


Abb. 4-22 SDS-PAGE-Gele der PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC

SDS-PAGE-Gel: **M**: Marker, **1+5**: Proteineluat [(1): 2 µg, (5): 1,5 µg], **2+6**: Überstand nach Lyse/Zentrifugation (3 µg), **3+7**: Überstand nach Nickelbindung (3 µg), **4+8**: Zellpellet (8 µg)

Konstrukt	Basalaktivität [nmol cAMP/mg·min]	max. Stimulation mit cAMP [-fach]	max. Stimulation mit cGMP [-fach]	EC <sub>50</sub> (cAMP) [µM]
PDE10 GAF-CyaB1 AC (n=4)	51,7 ± 5,3	15,5 ± 1,4	4 ± 0,8	18,1 ± 1
PDE10A1 GAF-CyaB1 AC (n=4)	13,6 ± 1,1	18,3 ± 0,7	4,1 ± 0,4	22,1 ± 3,2
PDE10A2 GAF-CyaB1 AC (n=4)	36 ± 6,5	7,6 ± 0,8	2,5 ± 0,2	15,1 ± 2,3

Tab. 4-1 Übersicht über die Basalaktivitäten, Stimulationsfaktoren und EC<sub>50</sub>-Werte von PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC im Vergleich mit PDE10 GAF-CyaB1 AC

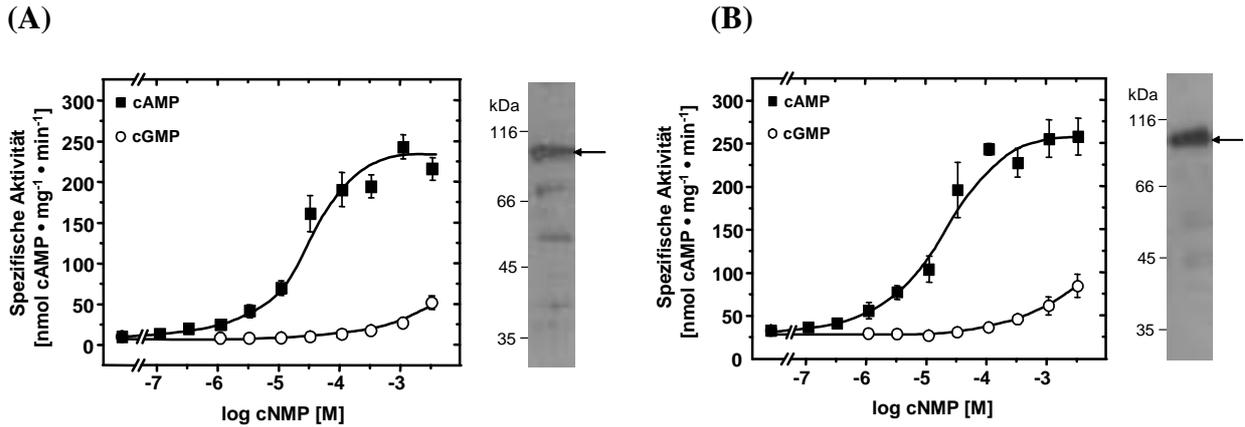


Abb. 4-23 Dosis-Wirkungskurven mit Western Blot der PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC

(A) PDE10A1 GAF-CyaB1 AC, (B) PDE10A2 GAF-CyaB1 AC; Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4; Western Blot: 0,2 µg Protein.

Beide Chimären zeigen im Vergleich zur PDE10 GAF-CyaB1 AC keine Veränderungen in der Affinität für cAMP. Zudem erfolgte bei PDE10A1 GAF-CyaB1 AC die Stimulation der katalytischen Aktivität der CyaB1 durch cAMP und cGMP in gleicher Höhe wie bei der PDE10 GAF-CyaB1 AC. Mit der PDE10A2 GAF-CyaB1 AC wurde dagegen die AC mit cAMP und cGMP um etwa die Hälfte geringer stimuliert als bei der PDE10 GAF-CyaB1 AC. Die Basalaktivitäten beider Konstrukte liegen etwas unter der des Ausgangskonstrukts.

Die kinetischen Parameter sind für beide Chimären zusammengefasst im Vergleich mit der PDE10 GAF-CyaB1 AC in Tab. 4-2 dargestellt. Abb. 4-24 zeigt die entsprechenden Auftragungen nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk sowie den Hill-Plot. Die Eigenschaften der katalytischen Domäne der CyaB1 AC sind unwesentlich verändert. Es liegt bei beiden Konstrukten keine Kooperativität vor. Die  $v_{max}$ -Werte mit 1 mM cAMP liegen bei beiden Chimären etwas unter der  $v_{max}$  von PDE10 GAF-CyaB1 AC.

Konstrukt	$K_m$ (1 mM cAMP) [µM]	$K_m$ (unstimuliert) [µM]	$v_{max}$ (1 mM cAMP) [nmol/mg·min]	$v_{max}$ (unstimuliert) [nmol/mg·min]	Hill-Koeffizient (1 mM cAMP)	Hill-Koeffizient (unstimuliert)
PDE10 GAF-CyaB1 AC (n=4)	22,2 ± 1,2	23,5 ± 1,1	559,0 ± 25,6	25,9 ± 0,8	1,0 ± 0,04	0,9 ± 0,1
PDE10A1 GAF-CyaB1 AC (n=4)	22,6 ± 4,3	22,8 ± 3,1	368,9 ± 33,2	17,5 ± 0,4	0,79 ± 0,13	0,52 ± 0,04
PDE10A2 GAF-CyaB1 AC (n=2)	16 ± 0,6	16,3 ± 3,4	351,0 ± 6,2	42,3 ± 2,6	0,81	0,71 ± 0,1

Tab. 4-2 Übersicht über die kinetischen Parameter der PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC-Chimären im Vergleich mit PDE10 GAF-CyaB1 AC

$K_m$  und  $v_{max}$  wurden nach Lineweaver-Burk und die Hill-Koeffizienten aus dem Hill-Plot bestimmt.

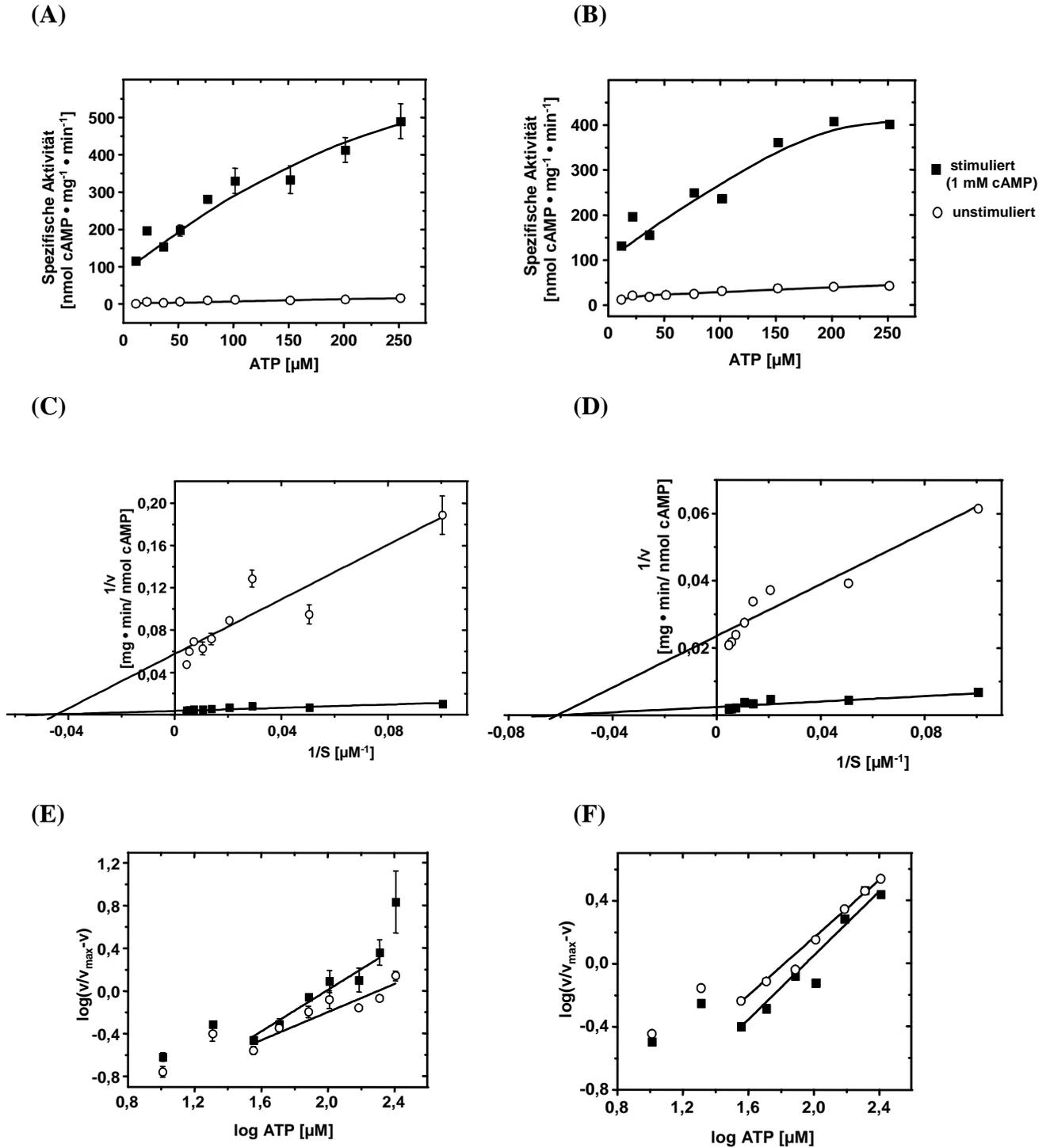


Abb. 4-24 Substratkinetik der PDE10A1 GAF- und PDE10A2 GAF-CyaB1 AC-Chimären

(A) PDE10A1: Michaelis-Menten (n=4), (B) PDE10A2: Michaelis-Menten (n=2), (C) PDE10A1: Lineweaver-Burk (n=4), (D) PDE10A2: Lineweaver-Burk (n=2), (E) PDE10A1: Hill-Plot (n=4), (F) PDE10A2: Hill-Plot (n=2).  
 Testbedingungen: 10 min, 37°C, 10-250 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5.

## 4.1.3.2. PDE10A1 G73 GAF-CyaB1 AC

PDE10A1 G73 GAF-CyaB1 AC beginnt mit der GAF-A (Abb. 4-21). Mit diesem Konstrukt sollte der Einfluss eines fehlenden N-Terminus auf die cNMP-Bindung und Stimulation der AC untersucht werden. Die Klonierung ist unter 3.5.2.8. beschrieben. Die Domänenstruktur des Proteins ist in Abschnitt 3.5.5.1. aufgeführt.

Allerdings stellte sich dieses Konstrukt bezüglich seiner Expression und Reinigung als problematisch heraus. Trotz Optimierung der Expression (24°C, 5 h, 100 µM IPTG) wurden bis auf einen Fall keine verwendbaren Proteinmengen erhalten. Daher konnte auch nur ein AC-Test durchgeführt werden. Die Überprüfung der SDS-Gele zeigte, dass ein sehr hoher Anteil des Proteins im Zellpellet in sog. *inclusion bodies* enthalten war (nicht dargestellt). Dies könnte eine Erklärung für die niedrige Ausbeute an löslichem Protein sein.

In Abb. 4-25 ist die Dosis-Wirkungskurve mit dem Western Blot der Chimäre dargestellt. Der Blot zeigt die gewünschte Proteinbande bei 96,8 kDa. Mit PDE10A1 G73 GAF-CyaB1 AC konnte für cGMP keine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden, da die gemessenen Aktivitäten im Bereich des Leerwertes, d.h. der Proben ohne Protein, lagen.

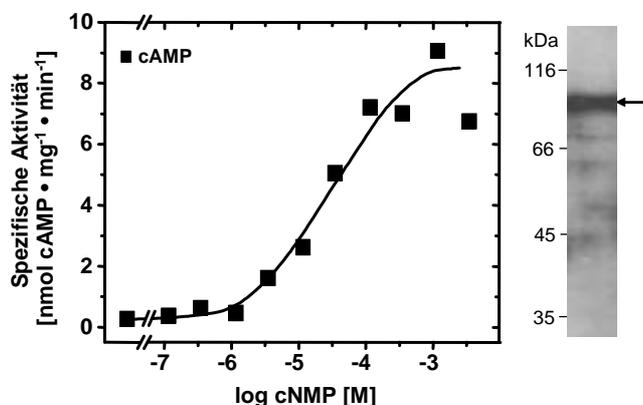


Abb. 4-25 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10A1 G73 GAF-CyaB1 AC

Dosis-Wirkung nur mit cAMP (n=2), Western Blot: 0,15 µg Protein; Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5.

Die maximale Stimulation mit cAMP von  $26,9 \pm 12,6$ -fach zeigte nur einen geringfügigen Anstieg (Faktor 1,7) gegenüber der PDE10 GAF-CyaB1 AC. Der  $EC_{50}$ -Wert von  $19,2 \pm 2,9$  µM blieb konstant. Dagegen sank die Basalaktivität um 99% auf  $0,4 \pm 0,2$  nmol cAMP/mg·min im Vergleich zur PDE10 GAF-CyaB1 AC. Eine Messung der kinetischen Parameter konnte aufgrund der oben beschriebenen Probleme nicht durchgeführt werden.

## 4.2. Untersuchungen der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären

Der Ausgangspunkt für die Konstruktion dieser Chimären war die Frage, ob es möglich ist, zwei GAF-Domänen aus zwei unterschiedlichen PDEn des Menschen, der PDE5A1 und der PDE10A, unter Erhalt ihrer Funktionalität zu kombinieren. Das Interessante dabei ist, dass sich die GAF-Domänen beider PDEn in ihrer Affinität für cAMP bzw. cGMP unterscheiden. So wird cGMP bevorzugt von der PDE5 als allosterischer Ligand gebunden [79] und cAMP von der PDE10, wie aus den Ergebnissen aus Abschnitt 4.1.1. deutlich wird. Zudem sollte der Austausch von N-Terminus und Linker Aufschluss über deren Rolle beim Signalisieren geben. Als Beginn des PDE10 N-Terminus wurde der der PDE10 GAF-CyaB1 AC gewählt (Abb. 4-21). Die Startpunkte der einzelnen Domänen und der Linker von PDE5 und PDE10 stimmen mit denen in Abb. 4-1 und Abb. 4-36 überein. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden insgesamt zehn verschiedene Konstrukte kloniert. Als Reporterenzym wurde wieder die katalytische Domäne der CyaB1 AC verwendet. Zur Übersichtlichkeit werden diese Konstrukte nachfolgend in drei Gruppen unterteilt:

**Gruppe I:** Diese fünf Konstrukte enthalten jeweils die PDE5 GAF-A und die PDE10 GAF-B in Kombination mit den N-Termini und den Linkern aus beiden PDEn. Zusätzlich wurde bei einem Konstrukt in der PDE10 GAF-B das Asp-397 zu Ala mutiert. In den Abb. 4-26 und Abb. 4-27 sind alle fünf Konstrukte schematisch dargestellt.

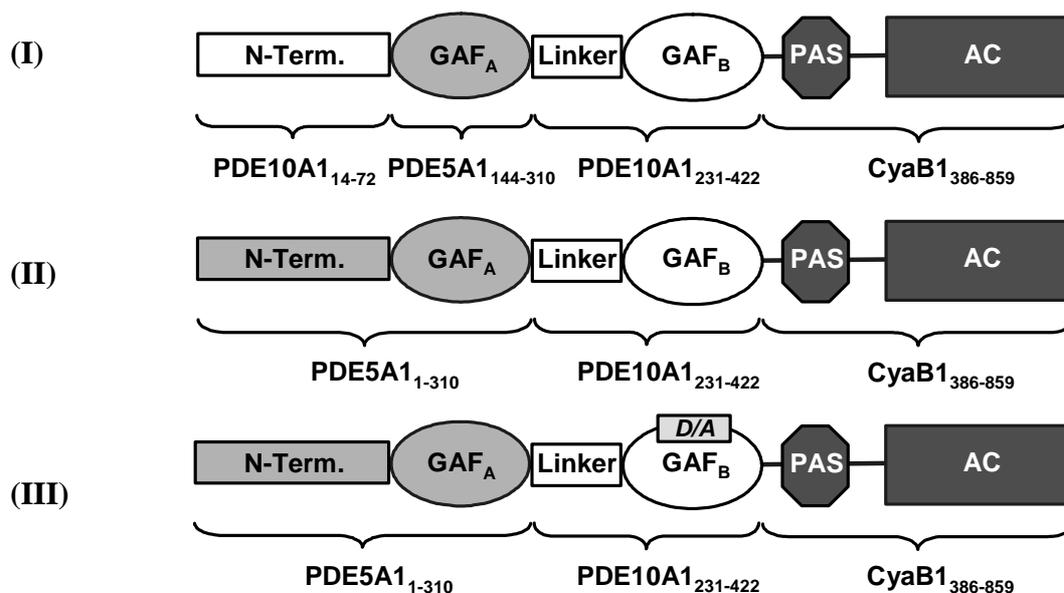


Abb. 4-26 Schematische Darstellung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I

(I) PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC, (II) PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC, (III) PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker D397A GAF-B-CyaB1 AC

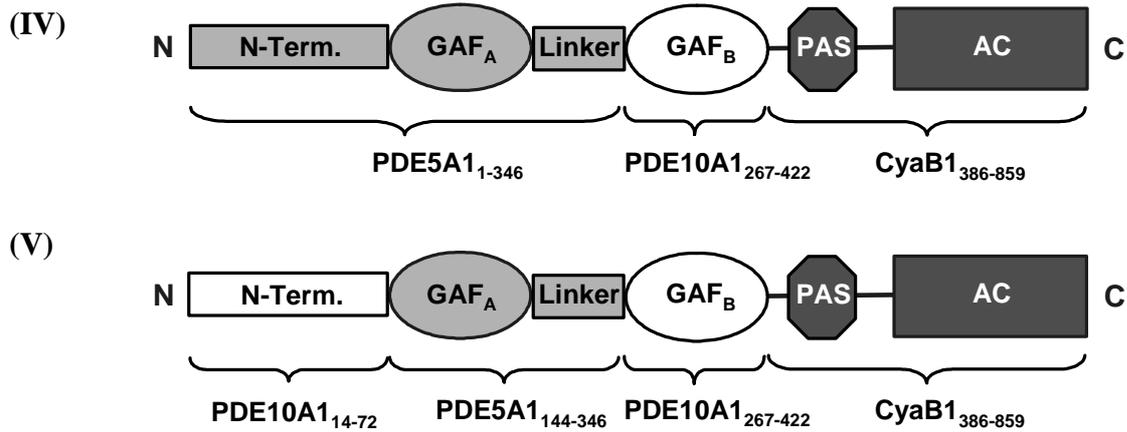


Abb. 4-27 Schematische Darstellung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I

(IV) PDE5 N-Term. GAF-A Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC, (V) PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC

Gruppe II: Diese Gruppe umfasst diejenigen Chimären, die die GAF-A der PDE10 und die GAF-B der PDE5 in Kombination mit deren N-Termini und Linker besitzen. Diese drei Konstrukte sind in Abb. 4-28 schematisch dargestellt.

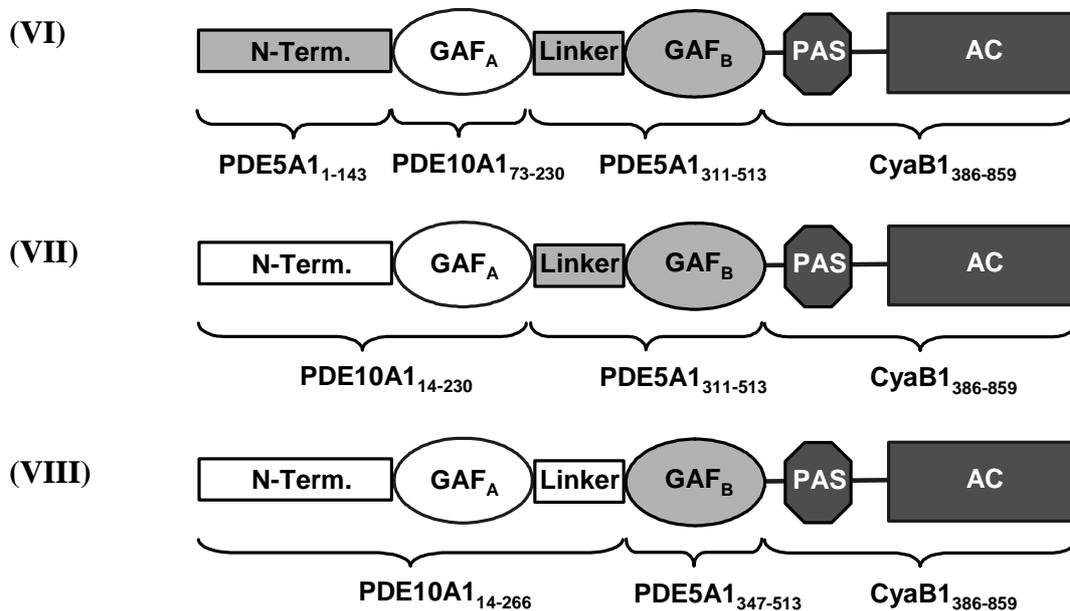


Abb. 4-28 Schematische Darstellung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II

(VI) PDE5 N-Term.-PDE10 GAF-A-PDE5 Linker GAF-B-CyaB1 AC, (VII) PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker GAF-B-CyaB1 AC, (VIII) PDE10 N-Term. GAF-A Linker-PDE5 GAF-B-CyaB1 AC

Gruppe III: Zur letzten Gruppe gehören zwei Konstrukte, in denen nur der Linker gegen den der anderen PDE ausgetauscht wurde. Den schematischen Aufbau beider Chimären zeigt Abb. 4-29.

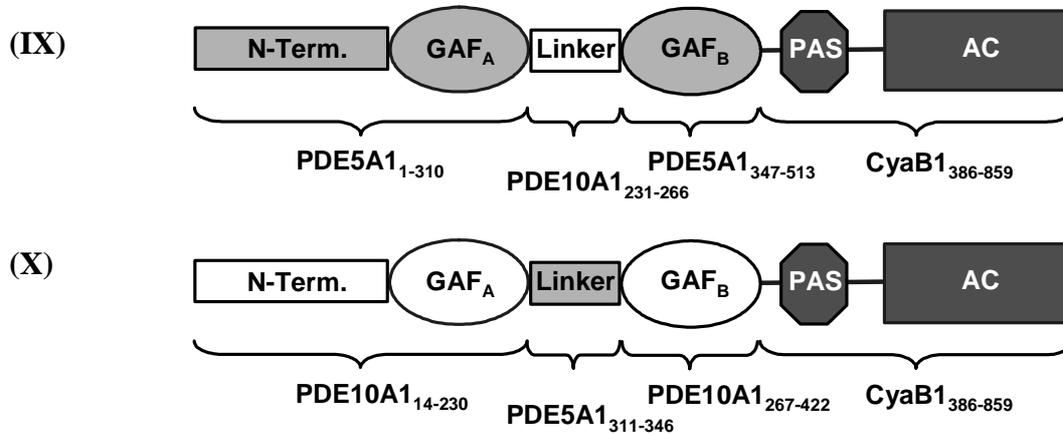


Abb. 4-29 Schematische Darstellung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III

(IX) PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker-PDE5 GAF-B-CyaB1 AC, (X) PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC

Die Klonierung der Konstrukte ist in Abschnitt 3.5.3. angegeben. Die Expression aller zehn Konstrukte erfolgte bei 24°C für 5-7 h nach Induktion mit 400 µM IPTG. Die Reinigung und Dialyse (Dialysepuffer A) wurde wie unter 3.2.4.1. und 3.2.5. beschrieben, durchgeführt. Dem Zellysepuffer wurde Protease-Inhibitor zugesetzt, um die Bildung von Abbauprodukten zu verhindern. Die Western Blots der exprimierten und gereinigten Proteine werden bei den jeweiligen Dosis-Wirkungskurven angegeben.

4.2.1. Biochemische Charakterisierung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I

4.2.1.1. Proteinabhängigkeit

Für die PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC-Chimäre (Abb. 4-26II) wurde zur Kontrolle die Proteinabhängigkeit bestimmt. Abb. 4-30 zeigt den gleichen Kurvenverlauf wie bei PDE10 GAF-CyaB1 AC. Daher wurde auch hier bei allen zehn Chimären mit Proteinmengen von 50-100 ng getestet, d.h. im vorderen Bereich der Kurve.

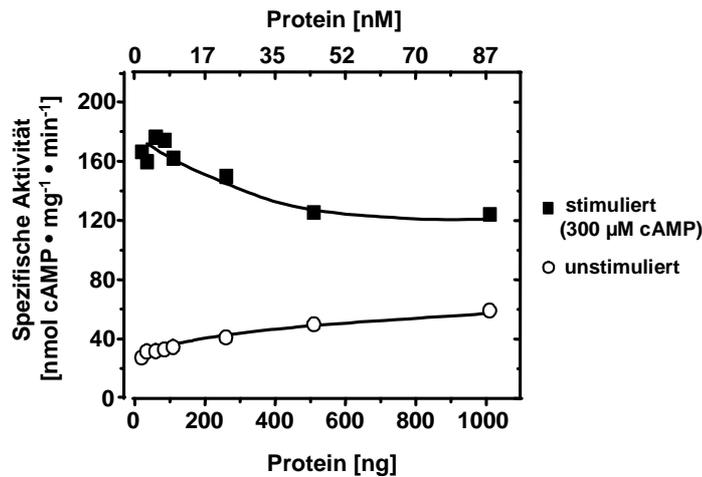


Abb. 4-30 Proteinabhängigkeit der PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC

Die Testbedingungen waren: 10-1000 ng Protein, 10 min, 37°C, 75  $\mu\text{M}$  ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4; Fehlerbalken nicht angegeben.

4.2.1.2. Dosis-Wirkung

Die Dosis-Wirkungskurven mit den dazugehörigen Western Blots der fünf Chimären der Gruppe I zeigen Abb. 4-31 und Abb. 4-32. Alle Konstrukte außer der PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (Abb. 4-26II) zeigen im Western Blot unterhalb der gewünschten Proteinbande trotz Protease-Inhibitor noch weitere Banden. Bei diesen handelt es sich daher wahrscheinlich um C-terminale Abbruchprodukte, die keine Aktivität besitzen dürften, da ihnen ein Teil der katalytischen Domäne der AC fehlt. Diese sind jedoch detektierbar, weil der His<sub>6</sub>-Tag N-terminal lokalisiert ist.

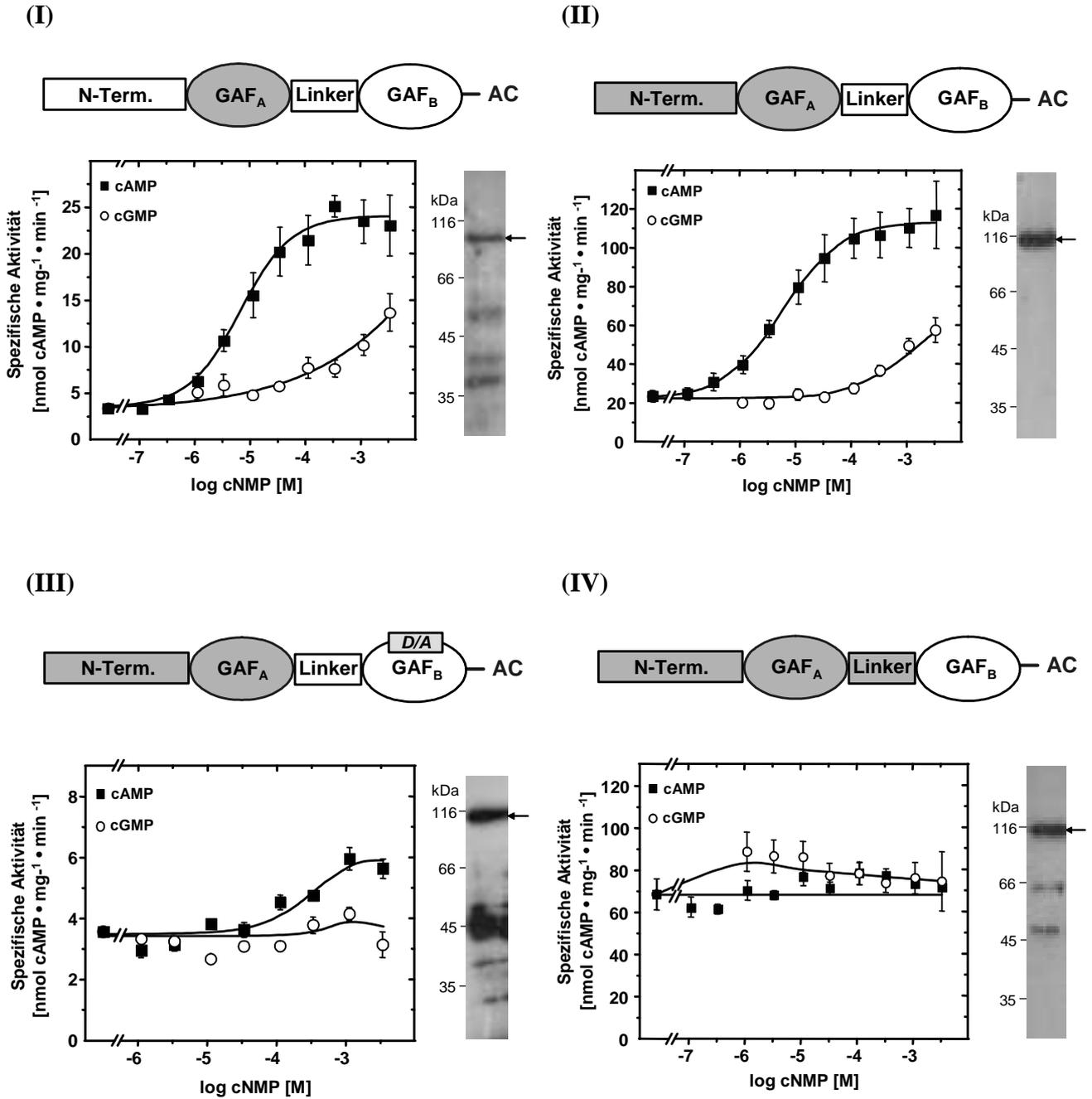


Abb. 4-31 Dosis-Wirkungskurven mit Western Blot der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I

**(I)** PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=6), Western Blot: 0,05 µg Protein (105,2 kDa), **(II)** PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=6), Western Blot: 0,5 µg Protein (114,7 kDa), **(III)** PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker D397A GAF-B-CyaB1 AC (n=4), Western Blot: 1 µg Protein (114,7 kDa), **(IV)** PDE5 N-Term. GAF-A Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC (n=4), Western Blot: 0,2 µg Protein (114,8 kDa). Über den Dosis-Wirkungskurven sind die Domänenanordnungen der Konstrukte schematisch dargestellt. Die Abkürzung AC steht für die PAS- und die katalytische Domäne der CyaB1. Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5.

(V)

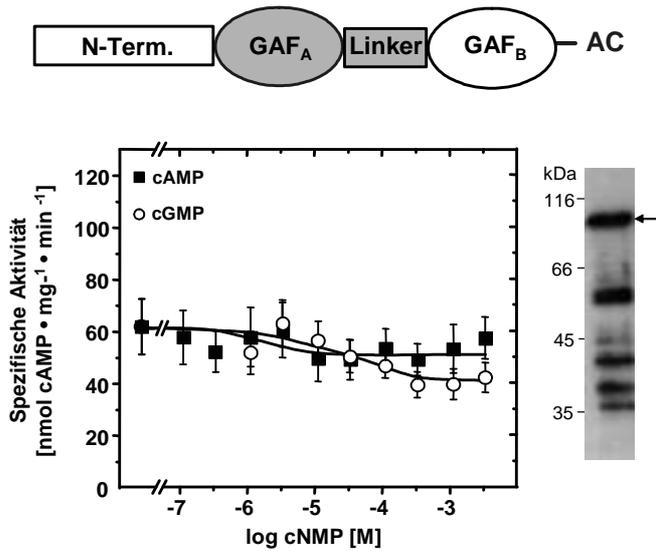


Abb. 4-32 Dosis-Wirkungskurve mit Western Blot einer PDE5-PDE10-CyaB1-Chimäre der Gruppe I

(V) PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC (n=6), Western Blot: 0,2 µg Protein (105,3 kDa). Über der Dosis-Wirkungskurve ist die Domänenanordnung des Konstrukts schematisch dargestellt. Die Abkürzung AC steht für die PAS- und die katalytische Domäne der CyaB1. Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5.

Die Tab. 4-3 liefert eine Übersicht über die Basalaktivitäten, Stimulationsfaktoren und EC<sub>50</sub>-Werte der fünf Konstrukte im Vergleich mit der PDE10 GAF-CyaB1 AC (siehe 4.1.1.3.) sowie der PDE5 GAF-CyaB1 AC (siehe 4.2.4.).

Die Konstrukte PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (Abb. 4-31I) und PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (Abb. 4-31II) unterscheiden sich nur in ihrem N-Terminus. Beide wurden mit cAMP stärker stimuliert als mit cGMP, aber dennoch vergleichsweise geringer als die PDE10 GAF-CyaB1 AC. Trotz des Ersetzens der PDE10 GAF-A sowie des N-Terminus blieb eine Stimulation erhalten. Die EC<sub>50</sub>-Werte beider Konstrukte für cAMP sind um das 2,5-fache geringer im Vergleich zur PDE10 GAF-CyaB1 AC. Das zeigt, dass ihre Affinität für cAMP deutlich gestiegen ist. Ein Ersetzen der PDE10 GAF-A durch die der PDE5 führte zu einer um einen Faktor von 14 verringerten Basalaktivität im Vergleich zur PDE10 GAF-CyaB1 AC. Durch den zusätzlichen Austausch des PDE10 N-Terminus sank die Basalaktivität nur um das Zweifache (Tab. 4-3).

Auch die D397A-Mutante (Abb. 4-31III) besitzt eine um etwa das 7-fache geringere Basalaktivität als das nicht-mutierte Konstrukt. Die Affinität für cAMP ist durch die Mutation deutlich gesunken (Faktor: 20,6), was sich auch in einer verringerten Stimulation der katalytischen Aktivität der AC mit cAMP widerspiegelt.

## Ergebnisse

Die beiden letzten Konstrukte dieser Gruppe mit dem PDE5-Linker weisen die höchste Basalaktivität im Vergleich zur PDE10- und PDE5 GAF-CyaB1 AC sowie zu den anderen drei Konstrukten ihrer Gruppe auf. Eine Stimulation durch cAMP bzw. cGMP erfolgte nicht. Der Austausch der GAF-B der PDE5 gegen die PDE10 GAF-B verursachte im Vergleich mit der PDE5 GAF-CyaB1 AC einen kompletten Verlust der Stimulation (Abb. 4-31IV). PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC scheint sogar einen leichten Hemmeffekt erfahren zu haben (Abb. 4-32V).

Am Interessantesten ist der Vergleich von Abb. 4-31II mit Abb. 4-31IV. Beide Konstrukte unterscheiden sich nur in ihrem Linker. Ersetzte man den PDE10 Linker durch den der PDE5, womit sich vor der PDE10 GAF-B ein fremder Linker befindet, erfolgte keine Stimulation mehr mit cAMP und cGMP. Dafür stieg die Basalaktivität um Faktor 3 an.

Bei keiner der fünf Chimären konnte eine erhöhte cGMP-Affinität sowie eine erhöhte Stimulation mit cGMP gezeigt werden.

Konstrukt	Basalaktivität [nmol cAMP/mg·min]	max. Stimulation mit cAMP [-fach]	max. Stimulation mit cGMP [-fach]	EC <sub>50</sub> [µM]
PDE10 GAF-CyaB1 AC (n=4)	51,7 ± 5,3	15,5 ± 1,4	4 ± 0,8	18,1 ± 1 (cAMP)
PDE5 GAF-CyaB1 AC (n=4)	12,6 ± 1,0	1,2 ± 0,1	24,4 ± 3	2,4 ± 0,1 (cGMP)
(I) PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A- PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=6)	3,6 ± 0,4	7,3 ± 0,6	3,8 ± 0,3	7,2 ± 0,3 (cAMP)
(II) PDE5 N-Term. GAF-A- PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=6)	24,7 ± 2,9	4,9 ± 0,5	2,5 ± 0,2	7,0 ± 1,7 (cAMP)
(III) PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker D397A GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	3,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	144 ± 66,4 (cAMP)
(IV) PDE5 N-Term. GAF-A Linker- PDE10 GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	69,3 ± 7,4	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	nicht bestimmt
(V) PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC (n=6)	62,8 ± 10,7	-	-	-

*Tab. 4-3 Übersicht über die Basalaktivitäten, Stimulationsfaktoren und EC<sub>50</sub>-Werte der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I im Vergleich mit PDE10 GAF- und PDE5 GAF-CyaB1 AC*

## Ergebnisse

Um auszuschließen, dass die gemessenen Veränderungen auf veränderte enzymatische Eigenschaften der AC basieren, wurden die kinetischen Parameter der stimulierbaren Konstrukte (nach Lineweaver-Burk) bestimmt. Diese werden in Tab. 4-4 zusammenfassend dargestellt. Die  $K_m$ -Werte liegen im erwarteten Bereich. Sie stimmen mit den Werten der PDE10 GAF- und PDE5 GAF-CyaB1 AC überein. Zudem liegt keine Kooperativität vor.

Konstrukt	$K_m$ (1 mM cAMP) [ $\mu$ M]	$K_m$ (unstimuliert) [ $\mu$ M]	$v_{max}$ (1 mM cAMP) [nmol/mg·min]	$v_{max}$ (unstimuliert) [nmol/mg·min]	Hill-Koeffizient (1 mM cAMP)	Hill-Koeffizient (unstimuliert)
(I) PDE10 N-Term.-PDE5 GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	19,9 ± 1,4	23,5 ± 3,6	36,5 ± 2,7	5,9 ± 0,5	0,79 ± 0,08	0,58 ± 0,03
(II) PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	21,9 ± 2,6	19,6 ± 5,4	136,1 ± 8,0	24,0 ± 2,6	0,85 ± 0,12	0,66 ± 0,13
(III) PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker D397A GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	22,8 ± 5,2	16,9 ± 1,3	6,9 ± 0,9	3,7 ± 0,4	0,58 ± 0,05	0,68 ± 0,06

Tab. 4-4 Übersicht über die kinetischen Parameter der stimulierbaren PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe I

### 4.2.1.3. Additive Dosis-Wirkungskurve

PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (Abb. 4-26II) zeigte eine Stimulation mit cAMP und etwas geringer mit cGMP (siehe 4.2.1.2.). Daher war es interessant, welchen Einfluss gleiche Konzentrationen an cAMP und cGMP bei gleichzeitiger Zugabe zum Reaktionsansatz auf das Enzym haben oder, ob sogar eine höhere Gesamtstimulation der katalytischen Domäne der AC erreicht werden kann. Zudem wurde in einem zweiten Versuch die cAMP-Konzentration von 300  $\mu$ M konstant gehalten und nur die cGMP-Konzentration im Reaktionsansatz erhöht, um zu sehen, ob trotz Bindung von cAMP die Stimulation mit zunehmender cGMP-Konzentration ansteigt. Abb. 4-33 zeigt die Dosis-Wirkungskurven beider Versuche.

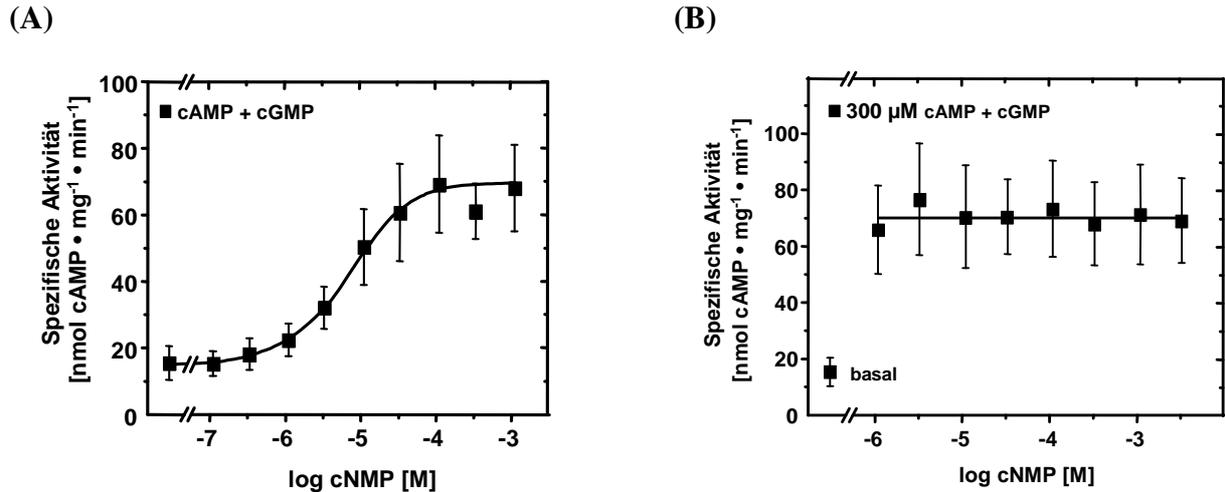


Abb. 4-33 Additive Dosis-Wirkungskurven der PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC

(A) Gleichzeitige Zugabe von gleichen Mengen an cAMP und cGMP, (B) aufsteigende cGMP-Konzentration mit 300  $\mu\text{M}$  cAMP. Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75  $\mu\text{M}$  ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4.

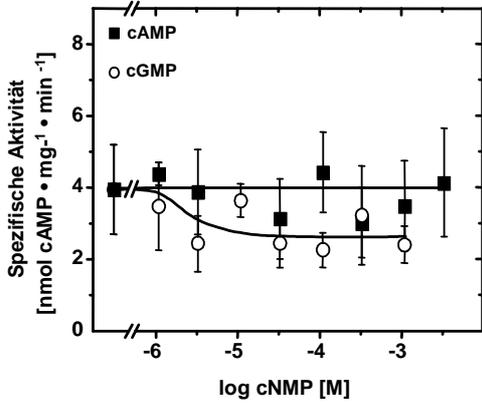
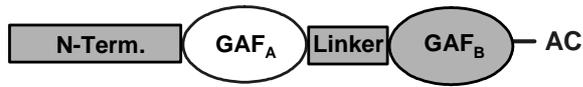
Die Basalaktivität beim Versuch in Abb. 4-33A beträgt  $16,4 \pm 5,1$  nmol/mg·min. Diese liegt damit geringfügig (Faktor 1,5) unter der Basalaktivität des Enzyms in Abb. 4-31II. Die maximale Stimulation von  $4,8 \pm 0,6$ -fach mit beiden cyclischen Nucleotiden ist unverändert zu der, welche mit cAMP allein beobachtet wurde. Eine erhöhte Gesamtstimulation des Enzyms durch einen zusätzlichen Einfluss von cGMP wurde damit nicht erreicht.

Abb. 4-33B zeigt, dass bereits mit 300  $\mu\text{M}$  cAMP und 1  $\mu\text{M}$  cGMP die maximale spezifische Aktivität des Enzyms erreicht und durch eine ansteigende cGMP-Konzentration nicht mehr verändert wurde. Dies spiegelt die hohe cAMP-Affinität ( $EC_{50}$ :  $7,0 \pm 1,7$   $\mu\text{M}$ ) des Konstrukts wider. Auch bei diesem Versuch hatte cGMP keinen Einfluss auf die maximale Stimulation in Gegenwart von cAMP.

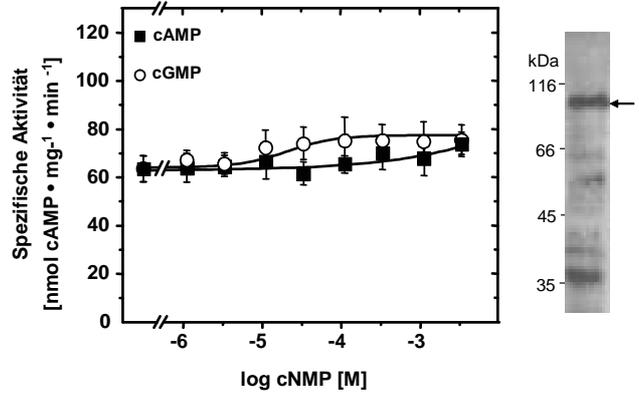
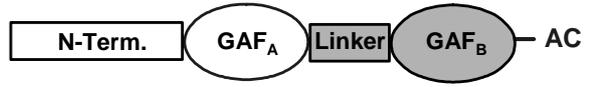
#### 4.2.2. Biochemische Charakterisierung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II

In Abb. 4-34 sind die Dosis-Wirkungskurven der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II zusammen mit den entsprechenden Western Blots dargestellt. Die PDE5 N-Term.-PDE10 GAF-A-PDE5 Linker GAF-B-CyaB1 AC (Abb. 4-34VI) zeigt neben der gewünschten Proteinbande deutlich zwei weitere Abbruchbanden. Dieses Konstrukt hat sich sehr schlecht exprimieren lassen und für den Western Blot waren sogar 2  $\mu\text{g}$  Protein notwendig, um eine Proteinbande zu erkennen. Die Western Blots der anderen beiden Konstrukte besitzen wenige Abbruchbanden. Die gewünschten Proteinbanden sind hier deutlicher zu erkennen.

(VI)



(VII)



(VIII)

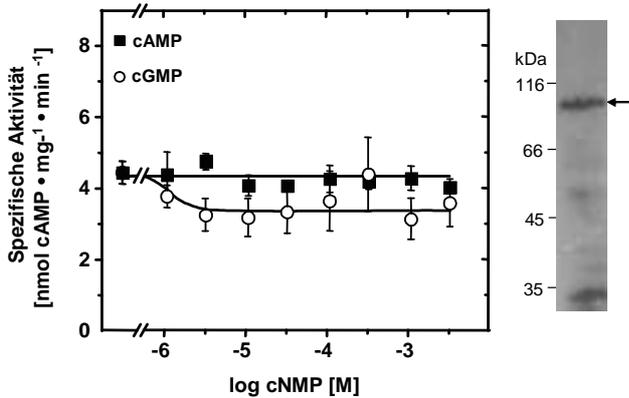


Abb. 4-34 Dosis-Wirkungskurven mit Western Blot der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II

(VI) PDE5 N-Term.-PDE10 GAF-A-PDE5 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=4), Western Blot: 2 µg Protein (114,9 kDa), (VII) PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=4), Western Blot: 0,1 µg Protein (105,3 kDa), (VIII) PDE10 N-Term. GAF-A Linker-PDE5 GAF-B-CyaB1 AC (n=4), Western Blot: 0,5 µg Protein (105,3 kDa). Über den Dosis-Wirkungskurven sind die Domänenanordnungen der Konstrukte schematisch dargestellt. Die Abkürzung AC steht für die PAS- und die katalytische Domäne der CyaB1. Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5.

Tab. 4-5 fasst die Ergebnisse bezüglich der Basalaktivitäten und Stimulationsfaktoren aller drei Konstrukte zusammen. Zum Vergleich sind die entsprechenden Werte der PDE10 GAF-CyaB1 AC (siehe 4.1.1.3.) und der PDE5 GAF-CyaB1 AC (siehe 4.2.4.) mit angegeben.

## Ergebnisse

Konstrukt	Basalaktivität	max. Stimulation mit cAMP	max. Stimulation mit cGMP	EC <sub>50</sub>
	[nmol cAMP/mg·min]	[-fach]	[-fach]	[μM]
PDE10 GAF-CyaB1 AC (n=4)	51,7 ± 5,3	15,5 ± 1,4	4 ± 0,8	18,1 ± 1 (cAMP)
PDE5 GAF-CyaB1 AC (n=4)	12,6 ± 1,0	1,2 ± 0,1	24,4 ± 3	2,4 ± 0,1 (cGMP)
(VI) PDE5 N-Term.-PDE10 GAF-A- PDE5 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	4,0 ± 1,3	-	-	-
(VII) PDE10 N-Term. GAF-A- PDE5 Linker GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	65,0 ± 5,4	1,2 ± 0,04	1,2 ± 0,03	-
(VIII) PDE10 N-Term. GAF-A Linker-PDE5 GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	4,5 ± 0,3	-	-	-

*Tab. 4-5 Übersicht über die Basalaktivitäten und Stimulationsfaktoren der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe II im Vergleich mit PDE10 GAF- und PDE5 GAF-CyaB1 AC*

Das Ersetzen der PDE5 GAF-A durch die PDE10 GAF-A verhinderte eine Stimulation der katalytischen Aktivität der AC durch cGMP bzw. cAMP. Zudem sank die Basalaktivität um Faktor 3 im Vergleich zur nicht-mutierten PDE5 GAF-CyaB1 AC (Abb. 4-34VI). Tauschte man dagegen zusätzlich noch den PDE5 N-Terminus aus, so stieg die Basalaktivität um das 5-fache in die Nähe des Basalwertes der PDE10 GAF-CyaB1 AC. Eine Stimulation mit cGMP und cAMP erfolgte nicht (Abb. 4-34VII). Wurden N-Terminus, GAF-A und Linker der PDE5 durch die der PDE10 ersetzt, verhielt sich die Chimäre genauso wie diejenige, bei der nur die GAF-A ausgetauscht wurde (Abb. 4-34VIII). Andersherum betrachtet bewirkte ein Ersetzen der PDE10 GAF-B durch die PDE5 GAF-B ein Absinken der Basalaktivität um das 11,5-fache. Zudem war keine Stimulation mit cAMP und cGMP möglich (Abb. 4-34VIII). Der zusätzliche PDE5 Linker erhöhte dagegen die Basalaktivität wieder (Abb. 4-34VII), was durch den PDE5 N-Terminus aufgehoben wurde. Von beiden Enzymen aus betrachtet, der PDE5- bzw. der PDE10 GAF-CyaB1 AC, ergibt sich ein interessantes Bild.

4.2.3. Biochemische Charakterisierung der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III

Die Dosis-Wirkungskurven der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III zusammen mit ihren Western Blots zeigt Abb. 4-35. Auch hier sind im Western Blot neben der gewünschten Proteinbande wenige Abbruchprodukte erkennbar.

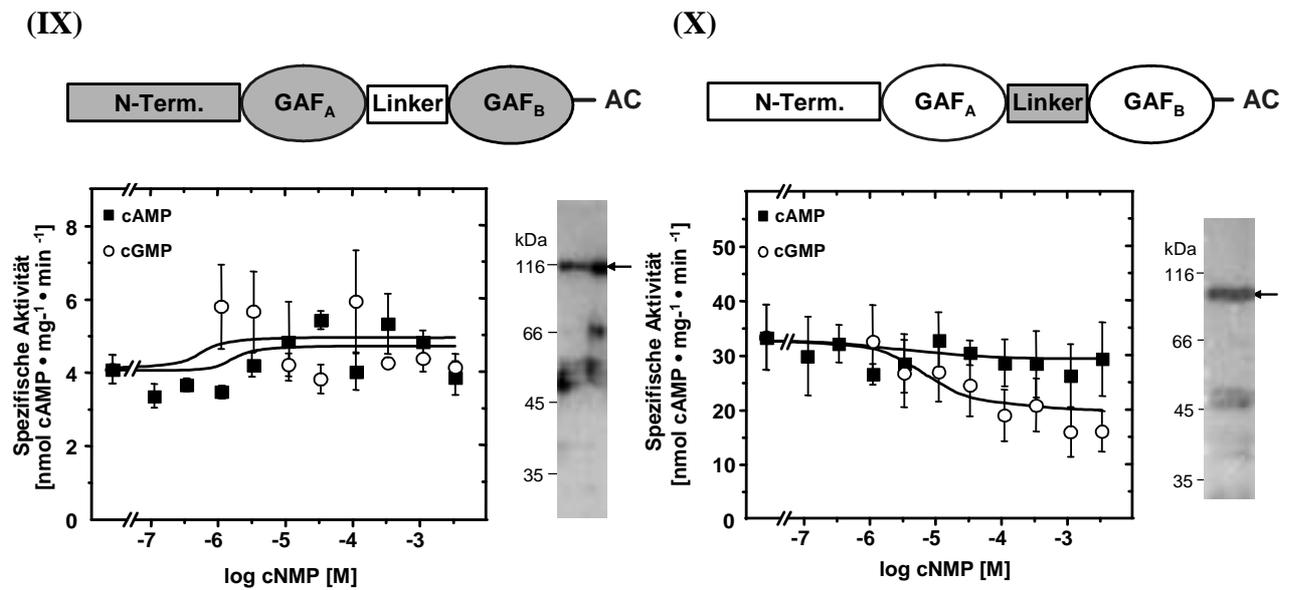


Abb. 4-35 Dosis-Wirkungskurven mit Western Blot der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III

(IX) PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker-PDE5 GAF-B-CyaB1 AC (n=4), Western Blot: 0,4 µg Protein (116,2 kDa), (X) PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC (n=4), Western Blot: 0,5 µg Protein (103,9 kDa). Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75 µM ATP, Tris/HCl pH 7,5.

Die Basalaktivitäten und Stimulationen beider Konstrukte werden in Gegenüberstellung mit den Werten der PDE10 GAF- und PDE5 GAF-CyaB1 AC in Tab. 4-6 angegeben.

Konstrukt	Basalaktivität [nmol cAMP/mg·min]	max. Stimulation mit cAMP [-fach]	max. Stimulation mit cGMP [-fach]	EC <sub>50</sub> [µM]
PDE10 GAF-CyaB1 AC (n=4)	51,7 ± 5,3	15,5 ± 1,4	4 ± 0,8	18,1 ± 1 (cAMP)
PDE5 GAF-CyaB1 AC (n=4)	12,6 ± 1,0	1,2 ± 0,1	24,4 ± 3	2,4 ± 0,1 (cGMP)
(IX) PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker-PDE5 GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	4,2 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,5	-
(X) PDE10 N-Term. GAF-A-PDE5 Linker-PDE10 GAF-B-CyaB1 AC (n=4)	33,7 ± 6,0	-	-	-

Tab. 4-6 Übersicht über die Basalaktivitäten und Stimulationen der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären der Gruppe III im Vergleich mit PDE10 GAF- und PDE5 GAF-CyaB1 AC

Ein Ersetzen des PDE5 Linkers durch den der PDE10 bewirkte ein Absinken der Basalaktivität des PDE5-Konstrukts um Faktor 3. Zudem wurde die Stimulation der katalytischen Aktivität der AC mit cGMP fast vollständig unterbunden (Abb. 4-35IX). Dagegen sank die Basalaktivität des PDE10-Konstrukts beim Ersetzen des Linkers durch den der PDE5 nur um das 1,5-fache. Eine Stimulation mit cAMP oder cGMP war nicht mehr möglich. Mit cGMP zeigte sich sogar ein leichter Hemmeffekt (Abb.4-35X).

#### 4.2.4. Biochemische Charakterisierung der PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die PDE5 GAF-CyaB1 AC wurde bereits von Dr. Sandra Bruder charakterisiert, jedoch unter Bedingungen, die von denen in dieser Arbeit abweichen [107]. Um einen Vergleich der Ergebnisse der PDE5-PDE10-CyaB1-Chimären mit der PDE5 GAF-CyaB1 AC zu ermöglichen, wurden die Dosis-Wirkung sowie die kinetischen Parameter der Chimäre unter den hier verwendeten Reinigungs- und Testbedingungen bestimmt. Dazu wurde das Konstrukt PDE5 GAF-CyaB1 AC in pQE30 von Dr. Sandra Bruder verwendet (siehe 3.5.1., [107]). Dieses besteht aus dem N-Terminus und den beiden GAF-Domänen der humanen PDE5A1, denen die PAS- und katalytische Domäne der CyaB1 angehängt wurde (Abb. 4-36).

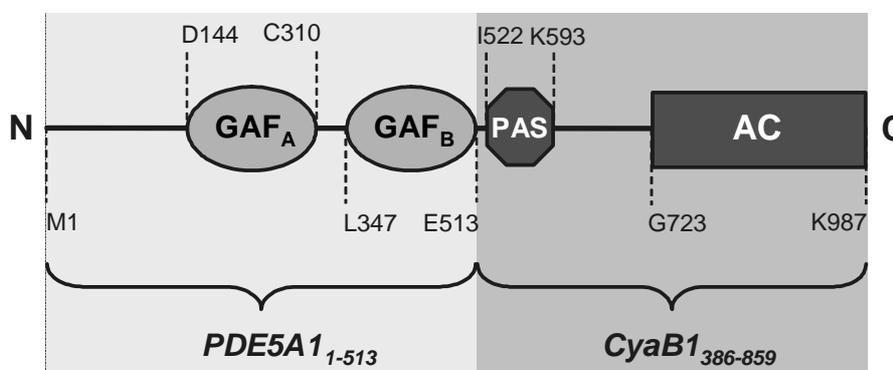


Abb. 4-36 Domänenstruktur der PDE5 GAF-CyaB1 AC

Die nummerierten ASn über den vertikalen gestrichelten Linien geben den Beginn und das Ende der einzelnen Domänen im exprimierten Protein an. Das erste Methionin am Proteinfang wird mit M1 bezeichnet. Die Positionen der verwendeten Sequenzabschnitte in den jeweiligen Ausgangssequenzen (PDE5A1 bzw. CyaB1) sind unter den geschweiften Klammern angegeben.

Die Expression des Proteins erfolgte bei 24°C für 6-7 h nach Induktion mit 400 µM IPTG. Zellyse (mit Protease-Inhibitor), Reinigung und Dialyse wurden wie bisher durchgeführt.

In Abb. 4-37A ist die Dosis-Wirkungskurve mit dem entsprechenden Western Blot des gereinigten Proteins dargestellt. Die Proteinausbeute und die Reinheit des Proteins sind

vergleichbar mit denen der PDE10 GAF-CyaB1 AC. Im Western Blot sind keine Abbruchprodukte zu sehen. Das Cross-Linking ergab im Western Blot eine deutliche Dimerbande (227 kDa), sowohl mit als auch ohne 1 mM cGMP. Die darüber liegende Bande könnte auf ein Tetramer hindeuten (Abb. 4-37B).

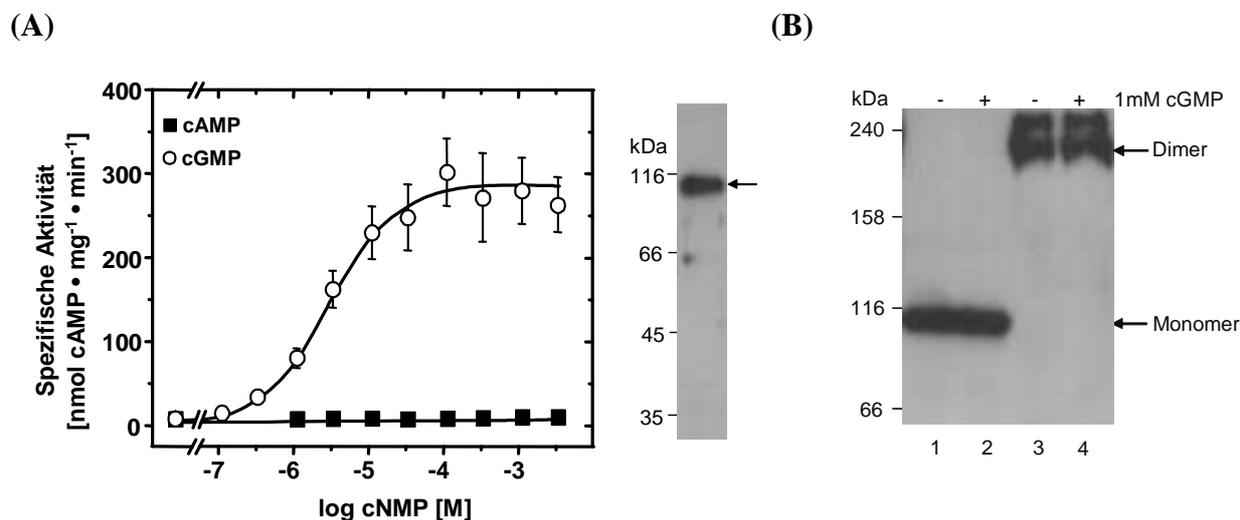


Abb. 4-37 Dosis-Wirkungskurve mit Western Blot und Cross-Linking der PDE5 GAF-CyaB1 AC

(A) Dosis-Wirkungskurve der PDE5 GAF-CyaB1 AC. Testbedingungen: 50 ng Protein, 10 min, 37°C, 75 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5, n=4. Western Blot: 0,1 μg Protein (113,5 kDa). (B) Cross-Linking mit PDE5 GAF-CyaB1 AC: 0,2 μg Protein ± 1 mM cGMP, 7 mM Glutaraldehyd, 30 min, RT. (1) Protein ohne Glutaraldehyd und ohne 1 mM cGMP (Kontrolle), (2) Protein ohne Glutaraldehyd und mit 1 mM cGMP (Kontrolle), (3) Protein mit Glutaraldehyd und ohne 1 mM cGMP, (4) Protein mit Glutaraldehyd und mit 1 mM cGMP.

Die Chimäre besitzt eine Basalaktivität von  $12,6 \pm 1$  nmol cAMP/mg·min. cAMP stimulierte die katalytische Aktivität der CyaB1 AC nicht (Faktor:  $1,2 \pm 0,1$  mit 3 mM cAMP). Dagegen zeigte das Konstrukt mit 100 μM cGMP eine maximale Stimulation mit einem Faktor von  $24,4 \pm 3$ . Der EC<sub>50</sub>-Wert beträgt  $2,4 \pm 0,05$  μM cGMP. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen von Dr. Sandra Bruder, so ergibt sich doch ein gewisser Einfluss der Reinigung auf die Ergebnisse. Mit Ni<sup>2+</sup>-NTA gereinigtes Protein zeigte eine 10,2-fache Stimulation mit cGMP mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von  $9,6 \pm 1,8$  μM [79].

Die kinetischen Parameter wurden aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (n=4) ermittelt. Die K<sub>m</sub>-Werte betragen  $21,2 \pm 1,4$  μM (mit 1 mM cGMP) und  $11 \pm 1,2$  μM (unstimuliert) und liegen damit im erwarteten Bereich. V<sub>max</sub> lag mit 1 mM cGMP bei  $353,3 \pm 36,6$  nmol cAMP/mg·min sowie unstimuliert bei  $11,5 \pm 1,2$  nmol cAMP/mg·min. Die aus dem Hill-Plot (n=4) bestimmten Hill-Koeffizienten von  $0,53 \pm 0,03$  (1 mM cGMP) bzw.  $0,58 \pm 0,05$  (unstimuliert) zeigen keine Kooperativität an. Auf eine graphische Darstellung der ermittelten Werte wird an dieser Stelle verzichtet, da die Werte nur Vergleichszwecken dienen.



Ende der Kristallisationskonstrukte:

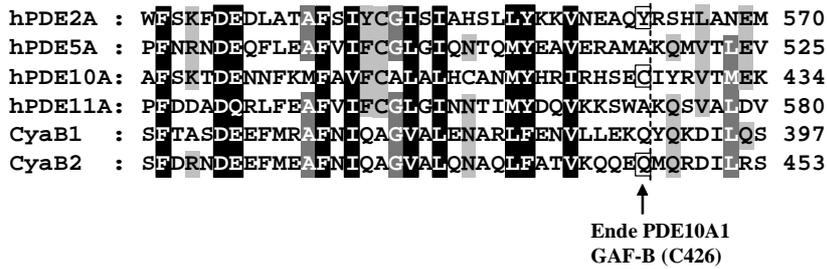


Abb. 4-39 2. Ausschnitt aus einem modifizierten Clustal W-Alignment

Ausschnitt aus einem von Hand modifizierten Clustal W-Alignment der AS-Sequenzen von PDE2A, PDE5A1, PDE10A1, PDE11A4 (h=human) zusammen mit CyaB1 und CyaB2 aus *Anabaena*. Gezeigt ist der Endbereich der verschiedenen GAF-B-Domänen. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Ende der GAF-B-Domänen. Mit einem Rahmen sind die jeweiligen ASn gekennzeichnet, mit denen die Kristallisationskonstrukte von PDE2A, PDE10A und CyaB2 enden. Die sich ähnelnden Bereiche sind hellgrau bis schwarz unterlegt. Je dunkler, umso größer ist die Sequenzähnlichkeit.

4.3.1. Kristallisationskonstrukt PDE10A1 D87 GAF-A/B

Das erste Kristallisationskonstrukt wurde ohne die  $\alpha$ 1-Helix der GAF-A ab D87 (PDE10A1 87-426) kloniert (siehe Abb. 4-38 und 3.5.4.1.). Der Einfluss der fehlenden  $\alpha$ 1-Helix auf die Stimulation und cAMP-Affinität wurde durch einen AC-Test mit der PDE10A1 D87 GAF-CyaB1 AC (siehe 3.5.2.9. und 3.5.5.1.) überprüft. Das Protein war unverändert stimulierbar und zeigte auch keine Veränderung in der Affinität. Nur die Basalaktivität war um 94% im Vergleich zur PDE10 GAF-CyaB1 AC verringert (Abb. 4-40). Zudem ließ sich das Protein extrem schlecht exprimieren. Aufgrund der sehr geringen erhaltenen Proteinmengen konnten die kinetischen Parameter nicht überprüft werden.

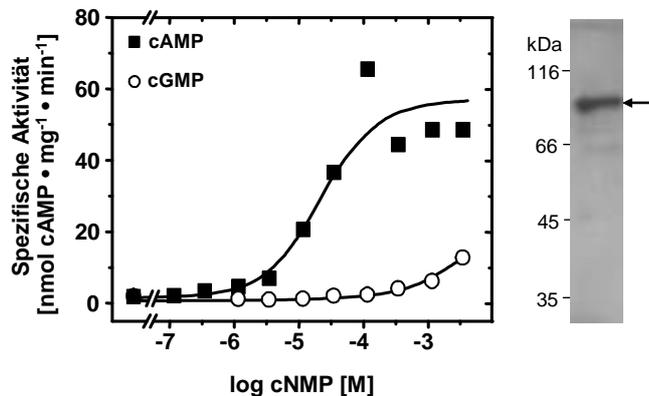


Abb. 4-40 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10A1 D87 GAF-CyaB1 AC

Dosis-Wirkung mit cAMP und cGMP (n=2), Western Blot: 0,4  $\mu$ g Protein (95,2 kDa). Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75  $\mu$ M ATP, Tris/HCl pH 7,5. Maximale Stimulation mit cAMP: 20,8  $\pm$  7,3-fach, cGMP: 4,4  $\pm$  0,1-fach; EC<sub>50</sub> (cAMP): 16,6  $\pm$  2,9  $\mu$ M; Basalaktivität: 3,2  $\pm$  0,1 nmol cAMP/mg·min.

## Ergebnisse

Die optimierte Expression des Kristallisationskonstrukts PDE10A1 D87 GAF-A/B erfolgte bei 19°C über Nacht (18-20 h) nach Induktion mit 400 µM IPTG. Um einen möglichst hohen Reinheitsgrad und eine hohe Proteinausbeute zu erreichen, wurde die Reinigung durch Variation der Imidazolkonzentration im Lyse- und Waschpuffer sowie der Waschvolumina und der Dauer der Bindung an Ni<sup>2+</sup>-IDA optimiert. Zudem wurde zum Vergleich die Reinigung mit Ni<sup>2+</sup>-NTA durchgeführt. Mit Ni<sup>2+</sup>-IDA erhielt man ein reineres Protein. Die optimierte Reinigung wurde wie unter 3.2.4.1. beschrieben, durchgeführt. Dem Zellysepuffer wurde Protease-Inhibitor zur Vermeidung eines Proteinabbaus zugegeben. Die Bindung an 250 µl Ni<sup>2+</sup>-IDA erfolgte ein- bis zweimal für 2-4 h. Das gereinigte Protein wurde mit Glycerin ad 35% versetzt und bei -20°C gelagert. Abb. 4-41 zeigt ein SDS-PAGE-Gel zusammen mit einem Western Blot des gereinigten Proteins (Domänenstruktur siehe 3.5.5.3.).

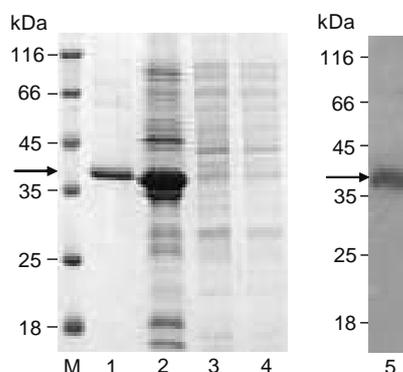


Abb. 4-41 SDS-PAGE-Gel und Western Blot von PDE10A1 D87 GAF-A/B

SDS-PAGE: M: Marker, 1: Proteineluat (2 µg), 2: Zellpellet (8 µg), 3: Überstand nach Lyse/Zentrifugation (3 µg), 4: Überstand nach Nickelbindung (3 µg); Western Blot: 5: 0,5 µg Protein.

Das SDS-Gel zeigt, dass sehr viel unlösliches Protein im Zellpellet in *inclusion bodies* vorliegt. Auch aus dem Überstand nach Lyse und Zentrifugation erkennt man, dass nur sehr wenig lösliches Protein enthalten ist. Die durchschnittliche Ausbeute an löslichem Protein betrug 1,4 mg Protein/Liter Kultur. Für Kristallisationszwecke war dies recht niedrig, aber noch ausreichend. Das lösliche Protein (MW: 39 kDa; IEP: 7,2) hatte die erwartete Größe. Im Western Blot sind neben der gewünschten Proteinbande keine Abbruchbanden zu erkennen.

Das gereinigte Protein wurde für die Kristallisation für 4 h oder über Nacht dialysiert (siehe 3.2.5.). Dazu wurden mehrere Proteineluate vereinigt. Anschließend erfolgte das Aufkonzentrieren je nach Volumen mit *Vivaspin 2-*, *NANOSEP 10k OMEGA-* oder *ULTRAFREEE-0.5-*Konzentratoren (siehe 3.2.6.). Das aufkonzentrierte Protein wurde mit 2 mM cAMP versetzt, um im Falle einer auflösbaren Kristallstruktur die Wechselwirkungen zwischen den GAF-Domänen der PDE10 und ihrem Ligand cAMP ermitteln zu können.

## Ergebnisse

Der erste Screen wurde mit in Dialysepuffer B, der zusätzlich 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM NaCl enthielt, dialysiertem Protein nach 3.4. durchgeführt. Dazu wurden die Hampton Research-Kits *Crystal Screen* und *Crystal Screen 2* (ohne die phosphat- und arsenhaltigen Puffer; 4 µg Protein) verwendet. Die Platten wurden bei 12°C gelagert. Mit den Puffern *Crystal Screen 12*, *Crystal Screen 19* und *Crystal Screen 2-40* wurden nach 25 Tagen nadelförmige Kristalle erhalten (Abb. 4-42). Tab. 4-7 liefert eine Übersicht über die Zusammensetzung der drei verschiedenen Kristallisationspuffer sowie die Form der erhaltenen Kristalle und deren Größe. Diese Kristalle waren reproduzierbar. Kontrollen ohne Protein ergaben keine Kristalle, was darauf hindeutet, dass es sich bei den Kristallen um Protein- und nicht um Salzkristalle handelt. Allerdings waren die mit *Crystal Screen 2-40* erhaltenen Kristalle nicht stabil. Sie lösten sich nach 10 Wochen auf. Es wurde von Prof. Dr. T. Stehle und Dr. C. Schall (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) versucht, Kristalle mit *Crystal Screen 12* für die Messung im Röntgenstrahl zu fischen, doch dies scheiterte daran, dass sich die Kristalle dabei auflösten.

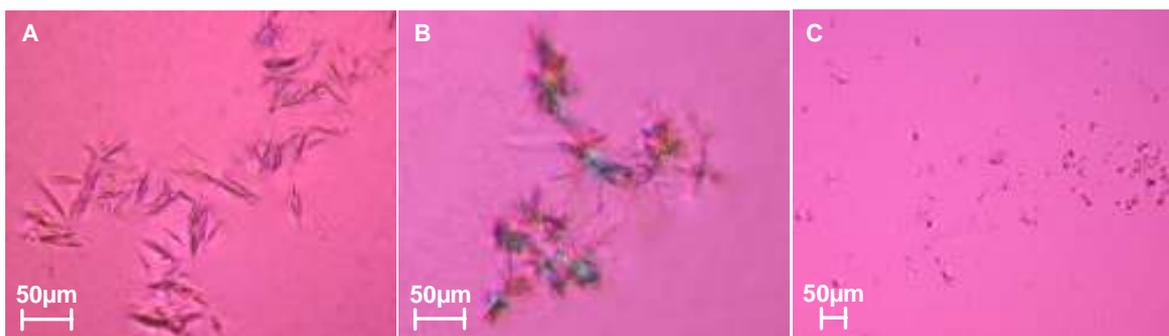


Abb. 4-42 Kristalle von PDE10A1 D87 GAF-A/B

(A) *Crystal Screen 12*, (B) *Crystal Screen 19*, (C) *Crystal Screen 2-40*; Protein: 4 µg (mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM NaCl), 12°C, 2 mM cAMP. Mit allen drei Kristallisationspuffern wurden nadelförmige Kristalle erhalten, die in Gruppen angeordnet sind.

Kristallisationspuffer	Zusammensetzung	Kristallform	Größe
<i>Crystal Screen 12</i>	30% Isopropanol 0,1 M Na-Hepes pH 7,5 0,2 M MgCl <sub>2</sub>	Nadeln (einzeln oder in Gruppen)	Länge: 50-60 µm Breite: < 15 µm (Gruppen)
<i>Crystal Screen 19</i>	30% Isopropanol 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 0,2 M Ammoniumacetat	Nadeln (einzeln oder in Gruppen)	Länge: 35-50 µm Breite: < 20 µm (Gruppen)
<i>Crystal Screen 2-40</i>	25% tert.-Butanol 0,1 M Tris pH 8,5	Nadelgruppen	Länge: 10-25 µm Breite: < 5 µm (Gruppen)

Tab. 4-7 Zusammenstellung der Pufferzusammensetzungen, Kristallform und -größe

Um größere und breitere Kristalle zu bekommen, schloss sich eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen an. Ansätze mit allen drei Kristallisationspuffern, aber mit Protein (2,6 µg, mit 2 mM cAMP), welches ohne NaCl und MgCl<sub>2</sub> dialysiert wurde, ergaben ebenfalls

Kristalle (Bilder nicht gezeigt). Mit *Crystal Screen 12* wuchsen nadelförmige Kristalle von gleicher Länge wie zuvor, die sich aber zu breiteren Gruppen zusammenlagerten (<35  $\mu\text{m}$ ). Zudem bildeten sich quadratische Kristalle von etwa 20x20  $\mu\text{m}$ . Bei Ansätzen mit *Crystal Screen 19* ergaben sich neben den nadelförmigen Kristallen (50x5  $\mu\text{m}$ ) lange rechteckige Kristalle mit bis zu 400  $\mu\text{m}$  Länge und 50  $\mu\text{m}$  Breite. Auch hier lösten sich die Kristalle beim Fischen auf. Daher war eine Auswertung im Röntgenstrahl nicht möglich. Mit *Crystal Screen 2-40* wurden wieder Nadelgruppen von annähernd gleicher Größe erhalten, die aber nicht stabil waren.

Tab. 4-8 zeigt eine Übersicht über das weitere Vorgehen bei der Optimierung der Kristalle. Dabei wurden die beiden ersten *Crystal Screen*-Puffer unter Variation des pH, der Konzentration an Präzipitantz (Isopropanol) und an Salz selbst hergestellt. Als Kontrollen dienten wieder Ansätze ohne Protein. Diese zeigten kein Kristallwachstum, was wiederum darauf hindeutet, dass die erhaltenen Kristalle Proteinkristalle sind. Auf eine weitere Optimierung der Bedingungen mit *Crystal Screen 2-40* wurde aufgrund der geringen Größe und Instabilität der Kristalle verzichtet. Abb. 4-43 zeigt zwei Kristallbilder, die mit zwei der optimierten Bedingungen aus Tab. 4-8 erhalten wurden. In Abb. 4-43A erkennt man nadelförmige und rechteckige (Pfeil) Kristalle. In Abb. 4-43B sind nadel- und stäbchenförmige Kristalle dargestellt. Diese wurden von Dr. C. Schall im Röntgenstrahl gemessen, ergaben aber keine auswertbaren Streubilder. Es handelt sich aber um Proteinkristalle.

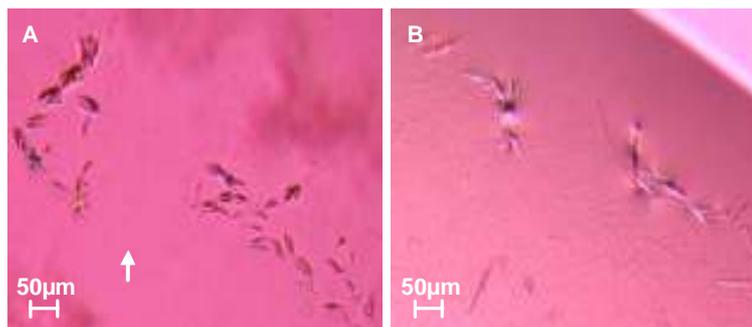


Abb. 4-43 Kristalle von *PDE10A1 D87 GAF-A/B* nach Optimierung

(A) Nadelförmige Kristalle mit 30% Isopropanol, 0,1 M Na-Hepes pH 7,5, 0,15 M  $\text{MgCl}_2$  (Protein: 3  $\mu\text{g}$ , 2 mM cAMP, ohne 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 10 mM NaCl, 12°C), Pfeil: rechteckige Kristalle (B) Stäbchenförmige Kristalle mit 30% Isopropanol, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 0,35 M Ammoniumacetat (Protein: 2  $\mu\text{g}$ , ohne 1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 10 mM NaCl, 2 mM cAMP, 12°C).

## Ergebnisse

Kristallisationspuffer				Kristalle	Bedingungen
pH	Isopropanol [%]	Na-Hepes [M]	MgCl <sub>2</sub> [M]		
<i>Variation des pH-Wertes und der Konzentration an Präzipitantz</i>					
6	20/25/30	0,1	0,2	Nadeln (10-70x<5-10 µm)	Protein: 3 µg 2 mM cAMP 12°C
6,5	20/25/30	0,1	0,2	Nadeln (20-50x<5-15 µm)	
7	20/25/30/35	0,1	0,2	Nadeln (25-70x<5-15 µm)	
7,5	20/25/30/35	0,1	0,2	Nadeln (40-70x5-20 µm)	
7,5	30	0,1	0,2	Rechtecke (10x10-15 µm)	
8	20/25/30/35	0,1	0,2	Nadeln (20-50x<5-15 µm)	
8	25/30	0,1	0,2	Rechtecke (20-40x15-25 µm)	
8,5	20/25/30/35	0,1	0,2	Nadeln (5-50 µm lang)	
9	20/25/30/35	0,1	0,2	Nadeln (25-60 µm lang)	
<i>Variation der Salzkonzentration</i>					
7,5	30	0,1	0,05	Nadeln (30-40x<5-10 µm)	Protein: 3 µg 2 mM cAMP 12°C
7,5	30	0,1	0,1	Rechtecke (15-20 µm lang)	
7,5	30	0,1	0,15	Nadeln (25-35 µm); Rechtecke (20x20 µm)	
7,5	30	0,1	0,2	Nadeln (25 µm); Rechtecke (15x20 µm)	
7,5	30	0,1	0,25	Nadeln (25x<5 µm)	
7,5	30	0,1	0,3	Nadeln (50x5 µm)	
7,5	30	0,1	0,35	Nadeln (25-35x5-10 µm)	
<i>Variation des pH-Wertes und der Konzentration an Präzipitantz</i>					
Kristallisationspuffer				Kristalle	Bedingungen
pH	Isopropanol [%]	Tris/HCl [M]	NH <sub>4</sub> Ac [M]		
<i>Variation des pH-Wertes und der Konzentration an Präzipitantz</i>					
6,5	20/25	0,1	0,2	Nadeln (bis 75 µm); Stäbe (50-70x5 µm)	Protein: 2 µg 2 mM cAMP 12°C
7	20/25	0,1	0,2	Nadeln (bis 75x<5 µm); Stäbe (30-70x5-10 µm)	
7,5	20/25	0,1	0,2	Nadeln (30-70 µm); Stäbe (30-75x5-10 µm)	
8	20/25	0,1	0,2	Nadeln (25-50 µm); Stäbe (30-60x<5 µm)	
8,5	20/25/30	0,1	0,2	Nadeln (30-60 µm); Stäbe (35-60x<5 µm)	
9	15/20/25/30	0,1	0,2	Nadeln (bis 100 µm); Stäbe (40-75x5-10 µm)	
<i>Variation der Salzkonzentration</i>					
8,5	30	0,1	0,05	Nadeln (bis 25 µm)	Protein: 2 µg 2 mM cAMP 12°C
8,5	30	0,1	0,1	Nadeln	
8,5	30	0,1	0,15	Nadeln	
8,5	30	0,1	0,35	Nadeln (bis 100x<5 µm); Stäbe (50-75x5-10 µm)	

*Tab. 4-8 Ergebnisse der Optimierung der Kristallisationsbedingungen mit PDE10A1 D87 GAF-A/B*

Dargestellt sind nur die Bedingungen, mit denen Kristalle erhalten worden sind. Die Ausgangsbedingungen waren: 30% Isopropanol, 0,1 M Na-Hepes pH 7,5, 0,2 M MgCl<sub>2</sub> bzw. 30% Isopropanol, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 0,2 M Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac).

Ein Austausch des Ammoniumacetats gegen Ammoniumsulfat ergab keine Kristallbildung mehr. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PDE10 GAF-Domänen ohne  $\alpha$ 1-Helix in Gegenwart von cAMP kristallisieren. Jedoch waren die mit den oben gezeigten Bedingungen erhaltenen Kristalle zu klein und zum Teil zu instabil für eine Auswertung im Röntgenstrahl und damit für eine Strukturaufklärung. Daher wurde ein neues Konstrukt kloniert.

4.3.2. Kristallisationskonstrukt PDE10A1 V63 GAF-A/B

Beim nächsten Kristallisationskonstrukt wurde die  $\alpha 1$ -Helix der GAF-A mit einbezogen. Als N-terminaler Startpunkt des Konstrukts wurde V63 (PDE10A1 63-426) gewählt, d.h. es befinden sich noch 10 AS des PDE10 N-Terminus vor der GAF-A. Die Wahl dieses Startpunkts erfolgte in Anlehnung an die Kristallisationskonstrukte der bereits kristallisierten GAF-Domänen der PDE2A der Maus und der CyaB2 (siehe Abb. 4-38). Die Klonierung des Konstrukts PDE10A1 V63 GAF-A/B wurde wie unter 3.5.4.2. beschrieben, durchgeführt (Domänenstruktur siehe 3.5.5.3.).

Wie beim vorherigen Konstrukt wurde die Stimulation der AC und die Affinität der GAF-Domänen für cAMP mit Hilfe der PDE10A1 V63 GAF-CyaB1 AC-Chimäre (siehe 3.5.2.7. und 3.5.5.1.) überprüft. Die Expression, Reinigung und Dialyse des Proteins erfolgte wie bisher. Die Chimäre wies eine maximale Stimulation von 23,7-fach (mit 1 mM cAMP) und von  $6,1 \pm 1,1$ -fach (mit 3 mM cGMP) auf. Diese liegt geringfügig über den Faktoren der PDE10 GAF-CyaB1 AC. Der  $EC_{50}$ -Wert von  $21,9 \pm 4 \mu\text{M}$  cAMP zeigte keine Veränderung. Die Basalaktivität des Proteins sank auf  $18,3 \pm 0,6 \text{ nmol cAMP/mg}\cdot\text{min}$  (Abb. 4-44). Eine Bestimmung der kinetischen Parameter der Chimäre schloss einen Einfluss des veränderten N-Terminus auf die enzymatischen Eigenschaften der AC aus (Daten nicht gezeigt). Damit führte der verkürzte N-Terminus zu keiner nennenswerten Änderung der Stimulation der AC mit cAMP und cGMP sowie der Affinität der GAF-Domänen für cAMP.

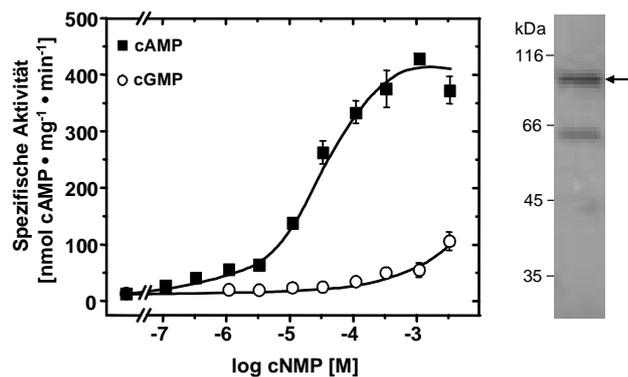


Abb. 4-44 Dosis-Wirkungskurve und Western Blot der PDE10A1 V63 GAF-CyaB1 AC

Testbedingungen: 10 min, 37°C, 75  $\mu\text{M}$  ATP, Tris/HCl pH 7,5; n=4; Western Blot: 0,2  $\mu\text{g}$  Protein.

Die Expression des Kristallisationskonstrukts PDE10 V63 GAF-A/B erfolgte bei 19°C über Nacht (18-20 h) nach Induktion mit 400  $\mu\text{M}$  IPTG. Bei der Zellyse wurde Protease-Inhibitor im Zellysepuffer verwendet. Die Reinigung wurde mit 250  $\mu\text{l}$   $\text{Ni}^{2+}$ -IDA wie unter 3.2.4.1. beschrieben, durchgeführt. Die Inkubation des Überstandes nach Zellyse und Zentrifugation mit

Ni<sup>2+</sup>-IDA erfolgte ein- bis viermal, denn wie Abb. 4-45 zeigt, war das exprimierte Protein reichlich als lösliches Protein im Überstand nach der Zellyse vorhanden. Der hohe Reinheitsgrad des Proteins blieb von der Häufigkeit der Inkubation mit Ni<sup>2+</sup>-IDA unbeeinflusst. Die Proteinausbeute lag fünf- bis zehnfach über der des vorherigen Konstrukts. In Abb. 4-45 erkennt man neben der gewünschten Proteinbande (MW: 41,9 kDa) keine weiteren Abbruchbanden im Western Blot. Das gereinigte Protein wurde mit 40% Glycerin bei -20°C gelagert oder, wie es meist der Fall gewesen ist, sofort über Nacht bei 4°C dialysiert. Die Dialyse musste allerdings anfangs optimiert werden, da das Protein im bisherigen Dialysepuffer B bei pH 7,5 stark ausgefallen war. Die optimierte Dialyse erfolgte im Dialysepuffer C mit pH 9,0. Dieser pH lag ausreichend entfernt vom isoelektrischen Punkt des Proteins (IEP: 7).

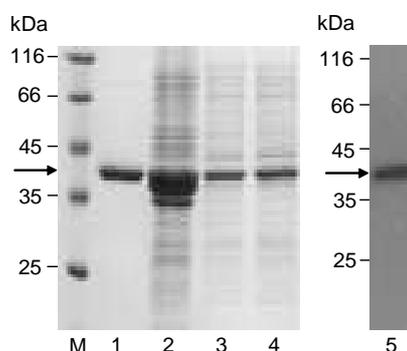


Abb. 4-45 SDS-PAGE-Gel und Western Blot von PDE10A1 V63 GAF-A/B

SDS-PAGE: **M**: Marker, **1**: Proteineluat (2 µg), **2**: Zellpellet (8 µg), **3**: Überstand nach Lyse/Zentrifugation (3 µg), **4**: Überstand nach Nickelbindung (3 µg); Western Blot: **5**: 0,1 µg Protein.

Das dialysierte Protein wurde anschließend mit *Vivaspin 2*- oder *Amicon Ultra-15 (Ultracel-5k)*-Konzentratoren aufkonzentriert. Mit dem aufkonzentrierten Protein wurden folgende Screening-Ansätze pipettiert (siehe 3.4.):

- 13-16 µg Protein mit 2 mM cAMP: *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2* und *Crystal Screen Lite* (Hampton Research) sowie *Wizard I* und *II* (Emerald Biosystems)
- 8 µg Protein mit 5 mM cAMP: *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2* und *Crystal Screen Lite* (Hampton Research)
- 13 µg Protein ohne cAMP: *Crystal Screen* und *Crystal Screen 2* (Hampton Research)

Dabei wurden keine arsen- und phosphathaltigen Puffer und nur diejenigen Puffer, deren pH um mindestens eine Einheit über oder unter dem IEP des Proteins lag, verwendet. Denn wie bereits bei der Dialyse erwähnt, fiel das Protein um seinen isoelektrischen Punkt herum aus. Die Platten wurden bei 12°C gelagert. Dr. C. Schall (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) setzte zusätzlich Platten mit 16 µg Protein mit 2 mM cAMP (*Wizard I* und *II*) an und lagerte diese bei 4°C. Die Ansätze mit 2 mM und 5 mM cAMP zeigten keine Kristallbildung.

Auch weitere Ansätze mit 12 µg Protein mit 5 mM cAMP (*Crystal Screen*, *Crystal Screen 2*, *Wizard I*) bei einer Temperatur von 18°C führten nicht zu Kristallen.

Allerdings wuchsen mit Protein ohne cAMP mit zwei verschiedenen Puffern bereits nach einer Woche Kristalle. Mit *Crystal Screen 2-3* (25% Ethylenglykol) bildeten sich kleine Plättchen (<5 µm). *Crystal Screen 2-16* (2% Polyethylenimin, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6, 0,5 M NaCl) ergab hexagonale Kristalle (max. 450x250 µm) (Abb. 4-46). Zudem bildeten sich nach zwei Wochen mit *Crystal Screen 44* (0,2 M Mg-Formiat) dreidimensionale Täfelchen (<5 µm). Alle Kristalle waren reproduzierbar.

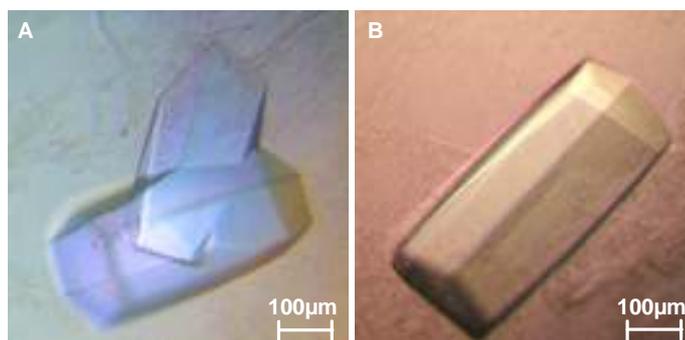


Abb. 4-46 Kristalle von PDE10A1 V63 GAF-A/B

(A) + (B) 2% Polyethylenimin, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6, 0,5 M NaCl, Protein: 13 µg, ohne cAMP; 12°C.

Eine Optimierung der Bedingungen mit *Crystal Screen 2-3* und *44* führten zu keinen größeren Kristallen (nicht gezeigt). Deshalb wurde auf weitere Ansätze verzichtet. Aufgrund dessen, dass mit *Crystal Screen 2-16* sehr schöne große, für eine Messung im Röntgenstrahl ideale Kristalle erhalten wurden, erfolgte mit diesem Kristallisationspuffer eine ausführliche Optimierung der Kristallisationsbedingungen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-9 und Tab. 4-10 dargestellt. Zwei Fotos optimierter Kristalle zeigt Abb. 4-47. Man erkennt deutlich, dass sich ohne Polyethylenimin im Bereich von pH 5,6 die Kristallform ändert.

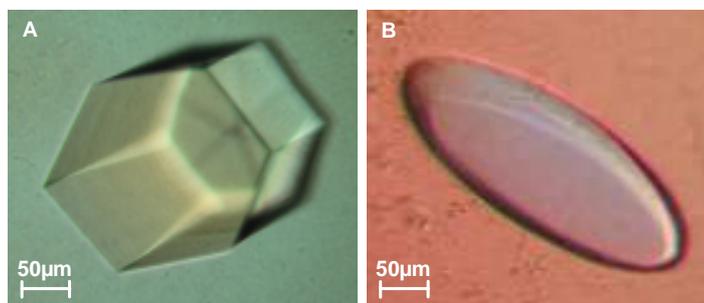


Abb. 4-47 Kristalle von PDE10A1 V63 GAF-A/B nach Optimierung

(A) 2,5% Polyethylenimin, 0,05 M Na-Citrat pH 5,6, 0,5 M NaCl, Protein: 8 µg, ohne cAMP; 12°C; (B) 0,25 M Na-Citrat pH 5,6, 0,5 M NaCl, Protein: 13 µg, ohne cAMP; 4°C.

## Ergebnisse

Kristallisationspuffer			Kristalle	Bedingungen	Bemerkung
PEI [%]	Na-Citrat pH 5,6 [M]	NaCl [M]			
<b>Variation der Konzentrationen von Puffer, Präzipitantz und Salz</b>					
3	0,1	0,5	hexagonal (100-225 µm lang)	Protein: 8 µg 12°C ohne cAMP	bis 7 Å (Synchrotron)
2,5	0,05	0,5	hexagonal (75-300 µm lang)		
2	0,05/0,15	0,5	hexagonal (225x150 µm)		
1,5	0,25	0,5	hexagonal (250x100 µm)		
1	0,1/0,2	0,5	hexagonal (bis 600 µm lang)		
0,5	0,1	0,5	hexagonal (100x50 µm)		
<b>Senkung der Inkubationstemperatur</b>					
3	0,15	0,5	hexagonal (650 µm lang)	Protein: 13 µg 4°C ohne cAMP	8-12 Å
2	0,05/0,25	0,5	hexagonal (175x175 µm)		
1,5	0,25	0,5	hexagonal (bis 200 µm lang)		
1	0,2/0,25	0,5	hexagonal (bis 475 µm lang)		
0,5	0,25	0,5	z.T. abgerundet, hexagonal (470x150 µm)		
-	0,15/0,2/0,25/0,3	0,5	oval (25-300 µm lang)		
<b>Überschichtung der Reservoirolösung mit je 100 µl Silikonöl und Paraffinöl</b>					
3	0,1	0,5	hexagonal (200-300 µm lang)	Protein: 13 µg 12°C ohne cAMP	8,5-14 Å
2,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (100-600 µm lang)		
2	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (200-700 µm lang)		
2	0,1	0,4/0,6	hexagonal (150-400 µm lang)		
1,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (180-600 µm lang)		
1	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (100-550 µm lang)		
0,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (50-500 µm lang)		
-	0,1	0,5	hexagonal (bis 200 µm lang)		
<b>Zusatz von 10 mM MgCl<sub>2</sub> zum Kristallisationspuffer</b>					
3	0,1	0,5	hexagonal (500 µm lang)	Protein: 13 µg 12°C ohne cAMP	8,5-13 Å  Kristalle z.T. keine glatten Kanten
2,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (150-550 µm lang)		
2	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (100-550 µm lang)		
2	0,1	0,4/0,6	hexagonal (300-600 µm lang)		
1,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (100-500 µm lang)		
1	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (100-600 µm lang)		
0,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (100-500 µm lang)		
<b>Zusatz von 20 mM CaCl<sub>2</sub> zum Kristallisationspuffer</b>					
3	0,1	0,5	hexagonal (250-400 µm lang)	Protein: 13 µg 12°C ohne cAMP	8-12 Å  Kristalle z.T. keine glatten Kanten
2,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (200-450 µm lang)		
2	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (100-500 µm lang)		
2	0,1	0,4/0,6	hexagonal (200-400 µm lang)		
1,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (bis 550 µm lang)		
1	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (bis 500 µm lang)		
0,5	0,05/0,1/0,15/0,2	0,5	hexagonal (50-400 µm lang)		
-	0,1	0,5	hexagonal (bis 200 µm lang)		

*Tab. 4-9 Ergebnisse der Optimierung der Kristallisationsbedingungen mit PDE10 V63 GAF-A/B (I)*  
 Dargestellt sind nur die Bedingungen, mit denen Kristalle erhalten worden sind. Die Ausgangsbedingung war: 2% Polyethylenimin, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6, 0,5 M NaCl. Es wurden nicht alle erhaltenen Kristalle im Röntgenstrahl vermessen. Die Messungen wurden von Prof. Dr. T. Stehle und Dr. C. Schall (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) durchgeführt.

## Ergebnisse

Kristallisationspuffer				Kristalle	Bedingungen	Bemerkung
pH	PEI [%]	Na-Citrat [M]	NaCl [M]			
<i>Variation des pH-Wertes von Na-Citrat</i>						
4,5	2	0,1	0,5	hexagonal (250-500 µm lang)	Protein: 15 µg 12°C ohne cAMP	7,5-11,5 Å, Kristalle z.T abgerundet
4,8	2	0,1/0,25	0,5	hexagonal (bis 300 µm lang)		
5,1	2	0,1/0,25	0,5	hexagonal (50-250 µm lang)		
5,4	2	0,1/0,25	0,5	hexagonal (bis 350 µm lang)		
5,6	2	0,1/0,25	0,5	hexagonal (bis 300 µm lang)		
4,5	-	0,1	0,5	hexagonal (100-400 µm lang)	Protein: 15 µg 12°C ohne cAMP	Kristalle nicht vermessen; z.T abgerundet u. keine glatten Kanten
4,8	-	0,1/0,25	0,5	hexagonal (bis 300 µm lang)		
5,1	-	0,1/0,25	0,5	hexagonal (bis 250 µm lang)		
5,4	-	0,1/0,25	0,5	hexagonal/oval (bis 150 µm lang)		
5,6	-	0,1/0,25	0,5	hexagonal/oval (bis 200 µm lang)		
5,8	-	0,25	0,5	hexagonal/oval (bis 300 µm lang)		
<i>Reinigung mit 0,02% α-Monothioglycerol (in Lyse-, Wasch- und Elutionspuffer)</i>						
4,5	2	0,1	0,5	hexagonal (50 µm lang)	Protein: 7 µg 12°C ohne cAMP	Kristalle nicht vermessen; z.T abgerundet u. keine glatten Kanten
4,8	2	0,1/0,2	0,5	hexagonal (bis 450 µm lang)		
5,1	2	0,1/0,2	0,5	hexagonal (bis 250 µm lang)		
5,6	2	0,1	0,5	hexagonal (180 µm lang)		
4,5	-	0,1/0,2	0,5	hexagonal (50-300 µm lang)		
4,8	-	0,1/0,2	0,5	hexagonal (50-250 µm lang)		
5,1	-	0,1/0,2	0,5	hexagonal (50-200 µm lang)		
5,4	-	0,2	0,5	hexagonal (bis 500 µm lang)		
5,6	-	0,1/0,2	0,5	hexagonal (bis 100 µm lang)		
Kristallisationspuffer				Kristalle	Bedingungen	Bemerkung
pH	PEI [%]	NH <sub>4</sub> -Acetat [M]	NaCl [M]			
<i>Austausch von Na-Citrat gegen NH<sub>4</sub>-Acetat</i>						
4,8	2	0,1	0,5	hexagonal (300-330 µm lang)	Protein: 15 µg 12°C ohne cAMP	Kristalle nicht vermessen; z.T abgerundet u. keine glatten Kanten
5,1	2	0,1	0,5	hexagonal (bis 250 µm lang)		
5,4	2	0,1/0,25	0,5	hexagonal (450 µm lang)		
5,6	2	0,1/0,25	0,5	hexagonal (bis 350 µm lang)		
5,8	2	0,1/0,25	0,5	hexagonal (bis 300 µm lang)		
6,1	2	0,1	0,5	hexagonal (bis 300 µm lang)		
6,4	2	0,1	0,5	hexagonal (bis 250 µm lang)		
6,7	2	0,1	0,5	hexagonal (bis 300 µm lang)		
Kristallisationspuffer				Kristalle	Bedingungen	Bemerkung
pH	PEI [%]	Na-Acetat [M]	NaCl [M]			
<i>Reinigung mit 0,02% α-Monothioglycerol</i>						
4,8	2	0,1	0,5	hexagonal (400 µm lang)	Protein: 7 µg 12°C ohne cAMP	7-13 Å, Kristalle z.T abgerundet u. keine glatten Kanten
5,1	2	0,1/0,2	0,5	hexagonal (bis 250 µm lang)		
5,4	2	0,1/0,2	0,5	hexagonal (bis 500 µm lang)		
5,6	2	0,1/0,2	0,5	hexagonal (bis 300 µm lang)		
5,8	2	0,1/0,2	0,5	hexagonal (150-400 µm lang)		
6,1	2	0,1/0,2	0,5	hexagonal (100-350 µm lang)		
6,4	2	0,1	0,5	hexagonal (bis 250 µm lang)		
5,1	-	0,2	0,5	hexagonal (100 µm lang)		

*Tab. 4-10 Ergebnisse der Optimierung der Kristallisationsbedingungen mit PDE10 V63 GAF-A/B (II)*

Dargestellt sind nur die Bedingungen, mit denen Kristalle erhalten worden sind. Die Ausgangsbedingung war: 2% Polyethylenimin, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6, 0,5 M NaCl. Es wurden nicht alle erhaltenen Kristalle im Röntgenstrahl vermessen.

Kontrollen ohne Protein zeigten keine Kristallbildung, was auf Proteinkristalle bei den erhaltenen Kristallen hindeutet. Dies wurde durch Messungen der Kristalle aus verschiedenen optimierten Ansätzen im Röntgenstrahl durch Prof. Dr. T. Stehle und Dr. C. Schall (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) bestätigt (siehe auch Tab. 4-9 und 4-10). Alle gemessenen Kristalle zeigten aber keine bessere Auflösung als 7 Å. Aus den erhaltenen Streubildern konnte man nur erkennen, dass die Einheitszelle der Kristalle wie die Kristalle selbst hexagonal war. Eine weitere Auswertung für die Aufklärung der Struktur der PDE10 GAF-Domänen war damit nicht möglich. Somit konnte auch durch die Optimierung der Kristallisationsbedingungen wie z.B. durch Variation des pH-Wertes oder eine verringerte Inkubationstemperatur oder die Überschichtung der Reservoirlösung mit Silikon- und Paraffinöl für eine kontrollierte Verdunstung (bzw. Dampfdiffusion) keine bessere Auflösung erzielt werden. Die letzten beiden Maßnahmen wurden gewählt, um das Kristallwachstum zu verlangsamen, da dies eventuell Einfluss auf die Auflösung haben könnte. Zu schnelles Kristallwachstum könnte die innere Ordnung der Kristalle möglicherweise stören. Auch der Austausch von Na-Citrat gegen Na-Acetat oder der Zusatz von zweiwertigen Kationen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  erbrachte keine verbesserte Auflösung.

Zur Überprüfung der Quartärstruktur des dialysierten und aufkonzentrierten Proteins wurde ein Gelfiltrationslauf über eine *Superdex 200 (16/60)*-Säule mit Laufpuffer für Superdex 200 (pH 9) an einer *ÄKTA*-Anlage nach 3.2.11. durchgeführt (Abb. 4-48).

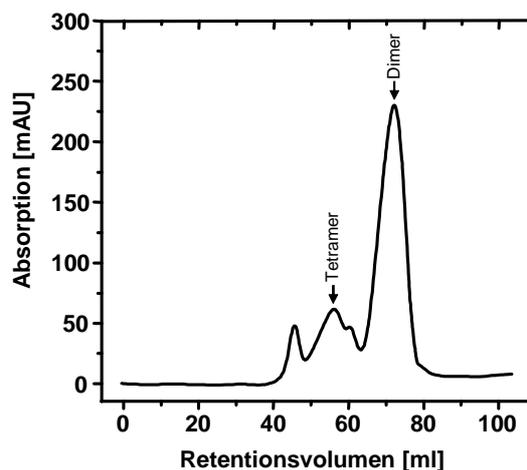


Abb. 4-48 Gelfiltrationslauf von PDE10A1 V63 GAF-A/B

Gelfiltration mit PDE10A1 V63 GAF-A/B: Superdex 200 (16/60), Laufpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 9, 10% Glycerin, 150 mM NaCl, 0,05%  $\alpha$ -Monothioglycerol; Flussrate: 1ml/min;  $\lambda=280$  nm; Fraktionsgröße: 0,25 ml. Fraktionierung ab 35 ml Retentionsvolumen.

Dieser Lauf (Abb. 4-48) verdeutlicht, dass das Protein nicht als reines Dimer, sondern auch mindestens als Tetramer vorliegt. Das könnte eine mögliche Ursache für die schlechte Auflösung

der Kristalle sein. Daher wurden mit dem fraktionierten reinen Dimerpeak ebenfalls Kristallisationsansätze pipettiert, in denen die Ausgangsbedingung (2% Polyethylenimin, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6, 0,5 M NaCl) wie oben nach pH, Konzentration der einzelnen Bestandteile und Ersetzen des Na-Citrats durch Na-Acetat variiert wurde (13 µg Protein, ohne cAMP, 12°C). Zuvor wurde das Protein in Dialysepuffer C bei pH 9 zur Reduktion der NaCl-Konzentration auf 10 mM dialysiert und anschließend aufkonzentriert. Doch auch hier lag die Auflösung der erhaltenen hexagonalen Kristalle nicht unter 7,5 Å.

#### 4.3.3. Kristallisationskonstrukt PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV

Eine weitere Möglichkeit für die schlechte Auflösung der Kristalle mit PDE10A1 V63 GAF-A/B könnte der C-terminale His<sub>6</sub>-Tag sein, der eine mögliche Störung der korrekten Faltung des Proteins bewirkt. Deshalb wurde dieser im nächsten Konstrukt entfernt. Dazu wurde das Konstrukt PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV nach 3.5.4.3. kloniert. Der N-terminale Startpunkt mit V63 (PDE10A1 63-426) blieb im Vergleich zum vorherigen Konstrukt (siehe 4.3.2.) unverändert. Allerdings wurde hier zusätzlich direkt vor dem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag die Erkennungssequenz bzw. Schnittstelle (ENLYFQG) für die TEV-Protease eingeführt. Dies ermöglicht die Abspaltung des His-Tags durch einen Verdau des gereinigten Proteins mit der TEV-Protease (Abb. 4-49).

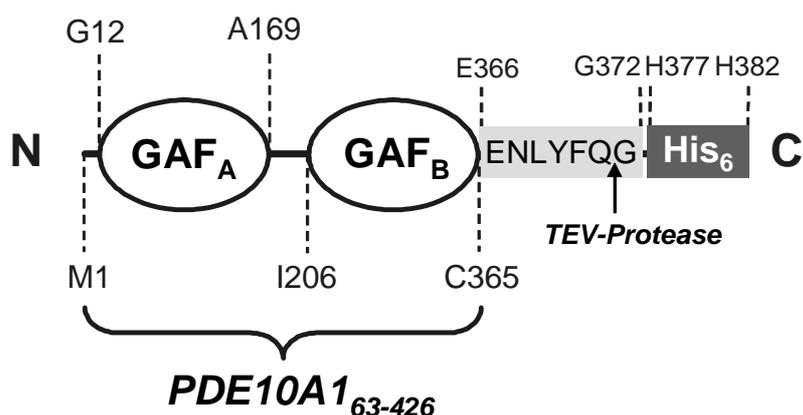


Abb. 4-49 Schematische Darstellung von PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV mit TEV-Schnittstelle

Die Expression und Reinigung dieses Kristallisationskonstrukts erfolgte wie bisher. Die Inkubation des Überstandes nach Lyse/Zentrifugation mit 250 µl Ni<sup>2+</sup>-IDA wurde in der Regel zweimal durchgeführt. Die Proteinausbeute und die Reinheit des Proteins unterschieden sich nicht vom vorherigen Konstrukt (siehe 4.3.2.). Abb. 4-50 zeigt ein SDS-PAGE-Gel zusammen

## Ergebnisse

mit einem Western Blot des gereinigten und unverdauten Proteins. Sowohl auf dem Gel als auch auf dem Western Blot ist die gewünschte Proteinbande (MW: 42,8 kDa) zu sehen. Zudem erkennt man deutlich, dass auch noch nach der Inkubation des Überstandes nach Lyse/Zentrifugation eine große Menge an löslichem Protein enthalten ist.

Das gereinigte Protein wurde vor dem TEV-Verdau zur Beseitigung des Imidazols in Dialysepuffer C bei pH 9 dialysiert. Ein pH-Wert von 9 war auch hier aufgrund des IEP des Proteins von 6,8 erforderlich, um eine Ausfällung des Proteins zu verhindern. Der TEV-Verdau erfolgte wie unter 3.2.12. beschrieben. Das Ergebnis eines TEV-Verdaus ist in Abb. 4-50 dargestellt. Diese zeigt, dass beim Verdau bei 4°C über Nacht ein vollständiger Umsatz des Proteins erfolgte.

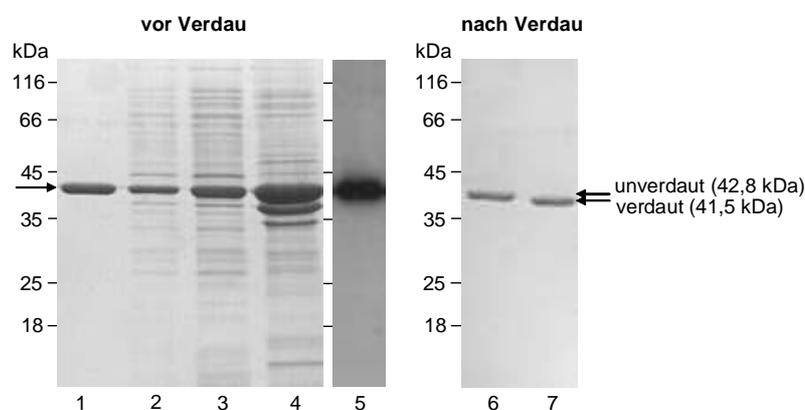


Abb. 4-50 SDS-PAGE-Gel (vor und nach TEV-Verdau) und Western Blot von PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV

Vor Verdau: SDS-PAGE: (1) Proteineluat (2 µg), (2) Überstand nach Lyse/Zentrifugation (3 µg), (3) Überstand nach Nickelbindung (3 µg), (4) Zellpellet (8 µg); Western Blot: (5) unverdautes Protein (0,25 µg); Nach Verdau: SDS-Gel: (6) unverdautes Protein (0,5 µg, 42,8 kDa), (7) mit S219V-TEV-Protease verdautes Protein, 4°C, ü.N. (0,5 µg, 41,5kDa).

In Abb. 4-51 ist das Ergebnis eines Verdaus mit der TEV-Protease in Abhängigkeit von der Zeit mit Hilfe eines SDS-Gels sowie eines Western Blots dargestellt. Die obere Bande (unverdautes Protein) im Gel wird mit zunehmender Inkubationsdauer schwächer. Nach einem Über-Nacht-Verdau ist sie vollständig verschwunden. Man sieht nur noch die Bande des verdauten Proteins. Auch im Western Blot erkennt man die Abnahme der Intensität der Bande des unverdauten Proteins mit zunehmender Inkubationszeit mit der TEV-Protease. Das unverdaute Protein ist im Blot nicht zu erkennen, da durch die TEV-Protease der mittels Antikörper detektierbare His-Tag abgespalten wurde. Alle durchgeführten Verdauansätze wurden aufgrund der erhaltenen Ergebnisse bei 4°C über Nacht inkubiert.

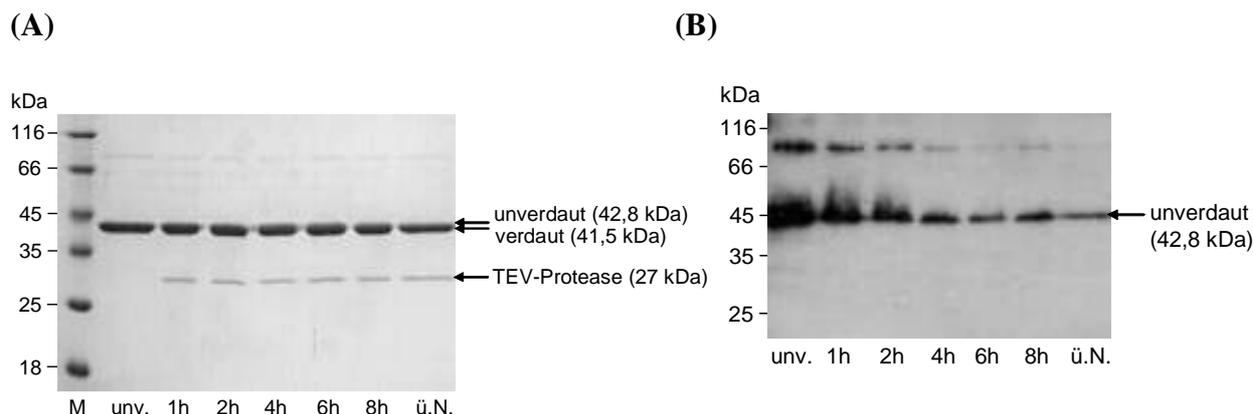


Abb. 4-51 Zeitabhängigkeit des TEV-Verdau von PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV

(A) SDS-PAGE-Gel: (M) Marker, (unv.) unverdautes Protein, Dauer des Verdau: 1-8 h oder über Nacht (ü.N.); je 1,8  $\mu\text{g}$  Protein; TEV-Verdau mit AcTEV (Invitrogen) bei 4°C; (B) Western Blot: Beschriftung wie SDS-Gel, 0,25  $\mu\text{g}$  Protein je Spur. Es ist nur unverdautes Protein zu sehen, da der detektierbare His-Tag durch die TEV-Protease beim verdauten Protein abgespalten wurde. Bei den oberen Banden handelt es sich wahrscheinlich um Dimer.

Eine Dialyse des verdauten Proteins (IEP: 6,35) in Dialysepuffer C pH 8,5 vor der Abtrennung der TEV mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA erwies sich als notwendig, um EDTA und DTT zu entfernen. Diese wirken störend auf die Bindung der TEV-Protease an das Nickelmaterial. Nach der Abtrennung der TEV-Protease wurde das Protein nochmals im Dialysepuffer C pH 8,5 dialysiert und mit Hilfe von *Vivaspin 2*- und *ULTRAFREEE-0.5*-Konzentratoren aufkonzentriert. Mit dem aufkonzentrierten Protein (13  $\mu\text{g}$ ) wurden ohne cAMP mehrere Screening-Ansätze mit den Puffern der Hampton-Kits *Crystal Screen* und *Crystal Screen 2* sowie der Emerald-Kits *Wizard I* und *II* pipettiert. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 12°C. Es wurden auch hier nur diejenigen Puffer verwendet, deren pH um etwa eine Einheit über oder unter dem IEP des Proteins lag. Zudem wurden keine arsen- und phosphathaltigen Puffer eingesetzt.

Mit dem Kristallisationspuffer *Wizard I-29* (10% PEG 8000, 0,1 M CHES pH 9,5, 0,2 M NaCl) wurden nach etwa einer Woche nadelförmige Kristalle (<10  $\mu\text{m}$ ) erhalten (Abb. nicht gezeigt). Diese waren jedoch zu klein für eine Messung im Röntgenstrahl. Mit allen anderen Bedingungen wuchsen keine Kristalle. Auch die Bedingungen, mit denen mit dem Protein mit His-Tag Kristalle (siehe 4.3.2.) erhalten wurden, zeigten keine Kristallbildung. Dies verdeutlicht ein vollkommen anderes Verhalten des Proteins ohne den His-Tag im Vergleich zum vorherigen Konstrukt.

Kristallisationsansätze mit Puffern der *Crystal Screen*-, *Crystal Screen 2*-, *Wizard I*- und *II*-Kits sowie mit 5 mM cAMP versetztem Protein (13  $\mu\text{g}$ ) ergaben bei 12°C keine Kristalle. Der pH-Wert der Puffer wurde wie oben berücksichtigt. Die arsenhaltigen Puffer wurden ausgeschlossen.

Zur Überprüfung der Quartärstruktur des verdauten, dialysierten und aufkonzentrierten Proteins wurde wie beim vorherigen Konstrukt eine Gelfiltration über eine *Superdex 200 (16/60)*-Säule mit Laufpuffer für Superdex 200 (pH 8,5) nach 3.2.11. durchgeführt.

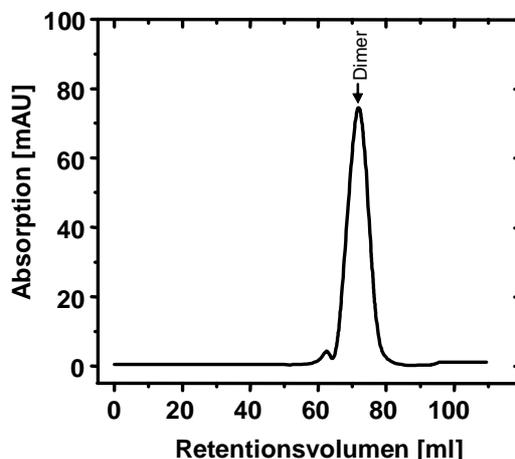


Abb. 4-52 Gelfiltrationslauf des TEV-verdauten Proteins PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV

Gelfiltration über Superdex 200 (16/60)-Säule an einer Äkta-Anlage, Laufpuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 10% Glycerin, 150 mM NaCl, 0,05%  $\alpha$ -Monothioglycerol; Flussrate: 1 ml/min;  $\lambda=280$  nm.

Der Lauf (Abb. 4-52) zeigt, dass das verdaute Protein anders als das Konstrukt PDE10A1 V63 GAF-A/B (Abb. 4-48) fast ausschließlich als Dimer vorliegt. Der His-Tag scheint die Ausbildung von Oligomeren zu fördern. Dennoch war die Kristallisation mit Protein ohne His-Tag bisher weitgehend erfolglos.

Die Kristallisation der PDE10 GAF-Domänen mit dem Konstrukt PDE10A1 V63 GAF-A/B TEV wird von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Stehle (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen) weitergeführt.

---

## 5. Diskussion

### 5.1. cAMP als Ligand der PDE10 Tandem-GAF-Domänen

Die Säuger-PDE-Familien PDE2, 5, 6, 10 und 11 besitzen zwei N-terminale Tandem-GAF-Domänen. Für PDE2, 5, 6, und kürzlich für PDE11, ist als Ligand der GAF-Domänen cGMP bestimmt worden. Der Ligand der PDE10 GAF-Domänen blieb unbekannt und konnte auch nicht durch Bindungsstudien bestimmt werden [84]. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten der PDE10 GAF-Domänen mit denen der PDE2, 5 und 6 vermutete man, dass die PDE10 ebenfalls eine cGMP-bindende PDE ist [83].

Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Arbeit cAMP als Ligand des GAF-Tandems der humanen PDE10 nachgewiesen werden. Dazu wurde die Tatsache genutzt, dass die beiden GAF-Domänen der CyaB1 durch die GAF-Domänen einer Säuger-PDE, der PDE2 aus der Ratte, unter Funktionserhalt austauschbar sind [14]. Für die PDE10 konnte hier gezeigt werden, dass ebenfalls eine funktionelle Chimäre bestehend aus dem N-Terminus (ab Leu-14 der PDE10A1) und den beiden GAF-Domänen der PDE10 sowie der PAS- und katalytischen Domäne der Adenylatcyclase CyaB1 aus *Anabaena* erzeugt werden kann. Dies ermöglichte die Bestimmung des Liganden sowie die Charakterisierung der GAF-Domänen der dual-spezifischen PDE10 durch Trennung von Ligand und Substrat. Die erzeugte PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre zeigte eine maximale Stimulation der katalytischen Aktivität der AC mit cAMP um den Faktor 15,5. Dagegen war mit cGMP eine Stimulation nur um das Vierfache möglich (siehe 4.1.1.3.). Auch die Untersuchung der Stimulierbarkeit der Chimäre mit weiteren Nucleosiden und Nucleotiden bestätigte cAMP in seiner Rolle als Ligand der PDE10 GAF-Domänen. Die Veränderung der C6-Aminogruppe des Adenins vom cAMP in verschiedenen cAMP-Analoga hatte einen großen Einfluss auf die Stimulation der AC. Diese könnte eventuell eine Rolle bei der Diskriminierung gegenüber cGMP spielen. In der PDE2A GAF-B wurde mit Hilfe der Kristallstruktur eine Wechselwirkung von Asp-439 mit dem C6 und dem N1 des Guanins vom cGMP beschrieben [35].

Damit ist die humane PDE10 die einzige der fünf Säuger-PDEn mit cAMP als Ligand. Daneben gibt es in *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der Schlafkrankheit beim Menschen, mit der TbPDE2B ebenso eine PDE, welche über ihre GAF-Domänen cAMP bindet [28].

Der EC<sub>50</sub>-Wert der PDE10 GAF-CyaB1 AC für cAMP liegt mit 18,1 µM über der zellulären cAMP-Konzentration. Eine physiologische Bedeutung dieser Tatsache lässt sich nur schwer

abschätzen. Denkbar wären auch Regulationsmechanismen, die eine Erhöhung der cAMP-Affinität der PDE10 GAF-Domänen bewirken. Der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert liefert jedoch eine Erklärung dafür, dass bisher noch kein Ligand für die PDE10 GAF-Domänen gefunden wurde sowie für das negative Ergebnis des Bindungsassays von Soderling et al., die eine cGMP-Konzentration von 9,2  $\mu\text{M}$  einsetzten [84]. Diese ist in Bezug auf einen  $EC_{50}$ -Wert von 18,1  $\mu\text{M}$  für cAMP und aufgrund der gezeigten niedrigen Stimulation mit cGMP zu gering. Zudem könnte die hohe Dissoziationsrate von cAMP von den GAF-Domänen, wie hier gezeigt wurde, die Durchführung solcher Bindungsstudien erschweren. Zumindest bestätigen die erhaltenen Daten die Vermutung von Soderling et al., dass der  $K_d$  für cGMP über 9  $\mu\text{M}$  liegen muß bzw. die Bindung eines anderen Moleküls mit höherer Affinität nicht auszuschließen ist [84].

Das verwendete Testsystem hat sich bereits neben der PDE2 auch mit anderen PDE GAF-Domänen, z.B. der PDE5 und PDE11, bewährt [14, 79, 108]. Wie bei diesen Chimären blieben auch bei der PDE10 GAF-CyaB1 AC und allen weiteren Konstrukten die kinetischen Eigenschaften der katalytischen Domäne der CyaB1 unverändert. Das zeigt zum einen, dass die erhaltenen Ergebnisse nicht aus einem veränderten Verhalten der CyaB1 AC resultieren, und zum anderen beeinflussen die PDE10 GAF-Domänen die AC nicht negativ. Allerdings muß dabei beachtet werden, dass die hier bestimmten Eigenschaften der PDE10 GAF-Domänen nicht vom PDE10-Holoenzym, sondern von einer künstlichen Chimäre stammen, in der eine Veränderung der Eigenschaften der GAF-Domänen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Betrachtet man die Ergebnisse anderer PDE-CyaB1-Chimären im Vergleich mit ihren Holoenzymen, ist dies aber eher unwahrscheinlich [14, 29, 30, 35, 79].

### 5.2. Die Bedeutung des NKFDE-Motivs der PDE10 GAF-Domänen

Wie einleitend bereits erwähnt, enthalten 12 der 14 in Säuger-PDEn vorhergesagten GAF-Domänen ein NK/RX<sub>n</sub>FX<sub>3</sub>DE-Motiv [17]. Durch die hohe Konservierung des NKFDE-Motivs in den GAF-haltigen Säuger-PDEn sowie den ACn CyaB1 und CyaB2 aus *Anabaena* wurde angenommen, dass dieses Motiv direkt an der Bindung cyclischer Nucleotide beteiligt ist. Dies wurde zunächst durch Mutationsstudien der PDE5 bestätigt [33, 34]. Zudem wirkte ein fehlendes NKFDE-Motiv zusammen mit einer nicht vorhandenen cGMP-Bindung der GAF-Domäne des Proteins YKG9 aus *Saccharomyces cerevisiae* bekräftigend auf dieses Argument [109]. Doch die Aufklärung der Kristallstruktur der PDE2A GAF-Domänen der Maus ergab, dass das NKFDE-Motiv entfernt von der cGMP-Bindungsstelle liegt und daher nicht direkt an der cGMP-Bindung

beteiligt ist [35]. Dennoch zeigt dieses Sequenzmotivs eine Bedeutung für die cGMP-Bindung, was in verschiedenen Mutationsstudien untersucht wurde. Eine Mutation der einzelnen ASn dieses Motivs zum Ala führte in der PDE2 und PDE5 zu einer stark verringerten cGMP-Affinität. Wahrscheinlich spielt es bei der Ausbildung und Stabilisierung der Bindungstasche eine Rolle [30, 79].

In der humanen PDE10A enthält nur die GAF-B ein vollständiges NKFDE-Motiv. Die GAF-A besitzt dagegen an dieser Stelle ein RHFHQ-Motiv, in dem nur das Phe erhalten geblieben ist (siehe Abb. 1-3). Daher wäre es denkbar, dass nur die GAF-B an der cAMP-Bindung beteiligt ist und der GAF-A eine andere Funktion zukommt. Zur Untersuchung der Rolle des NKFDE-Motivs bei der cyclischen Nucleotidbindung bzw. zur Bestimmung der cNMP-bindenden GAF-Domäne wird häufig das konservierte Asp im NKFDE-Motiv zum Ala mutiert [30, 79], da dieses an einer stabilisierenden Salzbrücke zusammen mit Lys beteiligt ist [30, 35, 36]. Diese Mutation wurde beim Asp-397 der GAF-B (PDE10A1) ebenfalls eingeführt. Die D397A-Mutation führte zu einer drastischen Reduktion der Basalaktivität um 99% sowie der cAMP-Affinität ( $EC_{50}=596 \mu\text{M}$ ) um das 33-fache im Vergleich zur nicht-mutierten Chimäre (siehe 4.1.2.1.). Diese Ergebnisse zeigen zum einen die Bedeutung des Asp-Restes des NKFDE-Motivs in der GAF-B der humanen PDE10 für die Bindung von cAMP und lassen zum anderen schlussfolgern, dass cAMP an die GAF-B der PDE10 bindet. Ein komplettes Abschalten der Aktivierung der CyaB1 AC durch cAMP konnte jedoch nicht erreicht werden, was die Beteiligung weiterer ASn oder Sequenzbereiche vermuten lässt.

Als nächster Schritt war die Funktion der GAF-A mit ihrem RHFHQ-Motiv von Interesse. Die Umwandlung dieser Sequenz in ein vollständiges NKFDE-Motiv führte zu keiner Änderung der Stimulation und nur zu einer geringfügig verringerten Affinität zu cAMP gegenüber der PDE10 GAF-CyaB1 AC. Nur die Basalaktivität wurde dabei stark reduziert (siehe 4.1.2.2.). Das deutet darauf hin, dass die GAF-A keinen direkten Beitrag zur Bindung von cAMP leistet. In Kombination zum vollständigen NKFDE in GAF-A wurde in GAF-B wieder das Asp-397 zum Ala mutiert. Diese Chimäre zeigte einen deutlichen Verlust der Stimulation mit cAMP und cGMP sowie eine starke Reduktion der cAMP-Affinität um das 37-fache im Vergleich zur nicht-mutierten Chimäre. Die Basalaktivität war um 96% zu dieser verringert (siehe 4.1.2.3.). Damit scheint die bereits oben erhaltene Erkenntnis bestätigt, dass der GAF-B mit ihrem NKFDE-Motiv eine Bedeutung bei der Bindung von cAMP zukommt. Die GAF-A könnte eher eine Funktion bei der Dimerisierung bzw. der Ausbildung der korrekten Raumstruktur des PDE10-Dimers besitzen wie dies bei der PDE2 der Fall ist. Dort ist ebenfalls die GAF-B die cyclische

Nucleotidbindende Domäne und die GAF-A ist für die Dimerisierung verantwortlich [35]. Die PDE10 GAF-B besitzt die größte AS-Sequenzidentität mit der PDE2 GAF-B im Vergleich zu den anderen GAF-Domänen der Säuger-PDEn. Sie könnten somit von einem gemeinsamen Vorläufergen stammen [17]. Ähnliche Eigenschaften zwischen beiden PDEn bezüglich Ligandenbindung und Dimerisierung wären daher möglich. Jedoch besteht ein gravierender Unterschied zwischen beiden: PDE2 besitzt cGMP und PDE10 cAMP als Ligand. Eine genaue Aufklärung der Verhältnisse bringt erst die Kristallisation der PDE10 GAF-Domänen.

Die Dimerisierung der PDE10 GAF-CyaB1 AC konnte in dieser Arbeit mittels einer Cross-Linking-Reaktion gezeigt werden. Dabei war die Dimerbildung unabhängig vom Vorhandensein von cAMP (siehe 4.1.1.11.). Man geht davon aus, dass die stabilisierenden Kräfte für die Dimerisierung N-terminal zur katalytischen Domäne gelegen sind [46]. Dass die Dimerisierung der PDE10 GAF-CyaB1 AC-Chimäre über die PDE10 GAF-Domänen erfolgt, ist recht wahrscheinlich, da Cross-Linking-Versuche mit der katalytischen Domäne CyaB1<sub>595-859</sub> allein keine Dimerisierung ergaben [94].

### 5.3. Die Rolle des PDE10 N-Terminus

Die Hauptisoformen der PDE10 im Menschen sind die PDE10A1 und die PDE10A2. Beide unterscheiden sich nur im Beginn ihrer N-Termini (siehe Abb. 1-7). Ab Leu-24 (PDE10A2) stimmen sie in ihrer AS-Sequenz überein [87, 88]. Zunächst wurden die PDE10 GAF-Domänen unabhängig von der N-terminalen Länge beider Formen durch Beginn mit der Konsensussequenz charakterisiert (siehe 4.1.1.). Dennoch war ein Einfluss der 13 (PDE10A1) bzw. 23 (PDE10A2) N-terminalen ASn auf die Affinität der GAF-Domänen und die Stimulation der katalytischen Aktivität der AC nicht vollständig auszuschließen. Daher wurden beide Isoformen kloniert und getestet. Bei beiden war keine Veränderung der Affinität für cAMP gegenüber dem Ausgangskonstrukt zu verzeichnen. Die Stimulation blieb mit dem PDE10A1 N-Terminus konstant. Der längere PDE10A2 N-Terminus verringerte die Stimulation um die Hälfte zum Ausgangskonstrukt und zur PDE10A1 GAF-CyaB1 AC. Diese Ergebnisse zeigen, dass die 13 bzw. 23 N-terminalen ASn keinen Einfluss auf die cAMP-Affinität der GAF-Domänen haben und damit das Konstrukt beginnend mit der Konsensussequenz für die Charakterisierung der PDE10 GAF-Domänen geeignet ist. Eine physiologische Bedeutung der leicht veränderten Stimulation mit dem PDE10A2 N-Terminus ist eher auszuschließen, da der Stimulationsfaktor stark von der Basalaktivität abhängt und damit schon geringe Schwankungen der Messwerte

einen Einfluss darauf haben können. Der Unterschied in der Stimulation der PDE10A2 GAF-CyaB1 AC im Vergleich zum Ausgangskonstrukt ist damit für eine eindeutige Aussage viel zu gering und daher eher zu vernachlässigen.

Bei der PDE11 führte ein Entfernen des 197 AS langen N-Terminus zur Zunahme der cGMP-Affinität [108]. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei der PDE5. Dort stieg ab einem verkürzten N-Terminus von 108 AS die Basalaktivität sowie die Affinität für cGMP an [79]. Ein vollständiges Entfernen des PDE10 N-Terminus bis zum G73 (PDE10A1) ergab keine Änderung der Affinität für cAMP sowie einen unwesentlichen Anstieg der Stimulation der AC um Faktor 1,7 (siehe 4.1.3.2.). Damit unterscheidet sich die PDE10 stark von den Verhältnissen in der PDE5 und 11. Mit Beginn des Konstrukts bei G73 war ein deutliches Absinken der Basalaktivität zu erkennen. Ein Fehlen des N-Terminus wirkt hemmend auf die katalytische Aktivität ohne cAMP, unterbindet aber nicht bei Anwesenheit von cAMP die Bindung an die GAF-B und die Stimulation der AC. Damit scheint er nicht die Ausbildung der Bindungstasche zu stören. Dies ähnelt der Mutation des RHFHQ-Motivs in der GAF-A zum NKFDE-Motiv. Es wäre daher möglich, dass dem N-Terminus eine unterstützende Funktion bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur der PDE10 bzw. der PDE10 GAF-Domänen zukommt. Einen so großen Einfluss wie bei der PDE5 oder PDE11 scheint der N-Terminus jedoch nicht zu haben, da sowohl mit ihm als auch ohne ihn eine cAMP-Bindung und Stimulation erfolgen kann. Dies könnte auch in seiner geringen Länge von 72 AS (PDE10A1) bzw. 82 AS (PDE10A2) begründet sein. Eine Kristallisation der GAF-Domänen mit dem vollständigen N-Terminus oder sogar des PDE10-Holoenzym würde Aufschluss über die genauen Wechselwirkungen bringen. Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung der Funktion des N-Terminus wären weitere spezifische N-terminale Verkürzungen.

#### 5.4. Chimären aus PDE5, PDE10 und CyaB1

Nachdem durch Dr. Tobias Kanacher gezeigt werden konnte, dass ein Ersetzen der Tandem-GAF-Domänen der CyaB1 aus *Anabaena* zusammen mit ihrem N-Terminus durch die entsprechenden Bereiche der PDE2 der Ratte funktionell möglich ist [14], stellte sich die Frage, ob auch zwei verschiedene GAF-Domänen aus unterschiedlichen Säuger-PDEn zusammen mit der katalytischen Domäne der CyaB1 eine funktionelle Einheit bilden. Mit dem Austausch der humanen PDE10A GAF-A durch die der humanen PDE5A1 konnte mit der CyaB1 AC als Reporterenzym ein funktionelles Konstrukt geschaffen werden (siehe Abb. 4-26I), welches

sowohl mit cAMP als auch mit cGMP stimulierbar war. Mit der PDE5 GAF-A wurde eine cGMP-bindende [110] und mit der PDE10 GAF-B eine cAMP-bindende GAF-Domäne verwendet, wie in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde. Allerdings bestand die Vermutung, dass die Stimulation durch cGMP mit Hilfe der PDE5 GAF-A steigt, was jedoch nicht der Fall war. Diese blieb in etwa gleich. Dagegen nahm die Affinität für cAMP zu, die Stimulation der katalytischen Domäne der AC aber um die Hälfte im Vergleich zum PDE10-Konstrukt ab (siehe 4.2.1.2.). Dies deutet auf veränderte Wechselwirkungen durch die PDE5 GAF-A hin.

Auch eine CyaB1-Chimäre bestehend aus dem N-Terminus und der GAF-A der humanen PDE5 sowie dem Linker und der GAF-B der humanen PDE10 (siehe Abb. 4-26II) ergab ein durch cAMP und cGMP stimulierbares Konstrukt, wobei auch bei diesem die Stimulation mit cAMP überwog. Der zusätzliche PDE5 N-Terminus hatte keinen Einfluss auf die cAMP-Affinität, jedoch wahrscheinlich auf die erhöhte Basalaktivität im Vergleich zum vorherigen Konstrukt. Er führte aber auch nicht zu einer erhöhten cGMP-Stimulation (siehe 4.2.1.2.).

Eine Mutation des Asp-397 zu Ala in der PDE10 GAF-B der PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (siehe Abb. 4-26III) führte zur drastischen Reduktion der cAMP-Affinität sowie zur Verringerung der Basalaktivität. Die Stimulation mit cGMP ging vollständig verloren und war mit cAMP stark vermindert (siehe 4.2.1.2.). Das zeigt, dass die cyclische Nucleotidbindung in dieser Chimäre über die GAF-B der PDE10 erfolgt, welche cAMP als Ligand besitzt. Trotzdem, dass die PDE5 GAF-A eine cGMP-bindende GAF-Domäne ist, scheint eine cGMP-Bindung an diese Domäne hier nicht zu erfolgen. Das bestätigte auch die Messung der spezifischen Aktivität bei gleichzeitiger Zugabe von cAMP und cGMP zur PDE5 N-Term. GAF-A-PDE10 Linker GAF-B-CyaB1 AC (siehe Abb. 4-26II), bei der keine erhöhte Gesamtstimulation zu erkennen war. Dagegen lag der Stimulationsfaktor im Bereich von cAMP. Auch eine steigende cGMP-Konzentration in Gegenwart einer konstanten cAMP-Menge führte zu keiner Zunahme der Stimulation. Bereits bei geringen cGMP-Konzentrationen wurde mit cAMP die maximale spezifische Aktivität erreicht (siehe 4.2.1.3.). Diese hohe cAMP-Affinität der Chimäre spiegelt auch der  $EC_{50}$  von 7  $\mu$ M wider. Damit zeigt sich, dass die Kombination der PDE5 GAF-A und der PDE10 GAF-B, unabhängig davon, welcher N-Terminus sich vor beiden Domänen befindet, eine vorrangig cAMP-bindende und stimulierbare CyaB1-Chimäre ergibt. In dieser Chimäre scheinen jedoch bezüglich Ligandenbindung und Aktivierung der AC nicht beide GAF-Domänen individuell zu wirken, sondern es zeigt sich eher eine Dominanz der PDE10 GAF-B, die aber bei Betrachtung der erhöhten cAMP-Affinität unter dem Einfluss der PDE5 GAF-A steht.

Entscheidend für die Funktionsfähigkeit dieser Chimäre scheint der Linker zwischen GAF-A und GAF-B zu sein. Ersetzt man den PDE10 Linker in Konstrukt II durch den der PDE5 (siehe Abb. 4-27IV), womit sich vor der PDE10 GAF-B nun ein fremder Linker befindet, verschwindet die Affinität für cAMP zusammen mit der Stimulierbarkeit des Konstrukts. Nur die Basalaktivität nimmt deutlich zu. Dabei ist wieder die Herkunft des N-Terminus unwesentlich. Denn auch ein Konstrukt mit dem PDE10 N-Terminus (siehe Abb. 4-27V) ist nicht durch cAMP oder cGMP stimulierbar. Es zeigt auch eine stark erhöhte Basalaktivität (siehe 4.2.1.2.), d.h. in beiden Konstrukten ist ohne cAMP oder cGMP eine Aktivität des katalytischen Zentrums vorhanden, doch eine Stimulation der katalytischen Aktivität der AC mit cAMP oder cGMP nicht möglich. Von Seiten der PDE10 könnte man diesen Effekt auf den vorhandenen PDE5 Linker zurückführen. Die fehlende Affinität und Stimulation könnte auf eine gestörte Faltung der beiden Chimären und eine Unterbrechung der Signalweiterleitung zur katalytischen Domäne hindeuten. Vergleicht man das Ganze mit der PDE5 GAF-CyaB1 AC, so führt ein Ersetzen der PDE5 GAF-B durch die PDE10 GAF-B in Konstrukt IV zu einem Verlust der cGMP-Affinität und Stimulierbarkeit der AC durch cGMP. Denkbar wäre hier eine gestörte Signalweiterleitung von der GAF-A zur katalytischen Domäne der AC durch die PDE10 GAF-B-Domäne.

Die Schlüsselrolle des Linkers für das Signalisieren über die GAF-Domänen zeigen auch zwei Chimären der Gruppe III, in denen der jeweilige Linker durch den der anderen PDE ersetzt wurde. Ein in die PDE10 eingeführter PDE5 Linker (siehe Abb. 4-29X) führt zu einer vollständigen Abschaffung der Stimulation und scheint sogar hemmend auf die katalytische Domäne zu wirken (siehe 4.2.3.). Als Ursache dafür könnte wie bereits oben diskutiert die gestörte Ausbildung der korrekten Raumstruktur und damit eine Störung der Signalweiterleitung oder sogar der Bindung von cAMP an die PDE10 GAF-B sein. Eine Beteiligung des PDE10 Linkers an der Dimerisierung der PDE10 GAF-Domänen wie bei der PDE2A der Maus wäre denkbar. Im Falle der PDE5, deren Linker durch den der PDE10 ersetzt wurde (siehe Abb. 4-29IX), zeigte sich ebenfalls keine bemerkenswerte Stimulation mehr (siehe 4.2.3.). In diesem Konstrukt könnte die Weiterleitung des Signals von der GAF-A über die GAF-B zur katalytischen Domäne durch den PDE10 Linker, wie bei Konstrukt IV durch die PDE10 GAF-B, gestört sein.

Die Chimären der Gruppe II (siehe 4.2.2.) beweisen durch ihre fehlende Stimulation über cAMP und cGMP, dass die cNMP-bindende GAF-Domäne der PDE5 die GAF-A bzw. der PDE10 die GAF-B ist. Ein Ersetzen der PDE10 GAF-B durch die der PDE5 (siehe Abb. 4-28VIII) führte zur deutlichen Reduktion der Basalaktivität sowie zur Verhinderung einer Stimulation durch

cAMP oder cGMP. Damit ist die PDE10 GAF-A, wie oben bereits bemerkt, nicht an der Ligandenbindung beteiligt. Auch das gegenteilige Konstrukt für die PDE5 (siehe Abb. 4-28VI) ergab, dass die PDE5 GAF-B keine cNMP-bindende Domäne ist, sondern die PDE5 GAF-A, was mit Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmt [110, 111]. Zudem deutet die um 68% (PDE5) bzw. um 91% (PDE10) gesenkte Basalaktivität bei beiden Konstrukten im Vergleich zum jeweiligen nicht-mutierten Konstrukt auf einen wichtigen Beitrag der bindenden GAF-Domänen zu intramolekularen Wechselwirkungen oder einer Konformationsänderung für die Aktivierung der katalytischen Domäne hin. Auch die Chimäre aus PDE10 N-Terminus und PDE10 GAF-A sowie aus PDE5 Linker und PDE5 GAF-B (siehe Abb. 4-28VII) zeigte ebenfalls keine Stimulation aufgrund der Kombination der nicht-bindenden GAF-Domänen von PDE5 und PDE10 in dieser Chimäre.

### 5.5. Die Kristallisation der Tandem-GAF-Domänen der PDE10

Für die PDE10 ist bisher nur die Kristallstruktur der katalytischen Domäne bekannt [50]. Eine Struktur der GAF-Domänen oder des Holoenzym konnte noch nicht gezeigt werden. Wie bereits betont, gibt erst die Kristallstruktur Aufschluss über die genauen Wechselwirkungen bei der Ligandenbindung und der Dimerisierung. Auch die Art und Weise der Dimerisierung der PDE10 GAF-Domänen, d.h. parallel oder antiparallel, könnte so geklärt werden. Zudem könnte die Struktur der PDE10 GAF-Domänen Aufklärung darüber bringen, ob die Unterschiede zwischen den beiden bekannten Kristallstrukturen der GAF-Domänen der PDE2A der Maus und der CyaB2 aus *Anabaena* evolutionär bedingt sind. So bilden die GAF-Domänen der PDE2A ein paralleles Dimer und die GAF-Domänen der CyaB2 ein antiparalleles Dimer (Abb. 5-1) [35, 36].

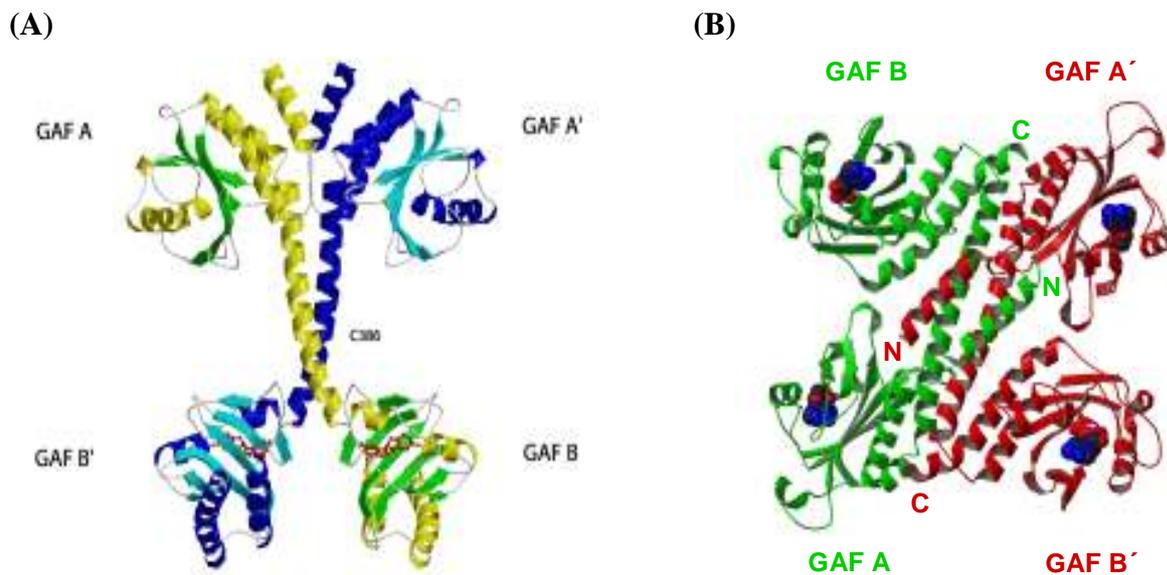


Abb. 5-1 Kristallstrukturen der GAF-Domänen der PDE2A der Maus und der CyaB2 aus *Anabaena*

(A) Kristallstruktur der GAF-Domänen der PDE2A der Maus mit gebundenem cGMP, Auflösung: 2,9 Å (aus [35]), (B) Kristallstruktur der GAF-Domänen der CyaB2 aus *Anabaena* mit gebundenem cAMP, Auflösung: 1,9 Å (nach [36]).

In der PDE2A erfolgt die Dimerisierung über den N-Terminus der GAF-A und die ersten sieben Windungen der Verbindungshelix zwischen GAF-A und GAF-B. Beide Monomere kreuzen sich an der Verbindungshelix und laufen nach einem Cys-Rest (Cys-386) auseinander, so dass die beiden GAF-B-Domänen räumlich keinen Kontakt haben. Zwischen den Cysteinen beider Monomere besteht eine Disulfidbrücke. An beide GAF-B-Domänen ist je ein cGMP-Molekül gebunden [35]. Im antiparallelen Dimer der CyaB2 ist cAMP an jede der vier GAF-Domänen gebunden. In jedem CyaB2-Monomer sind die beiden GAF-Domänen auf derselben Seite der

Verbindungshelix lokalisiert und wechselwirken über eine Salzbrücke miteinander. Die Dimerisierung erfolgt hier hauptsächlich durch die fast parallel zueinander verlaufenden Verbindungshelices beider Monomere sowie durch zwei N-terminale Helices der GAF-A- und einer C-terminalen Helix der GAF-B-Domänen [36]. Durch ihre Sequenzähnlichkeit zur PDE2A [17] sowie die GAF-B als Ligandenbindungsstelle und ihr gemeinsames Vorkommen in Säugern wäre eine Kristallstruktur der PDE10 GAF-Domänen ähnlich zu der der PDE2 denkbar.

Dies zeigt, welche Bedeutung einer Kristallstruktur der PDE10 GAF-Domänen zukommt. In dieser Arbeit wurden bei Kristallisationsversuchen zwar Kristalle mit den PDE10 GAF-Domänen sowohl mit als auch ohne Ligand erhalten, doch eine Aufklärung der Struktur der GAF-Domänen war mit diesen aufgrund der zum Teil fehlenden bzw. schlechten Auflösung nicht möglich. Es sind daher noch weitere Kristallisationsversuche notwendig. Zum einen ist das Potential des Kristallisationskonstruktes PDE10A1 V63 GAF-A/B mit und ohne His-Tag noch nicht vollständig ausgeschöpft. Es könnten mit Hilfe eines Pipettierroboters noch über 1000 Bedingungen getestet werden. Zum anderen wäre ein Versuch der Kristallisation ausgehend von dem Konstrukt PDE10A1 V63 GAF-A/B mit einem um wenige ASn verkürzten oder verlängerten N-Terminus im Bereich der AS V63 eine weitere Möglichkeit, um eventuell Kristalle mit einer besseren Auflösung zu erhalten. Denn wie sich gezeigt hatte, ließ sich das Konstrukt mit einem 10 ASn langen N-Terminus (ab V63) und der  $\alpha$ 1-Helix der GAF-A besser exprimieren und kristallisieren als das Konstrukt ohne N-Terminus und  $\alpha$ 1-Helix (ab D87). Der N-terminale Startpunkt ab V63 scheint in der richtigen Region zu liegen, ist jedoch bezüglich der Auflösung der Kristalle noch nicht ideal. Die  $\alpha$ 1-Helix scheint außerdem für die Kristallisation der PDE10 GAF-Domänen wichtig zu sein, wie das bei den Kristallisationskonstrukten von PDE2 und CyaB2 ebenfalls der Fall war (siehe Abb. 4-38). Ein weiterer Ansatzpunkt für die weitere Kristallisation könnte auch ein Konstrukt der PDE10 GAF-Domänen mit ihrem vollständigen N-Terminus sein. Vielleicht ist dieser, wie bereits angedeutet, für die Ausbildung der korrekten Raumstruktur der PDE10 GAF-Domänen notwendig. Zudem sollte auch weiterhin versucht werden, die GAF-Domänen in An- und Abwesenheit ihres Liganden cAMP zu kristallisieren. Durch die Kristallisation der PDE10 GAF-Domänen mit und ohne Ligand könnte man verstehen, welche Konformationsänderung das Protein durch die Bindung des Liganden erfährt. Aufgrund dessen, dass gebundenes cAMP bzw. cGMP an die GAF-Domänen der CyaB2 bzw. PDE2A fast vollständig in der Bindungstasche vergraben ist, geht man davon aus, dass es eine offene Konformation der GAF-Domänen vor der Bindung geben muss, welche dann durch die Bindung des Liganden in eine geschlossene Konformation übergeht [35].

## 5.6. Die physiologische Bedeutung der humanen PDE10

Die physiologische Rolle der PDE10A ist bisher unbekannt. Die Tatsache, dass der Ligand der PDE10 GAF-Domänen cAMP ist und es sich bei der PDE10 um eine dual-spezifische PDE handelt, die sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren kann, die cGMP-Hydrolyse aber durch cAMP hemmbar ist, schreibt dieser PDE eine Funktion bei der Regulation des zellulären cAMP- und cGMP-Spiegels zu [83].

Durch ihr reichliches Vorkommen im Putamen und im Nucleus caudatus des Gehirns könnte die PDE10 an der Kontrolle von Verhaltens- und motorischen Funktionen beteiligt sein [83, 89]. Seeger et al. konnten PDE10A immunhistochemisch im Nucleus caudatus, Nucleus accumbens und im olfaktorischen Tuberkel im Rattengehirn, speziell in den Medium Spiny-Neuronen des Striatums nachweisen. Der Neurotransmitter Dopamin bewirkt über den von diesen Neuronen exprimierten D1-Rezeptor die Stimulation einer Adenylatcyclase, die cAMP synthetisiert und somit zu einer Aktivierung der Proteinkinase A führt [89, 90]. Der Signalweg über den D1-Rezeptor ist an der Regulation von Verhaltensantworten und motorischen Abläufen beteiligt. Eine Regulation des cAMP-Spiegels an dieser Stelle durch die PDE10 wäre denkbar. Der andere von den Neuronen exprimierte Dopaminrezeptor-Subtyp, der D2-Rezeptor, ist in die Unterdrückung von Verhaltensantworten involviert. Die Bindung von Dopamin an den D2-Rezeptor führt zu einer Hemmung der Adenylatcyclase [83, 89].

Durch ihre mögliche Rolle bei dopaminergen Signalwegen könnte die PDE10 eine potentielle Bedeutung bei neurologischen Erkrankungen wie Parkinson oder Schizophrenie haben [10, 47, 112]. Zudem gibt es die Möglichkeit einer genetischen Verbindung zwischen der PDE10 und juvenilen Parkinson, da das PDE10A-Gen auf Chromosom 6q26 liegt und der Locus für juvenilen Parkinson 6q25-q27 ist [83, 87].

Auch eine Rolle der PDE10 bei der Spermatogenese wäre durch ihre Lokalisation in den Hoden denkbar [88]. Mittels spezifischer Antikörper konnte die PDE10 zusammen mit der PDE4D im Akrosom und dem Flagellum reifer Maus-Spermatozoen nachgewiesen werden. Damit könnte die PDE10 an der cAMP-Regulation bei der Kapazitation beteiligt sein [113].

Zur genauen Bestimmung der physiologischen Rolle der PDE10 sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Die Entwicklung selektiver Inhibitoren könnte dies erleichtern.

---

## 5.7. Offene Fragen und Ausblick

Trotz der vielfältigen Untersuchungen zur Funktion und Struktur der PDE10 GAF-Domänen in dieser Arbeit sind einige Fragen offen geblieben bzw. es haben sich neue Denkanstöße ergeben. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die PDE10 die einzige der fünf GAF-enthaltenden Säuger-PDEn, die cAMP als Ligand besitzt. Damit nimmt sie eine Sonderrolle gegenüber den anderen PDEn ein. Dies ist gerade bei der noch nicht gut verstandenen physiologischen Bedeutung ein interessanter Punkt, den es noch weiter zu erforschen gilt. Hilfreich könnten dabei selektive Inhibitoren sein. Doch diese sind für die PDE10 noch nicht bekannt bzw. veröffentlicht. Die Strukturaufklärung des PDE10-Holoenzym würde die Entwicklung von Inhibitoren erheblich erleichtern, da sowohl die GAF-Domänen als auch die katalytische Domäne als Angriffspunkte möglich sind. Zudem würde die Struktur des Holoenzym einen Einblick in die Signalweiterleitung von den GAF-Domänen zur katalytischen Domäne ermöglichen. Auch die Rolle des PDE10 N-Terminus könnte so besser geklärt werden, der aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse eine andere Funktion als bei der PDE5 oder PDE11 vermuten lässt.

Man könnte sich aber auch bezüglich des N-Terminus fragen, ob dieser aufgrund des fehlenden Effekts der Abspaltung auf die cAMP-Affinität der GAF-Domänen und die Stimulation der AC nicht sogar länger ist als hier mittels eines Alignments (siehe Abb. 4-38) bestimmt wurde. Dies würde allerdings im Widerspruch zu den anderen PDEn (PDE2, 5 und 11) stehen, die alle einen weitgehend identischen N-terminalen Startpunkt der GAF-A aufweisen und nach dem Alignment in Abb. 4-38 alle am Beginn der GAF-A die  $\alpha$ 1-Helix enthalten (siehe auch [35]), was mit dem in dieser Arbeit bestimmten Beginn der PDE10 GAF-A übereinstimmt. Eine Strukturvorhersage für die Sekundärstruktur der PDE10 mit den Programmen psipred, jnet und sspro<sup>6</sup> ergab eine  $\alpha$ -Helix von E57 bis L86 und von G89 bis K108 der PDE10A1. Diese könnten nach ihrer Position der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Helix nach Martinez et al. [35] entsprechen und würden damit einen weiter C-terminal gelegenen Startpunkt der PDE10 GAF-A und einen längeren N-Terminus ausschließen. Zudem scheint der Bereich ab G73 bezüglich der Basalaktivität des Enzyms in gewisser Weise empfindlich zu sein, da das Konstrukt ab V63 (siehe 4.3.2.), d.h. mit einem 10 ASn langen N-Terminus, eine höhere Basalaktivität als die beiden anderen verkürzten Konstrukte ab G73 (siehe 4.1.3.2.) bzw. ab D87 (siehe 4.3.1.) zeigte. Alles deutet darauf hin, dass der in dieser Arbeit bestimmte Beginn der PDE10 GAF-A im richtigen Sequenzabschnitt liegt. Dennoch lässt dieser

---

<sup>6</sup> Alle gemeinsam unter <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>

Punkt bezüglich der Funktion und der Eigenschaften des relativ kurzen PDE10 N-Terminus wie schon oben erwähnt noch einige Fragen offen bzw. erfordert weitere Untersuchungen.

Ein weiterer noch nicht untersuchter Punkt ist der Einfluss einer Phosphorylierung des Thr-16 der PDE10A2 auf die Stimulation der katalytischen Aktivität der AC und auf die Affinität der GAF-Domänen für cAMP im Vergleich zur PDE10A1, die eine solche Phosphorylierungsstelle im N-Terminus fehlt. Dies wäre im Zusammenhang mit der von Kotera et al. beschriebenen Änderung der subzellulären Lokalisation nach einer PKA-vermittelten Phosphorylierung interessant [91].

Auch die physiologische Bedeutung des über dem zellulären cAMP-Spiegel liegenden  $EC_{50}$ -Wertes bleibt noch zu klären. Ein Einfluss eines abspaltbaren N-Terminus scheint unwahrscheinlich. Interessant ist dabei die Frage nach anderen Regulationsmöglichkeiten der PDE10 zur Erhöhung der cAMP-Affinität.

Weiterhin bleibt die Struktur der PDE10 GAF-Domänen unbekannt. Diese könnte wie bereits angedeutet, Fragen über die Funktion der GAF-A beispielsweise bei der Dimerisierung beantworten. Auch die Bedeutung des Linkers, die möglicherweise ebenfalls in der Dimerisierung liegt, würde so geklärt werden können. Zudem sind die genauen Wechselwirkungen bei der Ligandenbindung und der Erzeugung der Spezifität für cAMP noch zu klären. Die für die cAMP-Spezifität der PDE10 GAF-Domänen verantwortlichen ASn sind bisher noch unbekannt. Durch Mutationsstudien der PDE2A GAF-B der Maus gelten F438, D439 und T488 als wichtige Reste für die Unterscheidung zwischen cAMP und cGMP [30]. Doch alle drei ASn sind in der PDE10 GAF-B konserviert. Es muß daher noch weitere, die Spezifität betreffende Reste geben, weil cAMP und nicht cGMP der Ligand der PDE10 GAF-Domänen ist. In der Struktur der PDE2A wurden insgesamt elf ASn bestimmt, die cGMP binden bzw. mit diesem wechselwirken [35]. In der PDE10 sind nur die drei ASn S424, Y481 und E512 der PDE2A der Maus von den insgesamt elf ASn nicht konserviert. Die Bedeutung dieser drei ASn für die Spezifität der PDE10 GAF-B gegenüber cAMP muß noch geklärt werden. Die Beteiligung weiterer Reste ist denkbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter Verwendung künstlicher Chimären aus Sequenzabschnitten von zwei oder drei verschiedenen Proteinen aus zwei unterschiedlichen Organismen erhalten. Dies muß beim Versuch der Übertragung dieser Daten auf das native Holoenzym berücksichtigt werden. Die Übereinstimmung mit den Verhältnissen *in vivo* muß erst noch bestätigt werden. Dennoch geben die hier gewonnenen Erkenntnisse zumindest einen Anhaltspunkt für die Richtung der weiteren Forschung vor.

## 6. Zusammenfassung

Der Ligand der PDE10A GAF-Domänen war vor dieser Arbeit noch unbekannt. Durch die Erzeugung einer funktionellen Chimäre aus dem N-Terminus und den beiden GAF-Domänen der humanen PDE10A sowie der PAS- und katalytischen Domäne der Adenylatcyclase CyaB1 aus *Anabaena* war es möglich, cAMP als Ligand des PDE10 GAF-Tandems zu bestimmen. Durch dieses Testsystem war eine Trennung von Ligand und Substrat der PDE möglich. Als ligandenbindende Domäne konnte die GAF-B der PDE10 bestimmt werden. Eine cAMP-Bindung an die GAF-B erfolgte mit einem EC<sub>50</sub> von 18 µM, der über der zellulären cAMP-Konzentration liegt. Eine Stimulation der katalytischen Aktivität der AC mit cAMP war um einen Faktor von 15,5 möglich. cGMP dagegen stimulierte nur vierfach. Eine Veränderung der Affinität für cAMP mit den N-Termini der beiden humanen PDE10-Hauptformen PDE10A1 und PDE10A2 zeigte sich nicht. Für die GAF-A wurde keine cAMP- oder cGMP-bindende Funktion gefunden. Eine Bedeutung dieser bei der Dimerisierung ist wahrscheinlich. Ein Entfernen des relativ kurzen PDE10 N-Terminus zeigte keinen Einfluss auf die cAMP-Affinität und unterscheidet sich damit deutlich von den Verhältnissen in der PDE5 oder PDE11.

Die Kombination der GAF-A der humanen PDE5A1 mit der GAF-B der humanen PDE10A ist unter Erzeugung einer funktionsfähigen Chimäre mit der CyaB1 AC als Reporterenzym gelungen. Damit konnte eine cGMP-bindende GAF-Domäne mit einer cAMP-bindenden GAF-Domäne gekoppelt werden. Dabei war es irrelevant, welcher N-Terminus sich vor dem GAF-Tandem befand. Mit beiden N-Termini erhielt man funktionsfähige Chimären. Allerdings erfolgte die Stimulation der katalytischen Aktivität der AC vorrangig über cAMP und nicht wie vermutet, verstärkt über cGMP. In diesen Chimären ist die PDE10 GAF-B offensichtlich die ligandenbindende Domäne. Damit scheint die PDE5 GAF-A in gewisser Weise die Funktion der GAF-A der PDE10 zu übernehmen. Dennoch nicht ohne einen gewissen Einfluss auf die Affinität und Stimulation mit cAMP, denn die Affinität erhöhte sich auf 7 µM cAMP unter Verringerung der maximalen Stimulation. Ein Ersetzen des PDE10 Linkers in dieser PDE5-PDE10-CyaB1-Chimäre führte zum Verlust der Stimulation der katalytischen Aktivität der AC mit cAMP und cGMP. Damit nimmt der Linker eine Schlüsselrolle beim Signalisieren über die GAF-Domänen ein. Chimären aus den nicht-bindenden GAF-Domänen der PDE5 und PDE10 waren wie erwartet nicht stimulierbar.

Eine Kristallisation des PDE10 GAF-Tandems war mit und ohne cAMP möglich. Allerdings konnte mit den erhaltenen Kristallen nicht die Struktur der GAF-Domänen aufgeklärt werden.

## Anhang

A	Humane PDE10A .....	140
	A-1 Kinetische Daten aus der Literatur .....	140
	A-2 Bereits veröffentlichte Daten der PDE10 GAF-CyaB1 AC mit D397A-Mutante [27] .....	140
B	Sequenzen .....	141
	B-1 Humane PDE10A1 .....	141
	B-2 Humane PDE10A2 .....	144
	B-3 Humane PDE5A1: N-Terminus mit GAF-A und -B .....	144
	B-4 CyaB1 .....	147

## A Humane PDE10A

## A-1 Kinetische Daten aus der Literatur

Isoform	cAMP	cGMP	Inhibitoren	Ref.
hsPDE10A1	$K_m = 0,26 \pm 0,05 \mu\text{M}$ $v_{\text{max}} = 0,63 \pm 0,12$ pmol/min/ $\mu\text{g}$	$K_m = 7,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ $v_{\text{max}} = 1,4 \pm 0,08$ pmol/min/ $\mu\text{g}$	IBMX = 17 $\mu\text{M}$ (cAMP) Zaprinast = 22 $\mu\text{M}$ (cAMP) Dipyridamol = 1,2 $\mu\text{M}$ (cAMP) cGMP = 14 $\mu\text{M}$ (cAMP) cAMP = 0,39 $\mu\text{M}$ (cGMP)	[83]
hsPDE10A1	$K_m = 0,28 \mu\text{M}$	$K_m = 14 \mu\text{M}$		[90]
hsPDE10A2	$K_m = 0,22 \mu\text{M}$	$K_m = 13 \mu\text{M}$		

## A-2 Bereits veröffentlichte Daten der PDE10 GAF-CyaB1 AC mit D397A-Mutante [27]

PDE10 GAF-CyaB1 AC	
<b>Dosis-Wirkung</b>	Basalaktivität: $45 \pm 3,9$ nmol cAMP/mg·min max. Stimulation mit 300 $\mu\text{M}$ cAMP: 9,2 $\pm$ 0,6-fach max. Stimulation mit 3 mM cGMP: 3 $\pm$ 0,4-fach EC <sub>50</sub> : $19,8 \pm 1,6 \mu\text{M}$ Hill-Koeffizient: 1,0
<b>Kinetik</b> (Lineweaver-Burk)	unstimuliert: $K_m = 27 \pm 0,8 \mu\text{M}$ $v_{\text{max}} = 84,5 \pm 15$ nmol cAMP/mg·min stimuliert: $K_m = 30 \pm 0,7 \mu\text{M}$ $v_{\text{max}} = 859 \pm 146$ nmol cAMP/mg·min
PDE10 D397A GAF-CyaB1 AC	
<b>Dosis-Wirkung</b>	Basalaktivität: $1,5 \pm 0,1$ nmol cAMP/mg·min max. Stimulation mit 1 mM cAMP: 10,7 $\pm$ 0,4-fach max. Stimulation mit 3 mM cGMP: 1,1 $\pm$ 0,1-fach EC <sub>50</sub> : $268 \pm 4,2 \mu\text{M}$ Hill-Koeffizient: 0,3
<b>Kinetik</b> (Lineweaver-Burk)	unstimuliert: $K_m = 18,3 \pm 4,2 \mu\text{M}$ $v_{\text{max}} = 1,6 \pm 0,2$ nmol cAMP/mg·min stimuliert: $K_m = 9,9 \pm 1,6 \mu\text{M}$ $v_{\text{max}} = 8,2 \pm 0,1$ nmol cAMP/mg·min

## B Sequenzen

*B-1 Humane PDE10A1*

gi: 4894715

Acc. nb.: AAD32595

GeneID (PDE10A): 10846

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
ATG	AGG	ATA	GAA	GAG	AGG	AAA	TCC	CAA	CAT	TTA	ACA	GGT	TTG	42	
M	R	I	E	E	R	K	S	Q	H	L	T	G	L		14
ACA	GAT	GAA	AAA	GTG	AAG	GCA	TAT	CTT	TCT	CTT	CAC	CCC	CAG	84	
T	D	E	K	V	K	A	Y	L	S	L	H	P	Q		28
GTA	TTA	GAT	GAA	TTT	GTA	TCT	GAA	AGT	GTT	AGT	GCA	GAG	ACA	126	
V	L	D	E	F	V	S	E	S	V	S	A	E	T		42
GTA	GAG	AAA	TGG	CTG	AAG	AGG	AAG	AAC	AAC	AAA	TCA	GAA	GAT	168	
V	E	K	W	L	K	R	K	N	N	K	S	E	D		56
GAA	TCG	GCT	CCT	AAG	GAA	GTC	AGC	AGG	TAC	CAA	GAT	ACG	AAT	210	
E	S	A	P	K	E	V	S	R	Y	Q	D	T	N		70
ATG	CAG	GGA	GTT	GTA	TAT	GAA	CTA	AAC	AGC	TAT	ATA	GAA	CAA	252	
M	Q	G	V	V	Y	E	L	N	S	Y	I	E	Q		84
CGG	TTG	GAC	ACA	GGA	GGA	GAC	AAC	CAG	CTA	CTC	CTC	TAT	GAA	294	
R	L	D	T	G	G	D	N	Q	L	L	L	Y	E		98
CTG	AGC	AGC	ATC	ATT	AAA	ATA	GCC	ACA	AAA	GCC	GAT	GGA	TTT	336	
L	S	S	I	I	K	I	A	T	K	A	D	G	F		112
GCA	CTG	TAT	TTC	CTT	GGA	GAG	TGC	AAT	AAT	AGC	CTG	TGT	ATA	378	
A	L	Y	F	L	G	E	C	N	N	S	L	C	I		126
TTC	ACG	CCA	CCT	GGG	ATA	AAG	GAA	GGA	AAA	CCC	CGC	CTC	ATC	420	
F	T	P	P	G	I	K	E	G	K	P	R	L	I		140
CCT	GCT	GGG	CCC	ATC	ACT	ACG	GGC	ACC	ACC	GTC	TCT	GCT	TAT	462	
P	A	G	P	I	T	Q	G	T	T	V	S	A	Y		154
GTG	GCC	AAG	TCC	AGG	AAA	ACA	CTG	CTA	GTA	GAA	GAC	ATC	CTT	504	
V	A	K	S	R	K	T	L	L	V	E	D	I	L		168
GGA	GAT	GAA	CGA	TTT	CCA	AGA	GGT	ACT	GGA	CTG	GAA	TCA	GGG	546	
G	D	E	R	F	P	R	G	T	G	L	E	S	G		182
ACT	CGT	ATC	CAG	TCT	GTT	CTT	TGC	TTA	CCA	ATT	GTC	ACT	GCA	588	
T	R	I	Q	S	V	L	C	L	P	I	V	T	A		196
ATT	GGT	GAC	TTG	ATT	GGT	ATT	CTC	GAG	CTG	TAT	CGG	CAC	TGG	630	
I	G	D	L	I	G	I	L	E	L	Y	R	H	W		210

## Anhang

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
GGC	AAA	GAA	GCC	TTC	TGT	CTT	AGT	CAC	CAG	GAG	GTT	GCA	ACA	672	
G	K	E	A	F	C	L	S	H	Q	E	V	A	T		224
GCA	AAT	CTT	GCC	TGG	GCT	TCA	GTA	GCA	ATA	CAT	CAG	GTG	CAG	714	
A	N	L	A	W	A	S	V	A	I	H	Q	V	Q		238
GTA	TGC	AGA	GGC	CTT	GCC	AAA	CAG	ACA	GAA	TTG	AAT	GAC	TTC	756	
V	C	R	G	L	A	K	Q	T	E	L	N	D	F		252
CTA	CTC	GAC	GTA	TCA	AAA	ACA	TAT	TTT	GAT	AAC	ATA	GTT	GCA	798	
L	L	D	V	S	K	T	Y	F	D	N	I	V	A		266
ATA	GAT	TCT	CTA	CTT	GAA	CAC	ATA	ATG	ATA	TAT	GCA	AAA	AAC	840	
I	D	S	L	L	E	H	I	M	I	Y	A	K	N		280
CTG	GTG	AAT	GCC	GAT	CGT	TGT	GCA	CTT	TTC	CAG	GTG	GAC	CAT	882	
L	V	N	A	D	R	C	A	L	F	Q	V	D	H		294
AAG	AAC	AAG	GAG	TTA	TAT	TCA	GAC	CTT	TTT	GAT	ATT	GGA	GAG	924	
K	N	K	E	L	Y	S	D	L	F	D	I	G	E		308
GAA	AAG	GAA	GGA	AAA	CCT	GTC	TTC	AAG	AAG	ACC	AAA	GAG	ATA	966	
E	K	E	G	K	P	V	F	K	K	T	K	E	I		322
AGA	TTT	TCA	ATT	GAG	AAA	GGA	ATT	GCT	GGC	CAA	GTA	GCA	AGA	1008	
R	F	S	I	E	K	G	I	A	G	Q	V	A	R		336
ACA	GGG	GAA	GTC	CTG	AAC	ATT	CCA	GAT	GCC	TAT	GCA	GAC	CCA	1050	
T	G	E	V	L	N	I	P	D	A	Y	A	D	P		350
CGC	TTT	AAC	AGA	GAA	GTA	GAC	TTG	TAC	ACA	GGC	TAC	ACC	ACG	1092	
R	F	N	R	E	V	D	L	Y	T	G	Y	T	T		364
CGG	AAC	ATC	CTG	TGC	ATG	CCC	ATC	GTC	AGC	CGA	GGC	AGC	GTG	1134	
R	N	I	L	C	M	P	I	V	S	R	G	S	V		378
ATA	GGT	GTG	GTG	CAG	ATG	GTC	AAC	AAA	ATC	AGT	GGC	AGT	GCC	1176	
I	G	V	V	Q	M	V	N	K	I	I	G	S	A		392
TTC	TCT	AAA	ACA	GAT	GAA	AAC	AAC	TTC	AAA	ATG	TTT	GCC	GTC	1218	
F	S	K	T	D	E	N	N	F	K	M	F	A	V		406
TTT	TGT	GCT	TTA	GCC	TTA	CAC	TGT	GCT	AAT	ATG	TAT	CAT	AGA	1260	
F	C	A	L	A	L	H	C	A	N	M	Y	H	R		420
ATT	CGC	CAC	TCA	GAG	TGC	ATT	TAC	CGG	GTA	ACG	ATG	GAA	AAG	1302	
I	R	H	S	E	C	I	Y	R	V	T	M	E	K		434
CTG	TCC	TAC	CAT	AGC	ATT	TGT	ACT	TCA	GAA	GAG	TGG	CAA	GGT	1344	
L	S	Y	H	S	I	C	T	S	E	E	W	Q	G		448
CTC	ATG	CAA	TTC	ACC	CTT	CCC	GTG	CGT	CTC	TGC	AAA	GAA	ATT	1386	
L	M	Q	F	T	L	P	V	R	L	C	K	E	I		462

## Anhang

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
GAA	TTA	TTC	CAC	TTT	GAC	ATT	GGT	CCT	TTT	GAA	AAC	ATG	TGG	1428	476
E	L	F	H	F	D	I	G	P	F	E	N	M	W		
CCT	GGA	ATT	TTT	GTC	TAC	ATG	GTT	CAT	CGG	TCC	TGT	GGG	ACA	1470	490
P	G	I	F	V	Y	M	V	H	R	S	C	G	T		
TCC	TGC	TTT	GAG	CTT	GAA	AAG	TTG	TGT	CGT	TTT	ATT	ATG	TCT	1512	504
S	C	F	E	L	E	K	L	C	R	F	I	M	S		
GTG	AAG	AAG	AAC	TAT	CGG	CGG	GTT	CCT	TAT	CAC	AAC	TGG	AAG	1554	518
V	K	K	N	Y	R	R	V	P	Y	H	N	W	K		
CAT	GCG	GTC	ACT	GTA	GCA	CAC	TGC	ATG	TAT	GCC	ATA	CTT	CAG	1596	532
H	A	V	T	V	A	H	C	M	Y	A	I	L	Q		
AAC	AAT	CAC	ACG	CTT	TTC	ACA	GAC	CTT	GAG	CGC	AAA	GGA	CTG	1638	546
N	N	H	T	L	F	T	D	L	E	R	K	G	L		
CTG	ATT	GCG	TGT	CTG	TGT	CAT	GAC	CTG	GAC	CAC	AGG	GGC	TTC	1680	560
L	I	A	C	L	C	H	D	L	D	H	R	G	F		
AGT	AAC	AGC	TAC	CTG	CAG	AAG	TTC	GAC	CAC	CCT	CTG	GCC	GCT	1722	574
S	N	S	Y	L	Q	K	F	D	H	P	L	A	A		
CTC	TAC	TCC	ACT	TCC	ACC	ATG	GAG	CAG	CAC	CAC	TTC	TCC	CAG	1764	588
L	Y	S	T	S	T	M	E	Q	H	H	F	S	Q		
ACT	GTG	TCC	ATC	CTC	CAG	TTG	GAA	GGG	CAC	AAT	ATC	TTC	TCC	1806	602
T	V	S	I	L	Q	L	E	G	H	N	I	F	S		
ACT	CTG	AGC	TCC	AGT	GAA	TAT	GAG	CAG	GTG	CTT	GAG	ATC	ATC	1848	616
T	L	S	S	S	E	Y	E	Q	V	L	E	I	I		
CGC	AAA	GCC	ATC	ATT	GCC	ACA	GAC	CTT	GCT	TTA	TAC	TTT	GGA	1890	630
R	K	A	I	I	A	T	D	L	A	L	Y	F	G		
AAC	AGG	AAG	CAG	TTG	GAA	GAG	ATG	TAC	CAG	ACC	GGA	TCA	CTA	1932	644
N	R	K	Q	L	E	E	M	Y	Q	T	G	S	L		
AAC	CTT	AAT	AAT	CAA	TCA	CAT	AGA	GAC	CGT	GTA	ATT	GGT	TTG	1974	658
N	L	N	N	Q	S	H	R	D	R	V	I	G	L		
ATG	ATG	ACT	GCC	TGT	GAC	CTT	TGT	TCT	GTG	ACA	AAA	CTG	TGG	2016	672
M	M	T	A	C	D	L	C	S	V	T	K	L	W		
CCC	GTT	ACA	AAA	TTG	ACG	GCA	AAT	GAT	ATA	TAT	GCA	GAA	TTC	2058	686
P	V	T	K	L	T	A	N	D	I	Y	A	E	F		
TGG	GCT	GAG	GGT	GAT	GAA	ATG	AAG	AAA	TTG	GGA	ATA	CAG	CCT	2100	700
W	A	E	G	D	E	M	K	K	L	G	I	Q	P		
ATT	CCT	ATG	ATG	GAC	AGA	GAC	AAG	AAG	GAT	GAA	GTC	CCC	CAA	2142	714
I	P	M	M	D	R	D	K	K	D	E	V	P	Q		

## Anhang

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
GGC	CAG	CTT	GGG	TTC	TAC	AAT	GCC	GTG	GCC	ATT	CCC	TGC	TAT	2184	
G	Q	L	G	F	Y	N	A	V	A	I	P	C	Y		728
ACA	ACC	CTT	ACC	CAG	ATC	CTC	CCT	CCC	ACG	GAG	CCT	CTT	CTG	2226	
T	T	L	T	Q	I	L	P	P	T	E	P	L	L		742
AAA	GCA	TGC	AGG	GAT	AAT	CTC	AGT	CAG	TGG	GAG	AAG	GTG	ATT	2268	
K	A	C	R	D	N	L	S	Q	W	E	K	V	I		756
CGA	GGG	GAG	GAG	ACT	GCA	ACC	TGG	ATT	TCA	TCC	CCA	TCC	GTG	2310	
R	G	E	E	T	A	T	W	I	S	S	P	S	V		770
GCT	CAG	AAG	GCA	GCT	GCA	TCT	GAA	GAT	TGA					2340	
A	Q	K	A	A	A	S	E	D	.						779

### *B-2 Humane PDE10A2*

gi: 5902441

Acc. nb.: AB026816

GeneID (PDE10A): 10846

Gezeigt ist die Sequenz bis zur Übereinstimmung mit der PDE10A1 (ab LTDEKV).

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
ATG	GAA	GAT	GGA	CCT	TCT	AAT	AAT	GCG	AGC	TGC	TTC	CGA	AGG	42	
M	E	D	G	P	S	N	N	A	S	C	F	R	R		14
CTG	ACC	GAG	TGC	TTC	CTG	AGC	CCC	AGT						69	
L	T	E	C	F	L	S	P	S							23

### *B-3 Humane PDE5A1: N-Terminus mit GAF-A und -B*

gi: 61744434

Acc. nb.: NM\_001083

GeneID (PDE5A): 8654

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
ATG	GAG	CGG	GCC	GGC	CCC	AGC	TTC	GGG	CAG	CAG	CGA	CAG	CAG	42	
M	E	R	A	G	P	S	F	G	Q	Q	R	Q	Q		14
CAG	CAG	CCC	CAG	CAG	CAG	AAG	CAG	CAG	CAG	AGG	GAT	CAG	GAC	84	
Q	Q	P	Q	Q	Q	K	Q	Q	Q	R	D	Q	D		28
TCG	GTC	GAA	GCA	TGG	CTG	GAC	GAT	CAC	TGG	GAC	TTT	ACC	TTC	126	
S	V	E	A	W	L	D	D	H	W	D	F	T	F		42
TCA	TAC	TTT	GTT	AGA	AAA	GCC	ACC	AGA	GAA	ATG	GTC	AAT	GCA	168	
S	Y	F	V	R	K	A	T	R	E	M	V	N	A		56

## Anhang

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
TGG	TTT	GCT	GAG	AGA	GTT	CAC	ACC	ATC	CCT	GTG	TGC	AAG	GAA	210	70
W	F	A	E	R	V	H	T	I	P	V	C	K	E		
GGT	ATC	AGA	GGC	CAC	ACC	GAA	TCT	TGC	TCT	TGT	CCC	TTG	CAG	252	84
G	I	R	G	H	T	E	S	C	S	C	P	L	Q		
CAG	AGT	CCT	CGT	GCA	GAT	AAC	AGT	GTC	CCT	GGA	ACA	CCA	ACC	294	98
Q	S	P	R	A	D	N	S	V	P	G	T	P	T		
AGG	AAA	ATC	TCT	GCC	TCT	GAA	TTT	GAC	CGG	CCT	CTT	AGA	CCC	336	112
R	K	I	S	A	S	E	F	D	R	P	L	R	P		
ATT	GTT	GTC	AAG	GAT	TCT	GAG	GGA	ACT	GTG	AGC	TTC	CTC	TCT	378	126
I	V	V	K	D	S	E	G	T	V	S	F	L	S		
GAC	TCA	GAA	AAG	AAG	GAA	CAG	ATG	CCT	CTA	ACC	CCT	CCA	AGG	420	140
D	S	E	K	K	E	Q	M	P	L	T	P	P	R		
TTT	GAT	CAT	GAT	GAA	GGG	GAC	CAG	TGC	TCA	AGA	CTC	TTG	GAA	462	154
F	D	H	D	R	G	D	Q	C	S	R	L	L	E		
TTA	GTG	AAG	GAT	ATT	TCT	AGT	CAT	TTG	GAT	GTC	ACA	GCC	TTA	504	168
L	V	K	D	I	S	S	H	L	D	V	T	A	L		
TGT	CAC	AAA	ATT	TTC	TTG	CAT	ATC	CAT	GGA	CTG	ATA	TCT	GCT	546	182
C	H	K	I	F	L	H	I	H	G	L	I	S	A		
GAC	CGC	TAT	TCC	CTG	TTC	CTT	GTC	TGT	GAA	GAC	AGC	TCC	AAT	588	196
D	R	Y	S	L	F	L	V	C	E	D	S	S	N		
GAC	AAG	TTT	CTT	ATC	AGC	CGC	CTC	TTT	GAT	GTT	GCT	GAA	GGT	630	210
D	K	F	L	I	S	R	L	F	D	V	A	E	G		
TCA	ACA	CTG	GAA	GAA	GTT	TCA	AAT	AAC	TGT	ATC	CGC	TTA	GAA	672	224
S	T	L	E	E	V	S	N	N	C	I	R	L	E		
TGG	AAC	AAA	GGC	ATT	GTG	GGA	CAT	GTG	GCA	GCG	CTT	GGT	GAG	714	238
W	N	K	G	I	V	G	H	V	A	A	L	G	E		
CCC	TTG	AAC	ATC	AAA	GAT	GCA	TAT	GAG	GAT	CCT	CGG	TTC	AAT	756	252
P	L	N	I	K	D	A	Y	E	D	P	R	F	N		
GCA	GAA	GTT	GAC	CAA	ATT	ACA	GGC	TAC	AAG	ACA	CAA	AGC	ATT	798	266
A	E	V	D	Q	I	T	G	Y	K	T	Q	S	I		
CTT	TGT	ATG	CCA	ATT	AAG	AAT	CAT	AGG	GAA	GAG	GTT	GTT	GGT	840	280
L	C	M	P	I	K	N	H	R	E	E	V	V	G		
GTA	GCC	CAG	GCC	ATC	AAC	AAG	AAA	TCA	GGA	AAC	GGT	GGG	ACA	882	294
V	A	Q	A	I	N	K	K	S	G	N	G	G	T		
TTT	ACT	GAA	AAA	GAT	GAA	AAG	GAC	TTT	GCT	GCT	TAT	TTG	GCA	924	308
F	T	E	K	D	E	K	D	F	A	A	Y	L	A		

## Anhang

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
TTT	TGT	GGT	ATT	GTT	CTT	CAT	AAT	GCT	CAG	CTC	TAT	GAG	ACT	966	322
F	C	G	I	V	L	H	N	A	Q	L	Y	E	T		
TCA	CTG	CTG	GAG	AAC	AAG	AGA	AAT	CAG	GTG	CTG	CTT	GAC	CTT	1008	336
S	L	L	E	N	K	R	N	Q	V	L	L	D	L		
GCT	AGT	TTA	ATT	TTT	GAA	GAA	CAA	CAA	TCA	TTA	GAA	GTA	ATT	1050	350
A	S	L	I	F	E	E	Q	Q	S	L	E	V	I		
TTG	AAG	AAA	ATA	GCT	GCC	ACT	ATT	ATC	TCT	TTC	ATG	CAA	GTG	1092	364
L	K	K	I	A	A	T	I	I	S	F	M	Q	V		
CAG	AAA	TGC	ACC	ATT	TTC	ATA	GTG	GAT	GAA	GAT	TGC	TCC	GAT	1134	378
Q	K	C	T	I	F	I	V	D	E	D	C	S	D		
TCT	TTT	TCT	AGT	GTG	TTT	CAC	ATG	GAG	TGT	GAG	GAA	TTA	GAA	1176	392
S	F	S	S	V	F	H	M	E	C	E	E	L	E		
AAA	TCA	TCT	GAT	ACA	TTA	ACA	AGG	GAA	CAT	GAT	GCA	AAC	AAA	1218	406
K	S	S	D	T	L	T	R	E	H	D	A	N	K		
ATC	AAT	TAC	ATG	TAT	GCT	CAG	TAT	GTC	AAA	AAT	ACT	ATG	GAA	1260	420
I	N	Y	M	Y	A	Q	Y	V	K	N	T	M	E		
CCA	CTT	AAT	ATC	CCA	GAT	GTC	AGT	AAG	GAT	AAA	AGA	TTT	CCC	1302	434
P	L	N	I	P	D	V	S	K	D	K	R	F	P		
TGG	ACA	ACT	GAA	AAT	ACA	GGA	AAT	GTA	AAC	CAG	CAG	TGC	ATT	1344	448
W	T	T	E	N	T	G	N	V	N	Q	Q	C	I		
AGA	AGT	TTG	CTT	TGT	ACA	CCT	ATA	AAA	AAT	GGA	AAG	AAG	AAT	1386	462
R	S	L	L	C	T	P	I	K	N	G	K	K	N		
AAA	GTT	ATA	GGG	GTT	TGC	CAA	CTT	GTT	AAT	AAG	ATG	GAG	GAG	1428	476
K	V	I	G	V	C	Q	L	V	N	K	M	E	E		
AAT	ACT	GGC	AAG	GTT	AAG	CCT	TTC	AAC	CGA	AAT	GAC	GAA	CAG	1470	490
N	T	G	K	V	K	P	F	N	R	N	D	E	Q		
TTT	CTG	GAA	GCT	TTT	GTC	ATC	TTT	TGT	GGC	TTG	GGG	ATC	CAG	1512	504
F	L	E	A	F	V	I	F	C	Q	L	G	I	Q		
AAC	ACG	CAG	ATG	TAT	GAA	GCA	GTG	GAG						1539	513
N	T	Q	M	Y	E	A	V	E							

*B-4 CyaB1*

gi: 15553049

Acc. nb.: D89623

GeneID (CyaB1): 1105863

														bp	AS
ATG	ACT	CTT	CCC	AAT	CCT	GGT	AGC	GTT	TTG	GCT	TCG	TTA	ACA	42	14
M	T	L	P	N	P	G	S	V	L	A	S	L	T		
GAA	CTG	ACT	CAA	GTT	AAT	CGT	ACC	CAC	GCT	TTA	TTG	CGT	CGG	84	28
E	L	T	Q	V	N	R	T	H	A	L	L	R	R		
GTC	AAA	GAC	CTT	TCT	GTT	AAC	GAA	TTT	GTT	TGC	TTG	CTA	GAC	126	42
V	K	D	L	S	V	N	E	F	V	C	L	L	D		
TTT	ATC	ACT	GCC	GAA	TTC	GAA	CAA	TTT	CTC	AGA	GCA	ATT	GAA	168	56
F	I	T	A	E	F	E	Q	F	L	R	A	I	E		
CTC	ATT	AAT	AAT	GAA	GCC	CTA	GAA	AAT	ATG	TTG	GAG	AAA	GTG	210	70
L	I	N	N	E	A	L	E	N	M	L	E	K	V		
TTG	GAA	GCA	ATT	ACA	CTG	AAA	ATC	GGT	CAA	ATT	CTC	CAA	GCA	252	84
L	E	A	I	T	L	K	I	G	Q	I	L	Q	A		
GAA	CAT	ACA	GCC	ATT	TTC	TTA	GTT	GAC	TAT	GAT	AAA	TGT	CAA	294	98
E	H	T	A	I	F	L	V	D	Y	D	K	C	Q		
TTA	TGG	TCA	AAA	GTA	CCC	CAA	GAT	AAT	GGG	CAG	AAA	TTT	TTA	336	112
L	W	S	K	V	P	Q	D	N	G	Q	K	F	L		
GAA	ATT	CGT	ACT	CCC	ATT	ACT	GTA	GGA	ATT	CCT	GGT	CAT	GTT	378	126
E	I	R	T	P	I	T	V	G	I	P	G	H	V		
GCT	AGT	ACA	GGT	CAA	TAT	TTA	AAT	ATC	TCA	GAA	ACT	GCT	ACT	420	140
A	S	T	G	Q	Y	L	N	I	S	E	T	A	T		
CAT	CCT	TTG	TTT	AGC	CCA	GAA	TTA	GAG	AGA	CAA	ATG	GGC	TAT	462	154
H	P	L	F	S	P	E	L	E	R	Q	M	G	Y		
AAG	ATT	AAT	AAT	ATT	TTA	TGT	ATG	CCT	GTC	GTT	AGT	AGC	AAA	504	168
K	I	N	N	I	L	C	M	P	V	V	S	S	K		
GAT	CCA	ATT	GTC	GCA	GTA	GTA	CAA	TTA	GCT	AAT	AAG	ACA	GGA	546	182
D	Q	I	V	A	V	V	Q	L	A	N	K	T	G		
AAT	ATA	CCC	TTC	AAT	CGA	AAT	GAT	GAA	GAG	TCT	TTT	CGT	GAT	588	196
N	I	P	F	N	R	N	D	E	E	S	F	R	D		
TTT	GCT	GCT	TCT	ATT	GGG	ATT	ATT	TTA	GAA	ACC	TGT	CAA	TCT	630	210
F	A	A	S	I	G	I	I	L	E	T	C	Q	S		

## Anhang

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
TTT	TAT	GTT	GCA	GCT	CGC	AAT	CAA	CGG	GGA	GTC	ACA	GCA	CTT	672	
F	Y	V	A	A	R	N	Q	R	G	V	T	A	L		224
TTA	CGC	GCT	ACT	CAA	ACA	CTA	GGG	CAA	AGT	CTA	GAT	TTA	GAG	714	
L	R	A	T	Q	T	L	G	Q	S	L	D	L	E		238
GCT	ACT	TTG	CAA	ATA	GTG	ATG	GAA	CAA	GCC	CGA	ATT	TTG	ATG	756	
A	T	L	Q	I	V	M	E	Q	A	R	I	L	M		252
CAG	GCA	GAC	CGC	AGC	ACA	TTA	TTT	CTG	TAT	CGC	AAA	GAA	ATG	798	
Q	A	D	R	S	T	L	F	L	Y	R	K	E	M		266
GGC	GAA	CTC	TGG	ACT	AAA	GTA	GCA	GCA	GCA	GCA	GAT	ACC	ACA	840	
G	E	L	W	T	K	V	A	A	A	A	D	T	T		280
CAG	TTA	ATA	GAA	ATT	CGG	ATT	CCG	GCG	AAT	CGC	GGT	ATT	GTC	882	
Q	L	I	E	I	R	I	P	A	N	R	G	I	V		294
GGC	TAT	GTG	GCA	TCT	ACA	GGC	GAT	GCG	CTG	AAT	ATC	TCT	GAT	924	
G	Y	V	A	S	T	G	D	A	L	N	I	S	D		308
GCT	TAT	AAA	GAC	CCC	CGG	TTT	GAT	CCA	ACA	ACA	GAC	AGA	AAA	966	
A	Y	K	D	P	R	F	D	P	T	T	D	R	K		322
ACA	GGC	TAT	TTG	ACC	AGA	AAT	ATT	TTG	TGT	TTG	CCA	GTC	TTT	1008	
T	G	Y	L	T	R	N	I	L	C	L	P	V	F		336
AAT	TCA	GCC	AAT	GAA	TTG	ATC	GGA	GTA	ACA	CAG	TTA	ATT	AAT	1050	
N	S	A	N	E	L	I	G	V	T	Q	L	I	N		350
AAG	CAA	CAA	GGA	AGT	TTT	ACG	GCT	TCT	GAT	GAA	GAG	TTT	ATG	1092	
K	Q	Q	G	S	F	T	A	S	D	E	E	F	M		364
CGG	GCT	TTT	AAT	ATT	CAA	GCC	GGA	GTT	GCT	TTA	GAA	AAT	GCT	1134	
R	A	F	N	I	Q	A	G	V	A	L	E	N	A		378
CGT	TTA	TTT	GAA	AAT	GTA	TTA	CTC	GAG	AAA	CAA	TAT	CAA	AAA	1176	
R	L	F	E	N	V	L	L	E	K	Q	Y	Q	K		392
GAC	ATT	TTA	CAA	AGC	TTG	TCA	GAT	GCT	GTA	ATT	TCT	ACA	GAT	1218	
D	I	L	Q	S	L	S	D	A	V	I	S	T	D		406
ATG	GCC	GGG	AGA	ATT	GTC	ACA	ATT	AAT	GAT	GCA	GCC	TTG	GAA	1260	
M	A	G	R	I	V	T	I	N	D	A	A	L	E		420
TTA	CTC	GGT	TGT	CCT	TTA	GGT	GAT	GCT	AAT	CAT	AAA	AGT	AAT	1302	
L	L	G	C	P	L	G	D	A	N	H	K	S	N		434
AAG	CTG	CTG	TGG	GAA	CAA	AAT	TTA	ATT	GGT	CGC	GTA	GTT	TGG	1344	
K	L	L	W	E	Q	N	L	I	G	R	V	V	W		448
GAA	ATT	GTA	CCA	ATT	GAA	AAT	TTG	CAG	ATG	CGC	TTA	GAA	GAT	1386	
E	I	V	P	I	E	N	L	Q	M	R	L	E	D		462

## Anhang

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
AGT	TTA	AAA	AGT	GGT	GCT	AAA	CAT	TAT	GTG	CCA	GAA	CAA	AGT	1428	476
S	L	K	S	G	A	K	H	Y	V	P	E	Q	S		
TTG	ATA	GTG	GGA	ATT	TAT	CAA	TTA	CAA	ATG	TCT	GAA	AGT	CGG	1470	490
L	I	V	G	I	Y	Q	L	Q	M	S	E	S	R		
GTT	TTG	CAT	GAA	ACT	CAA	GAC	TAC	TCT	ATT	TTG	ACA	GTA	CGC	1512	504
V	L	H	E	T	Q	D	Y	S	I	L	T	V	R		
GAT	CGC	ATC	AAC	CCA	GAT	ATT	TTT	CTC	CCC	TGG	AAT	TTA	CCC	1554	518
D	R	I	N	P	D	I	F	L	P	W	N	L	P		
CAA	ACC	CCC	CAG	TCG	CAA	TTT	ATC	ACC	CCG	GAA	GAA	GTA	CAA	1596	532
Q	T	P	Q	S	Q	F	I	T	P	E	E	V	Q		
ATC	TTA	GAA	CGC	AGT	ATT	AAT	CTT	ACC	GTT	AAT	CCT	TTG	ACG	1638	546
I	L	E	R	S	I	N	L	T	V	N	P	L	T		
AAC	CCA	GAA	GGC	GGT	GTC	CGT	GGT	GGT	TTG	GTA	GTT	TTG	GAA	1680	560
N	P	E	G	G	V	R	G	G	L	V	V	L	E		
GAT	ATT	AGT	CAA	GAG	AAG	CGC	CTC	AAA	ACT	ACT	ATG	TAT	CGC	1722	574
D	I	S	Q	E	K	R	L	K	T	T	M	Y	R		
TAC	CTT	ACA	CCC	CAT	GTA	GCT	GAA	CAG	GTA	ATG	GCT	TTA	GGG	1764	588
Y	L	T	P	H	V	A	E	Q	V	M	A	L	G		
GAA	GAT	GCC	TTA	ATG	GTT	GGT	GAA	CGC	AAG	GAG	GTG	ACT	GTT	1806	602
E	D	A	L	M	V	G	E	R	K	E	V	T	V		
TTA	TTT	TCA	GAT	ATC	CGA	GGC	TAC	ACC	ACA	CTT	ACG	GAA	AAT	1848	616
L	F	S	D	I	R	G	Y	T	T	L	T	E	N		
CTA	GGT	GCG	GCT	GAA	GTG	GTA	TCA	CTC	CTG	AAC	CAA	TAT	TTT	1890	630
L	G	A	A	E	V	V	S	L	L	N	Q	Y	F		
GAA	ACA	ATG	GTT	GAA	GCA	GTT	TTC	AAC	TAT	GAA	GGC	ACA	CTG	1932	644
E	T	M	V	E	A	V	F	N	Y	E	G	T	L		
GAT	AAA	TTT	ATC	GGT	GAT	GCT	TTA	ATG	GCT	GTT	TTT	GGT	GCG	1974	658
D	K	F	I	G	D	A	L	M	A	V	F	G	A		
CCA	CTA	CCA	CTC	ACA	GAA	AAT	CAT	GCT	TGG	CAA	GCA	GTA	CAG	2016	672
P	L	P	L	T	E	N	H	A	W	Q	A	V	Q		
TCA	GCA	TTA	GAT	ATG	CGC	CAA	CGC	CTG	AAG	GAA	TTT	AAC	CAA	2058	686
S	A	L	D	M	R	Q	R	L	K	E	F	N	Q		
CGA	CGC	ATC	ATT	CAG	GCA	CAA	CCA	CAA	ATC	AAA	ATC	GGT	ATT	2100	700
R	R	I	I	Q	A	Q	P	Q	I	K	I	G	I		
GGT	ATT	AGT	TCT	GGA	GAA	GTA	GTT	TCT	GGT	AAC	ATC	GGT	TCT	2142	714
G	I	S	S	G	E	V	V	S	G	N	I	G	S		

## Anhang

														<b>bp</b>	<b>AS</b>
CAC	AAG	CGT	ATG	GAT	TAC	ACA	GTC	ATT	GGT	GAT	GGT	GTG	AAT	2184	
H	K	R	M	D	Y	T	V	I	G	D	G	V	N		728
TTA	AGT	TCC	CGC	TTG	GAA	ACT	GTC	ACC	AAA	GAA	TAT	GGC	TGT	2226	
L	S	S	R	L	E	T	V	T	K	E	Y	G	C		742
GAT	ATT	ATC	CTC	AGT	GAG	TTT	ACT	TAC	CAA	TTA	TGC	AGC	GAT	2268	
D	I	I	L	S	E	F	T	Y	Q	L	C	S	D		756
CGC	ATT	TGG	GTA	CGT	CAG	TTA	GAT	AAA	ATC	CGA	GTC	AAA	GGG	2310	
R	I	W	V	R	Q	L	D	K	I	R	V	K	G		770
AAA	CAC	CAA	GCT	GTC	AAT	ATC	TAT	GAG	TTG	ATT	AGC	GAT	CGC	2352	
K	H	Q	A	V	N	I	Y	E	L	I	S	D	R		784
AGT	ACT	CCC	TTA	GAT	GAC	AAC	ACC	CAA	GAG	TTC	CTC	TTT	CAC	2394	
S	T	P	L	D	D	N	T	Q	E	F	L	F	H		798
TAT	CAT	AAT	GGT	CGG	ACT	GCC	TAC	TTA	GTC	CGC	GAT	TTT	ACC	2436	
Y	H	N	G	R	T	A	Y	L	V	R	D	F	T		812
CAG	GCG	ATC	GCT	TGT	TTT	AAC	TCA	GCT	AAA	CAT	ATT	CGA	CCC	2478	
Q	A	I	A	C	F	N	S	A	K	H	I	R	P		826
ACA	GAC	CAA	GCT	GTC	AAT	ATT	CAC	CTA	GAA	CGC	GCC	TAC	AAT	2520	
T	D	Q	A	V	N	I	H	L	E	R	A	Y	N		840
TAT	CAA	CAA	ACT	CCA	CCA	CCT	CCT	CCA	TGG	GAC	GGC	GTA	TGG	2562	
Y	Q	Q	T	P	P	P	P	Q	W	D	G	V	W		854
ACA	ATT	TTC	ACA	AAG	TAG								2580		
T	I	F	T	K	.									859	

Literaturverzeichnis

1. Sutherland, E. W. & Rall, T. W. (1958) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles, *J Biol Chem.* 232, 1077-91.
2. Ashman, D. F., Lipton, R., Melicow, M. M. & Price, T. D. (1963) Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine, *Biochem Biophys Res Commun.* 11, 330-4.
3. Lipkin, D., Cook, W. H. & Markham, R. (1959) Adenosine-3': 5'-phosphoric Acid: A Proof of Structure, *J Am Chem Soc.* 81, 6198-203.
4. Francis, S. H., Turko, I. V. & Corbin, J. D. (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 65, 1-52.
5. Hurley, J. H. (1998) The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily, *Current Opinion in Structural Biology.* 8, 770-7.
6. Beavo, J. A. & Brunton, L. L. (2002) Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 710-8.
7. Lerner, A. & Epstein, P. M. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases as targets for treatment of haematological malignancies, *Biochem. J.* 393, 21-41.
8. Houslay, M. D. & Milligan, G. (1997) Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity, *TiBS.* 22, 217-24.
9. Lincoln, T. M. & Cornwell, T. L. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins, *FASEB J.* 7, 328-38.
10. Menniti, F. S., Faraci, W. S. & Schmidt, C. J. (2006) Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development, *Nat Rev Drug Discov.* 5, 660-70.
11. Anantharaman, V., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2001) Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains, *J Mol Biol.* 307, 1271-92.
12. Taylor, B. L., Zhulin, I. B. (1999) PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light, *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63, 479-506.
13. Ponting, C. P., Aravind, L. (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light, *Current Biology.* 7, R674-7.
14. Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J. U. & Schultz, J. E. (2002) A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch, *EMBO J.* 21, 3672-80.

15. Martinez, S. E., Beavo, J. A. & Hol, W. G. (2002) GAF Domains: Two-Billion-Year-Old Molecular Switches that Bind Cyclic Nucleotides, *Mol Interv.* 2, 317-23.
16. Aravind, L. & Ponting, C. P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins, *Trends Biochem Sci.* 22, 458-9.
17. Zoraghi, R., Corbin, J. D., Francis, S. H. (2004) Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins, *Mol Pharmacol.* 65, 267-78.
18. <http://smart.embl-heidelberg.de>.
19. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 5857-64.
20. Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M. & Vierstra, R. D. (2005) Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors, *Biochem J.* 392, 103-16.
21. Little, R. & Dixon, R. (2003) The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions, *J Biol Chem.* 278, 28711-8.
22. Sardiwal, S., Nendall, S. L., Movahedzadeh, F., Rison, S. C. G., Stoker, N. G. & Djordjevic, S. (2005) A GAF Domain in the Hypoxia/NO-inducible *Mycobacterium tuberculosis* DosS Protein Binds Haem, *J. Mol. Biol.* 353, 929-36.
23. Bruder, S., Linder, J. U., Martinez, S. E., Zheng, N., Beavo, J. A. & Schultz, J. E. (2005) The cyanobacterial tandem GAF domains from the *cyaB2* adenylyl cyclase signal via both cAMP-binding sites, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 3088-92.
24. Bridges, D., Fraser, M. E. & Moorhead, G. B. G. (2005) Cyclic nucleotide binding proteins in the *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* genomes, *BMC Bioinformatics.* 6.
25. Rascón, A., Soderling, S. H., Schaefer, J. B. & Beavo, J. A. (2002) Cloning and characterization of a cAMP-specific phosphodiesterase (TbPDE2B) from *Trypanosoma brucei*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 4714-9.
26. Zoraghi, R., Kunz, S., Gong, K. & Seebeck, T. (2001) Characterization of TbPDE2A, a novel cyclic nucleotide-specific phosphodiesterase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*, *J Biol Chem.* 276, 11559-66.
27. Gross-Langenhoff, M., Hofbauer, K., Weber, J., Schultz, A. & Schultz, J. E. (2006) cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11, *J Biol Chem.* 281, 2841-6.

- 
28. Laxman, S., Rascon, A. & Beavo, J. A. (2005) Trypanosome cyclic nucleotide phosphodiesterase 2B binds cAMP through its GAF-A domain, *J Biol Chem.* 280, 3771-9.
29. Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X. B. & Beavo, J. A. (2003) PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain, *Embo J.* 22, 469-78.
30. Wu, A. Y., Tang, X. B., Martinez, S. E., Ikeda, K. & Beavo, J. A. (2004) Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A, *J Biol Chem.* 279, 37928-38.
31. Norton, A. W., D'Amours, M. R., Grazio, H. J., Hebert, T. L. & Cote, R. H. (2000) Mechanism of Transducin Activation of Frog Rod Photoreceptor Phosphodiesterase, *The Journal of Biological Chemistry.* 275, 38611-19.
32. Huang, D., Hinds, T. R., Martinez, S. E., Doneanu, C. & Beavo, J. A. (2004) Molecular determinants of cGMP-binding to chicken cone photoreceptor Phosphodiesterase, *J Biol Chem.* 279, 48143-51.
33. Turko, I. V., Haik, T. L., McAllister-Lucas, L. M., Burns, F., Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1996) Identification of key amino acids in a conserved cGMP-binding site of cGMP-binding phosphodiesterases. A putative NKXnD motif for cGMP binding, *J Biol Chem.* 271, 22240-4.
34. McAllister-Lucas, L. M., Haik, T. L., Colbran, J. L., Sonnenburg, W. K., Seger, D., Turko, I. V., Beavo, J. A., Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1995) An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase, *J Biol Chem.* 270, 30671-9.
35. Martinez, S. E., Wu, A. Y., Glavas, N. A., Tang, X. B., Turley, S., Hol, W. G. & Beavo, J. A. (2002) The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 13260-5.
36. Martinez, S. E., Bruder, S., Schultz, A., Zheng, N., Schultz, J. E., Beavo, J. A. & Linder, J. U. (2005) Crystal structure of the tandem GAF domains from a cyanobacterial adenylyl cyclase: modes of ligand binding and dimerization, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 3082-7.
37. Pandini, A., Bonati, L. (2005) Conservation and specialization in PAS domain dynamics, *Protein Engineering, Design & Selection.* 18, 127-37.
38. Vreede, J., van der Horst, M. A., Hellingwerf, K. J., Crielaard, W., van Aalten, D. M. F. (2003) PAS Domains. Common structure and common flexibility, *The Journal of Biological Chemistry.* 278, 18434-9.
39. Hefti, M. H., Francoijs, K.-J., de Vries, S. C., Dixon, R., Vervoort, J. (2004) The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction, *Eur. J. Biochem.* 271, 1198-208.

40. Amezcuca, C. A., Harper, S. M., Rutter, J., Gardner, K. H. (2002) Structure and Interactions of PAS Kinase N-Terminal PAS Domain: Model for Intramolecular Kinase Regulation, *Structure*. *10*, 1349-61.
41. Soderling, S. H., Bayuga, S. J., Beavo, J. A. (1998) Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *95*, 8991-6.
42. Mehats, C., Andersen, C. B., Filopanti, M., Jin, S.-L. C. & Conti, M. (2002) Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling, *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*. *13*, 29-35.
43. Linder, J. U. & Schultz, J. E. (2003) The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules, *Cell Signal*. *15*, 1081-9.
44. Wheeler, M. A., Ayyagari, R. R., Wheeler, G. L. & Weiss, R. M. (2005) Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract, *J Smooth Muscle Res*. *41*, 1-21.
45. Richter, W. (2002) 3',5' Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: members, structure, and catalytic mechanism, *Proteins*. *46*, 278-86.
46. Conti, M. & Beavo, J. (2007) Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling, *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 481-511.
47. Bender, A. T. & Beavo, J. A. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use, *Pharmacol Rev*. *58*, 488-520.
48. Manallack, D. T., Hughes, R. A. & Thompson, P. E. (2005) The next generation of phosphodiesterase inhibitors: structural clues to ligand and substrate selectivity of phosphodiesterases, *J Med Chem*. *48*, 3449-62.
49. Zhang, K. Y. J., Card, G. L., Suzuki, Y., Artis, D. R., Fong, D., Gillette, S., Hsieh, D., Neiman, J., West, B. L., Zhang, C., Milburn, M. V., Kim, S.-H., Schlessinger, J., Bollag, G. (2004) A Glutamine Switch Mechanism for Nucleotide Selectivity by Phosphodiesterases, *Molecular Cell*. *15*, 279-86.
50. Wang, H., Liu, Y., Hou, J., Zheng, M., Robinson, H. & Ke, H. (2007) Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *104*, 5782-7.
51. Stroop, S. D. & Beavo, J. A. (1991) Structure and Function Studies of the cGMP-stimulated Phosphodiesterase, *The Journal of Biological Chemistry*. *266*, 23802-9.
52. Fink, T. L., Francis, S. H., Beasley, A., Grimes, K. A. & Corbin, J. D. (1999) Expression of an Active, Monomeric Catalytic Domain of the cGMP-binding cGMP-specific Phosphodiesterase (PDE5), *The Journal of Biological Chemistry*. *274*, 34613-20.

53. Francis, S. H., Colbran, J. L., McAllister-Lucas, L. M. & Corbin, J. D. (1994) Zinc interactions and conserved motifs of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase suggest that it is a zinc hydrolase, *J Biol Chem.* 269, 22477-80.
54. Muradov, K. G., Granovsky, A. E. & Artemyev, N. O. (2003) Mutation in Rod PDE6 Linked to Congenital Stationary Night Blindness Impairs the Enzyme Inhibition by Its  $\gamma$ -Subunit, *Biochemistry.* 42, 3305-10.
55. McLaughlin, M. E., Ehrhart, T. L., Berson, E. L. & Dryja, T. P. (1995) Mutation spectrum of the gene encoding the  $\beta$  subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 3249-53.
56. Corbin, J. D., Francis, S. H. & Webb, D. J. (2002) Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction, *Urology.* 60, 4-11.
57. Blount, M. A., Beasley, A., Zoraghi, R., Sekhar, K. R., Bessay, E. P., Francis, S. H. & Corbin, J. D. (2004) Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation, *Mol Pharmacol.* 66, 144-52.
58. Corbin, J. D. & Francis, S. H. (1999) Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil, *J Biol Chem.* 274, 13729-32.
59. Boswell-Smith, V., Spina, D. & Page, C. P. (2006) Phosphodiesterase inhibitors, *British Journal of Pharmacology.* 147, S252-7.
60. Rybalkin, S. D., Yan, C., Bornfeldt, K. E. & Beavo, J. A. (2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function, *Circ Res.* 93, 280-91.
61. Hatzelmann, A. & Schudt, C. (2001) Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Potential of the Novel PDE4 Inhibitor Roflumilast in Vitro, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 297, 267-79.
62. Vasta, V., Beavo, J. (2004) Functions and Pharmacological Inhibitors of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases, *Celltransmissions.* 20, 3-8.
63. D'Sa, C., Tolbert, L. M., Conti, M. & Duman, R. S. (2002) Regulation of cAMP-specific phosphodiesterases type 4B and 4D (PDE4) splice variants by cAMP signaling in primary cortical neurons, *J Neurochem.* 81, 745-57.
64. Le Jeune, I. R., Shepherd, M., Van Heeke, G., Houslay, M. D. & Hall, I. P. (2002) Cyclic AMP-dependent transcriptional up-regulation of phosphodiesterase 4D5 in human airway smooth muscle cells. Identification and characterization of a novel PDE4D5 promoter, *J Biol Chem.* 277, 35980-9.

- 
65. Torras-Llort, M. & Azorin, F. (2003) Functional characterization of the human phosphodiesterase 7A1 promoter, *Biochem J.* 373, 835-43.
66. Sonnenburg, W. K., Seger, D., Kwak, K. S., Huang, J., Charbonneau, H. & Beavo, J. A. (1995) Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases, *J Biol Chem.* 270, 30989-1000.
67. Yarwood, S. J., Steele, M. R., Scotland, G., Houslay, M. D. & Bolger, G. B. (1999) The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform, *J Biol Chem.* 274, 14909-17.
68. Houslay, M. D. & Adams, D. R. (2003) PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization, *Biochem J.* 370, 1-18.
69. Beard, M. B., O'Connell, J. C., Bolger, G. B. & Houslay, M. D. (1999) The unique N-terminal domain of the cAMP phosphodiesterase PDE4D4 allows for interaction with specific SH3 domains, *FEBS Letters.* 460, 173-7.
70. O'Connell, J. C., McCallum, J. F., McPhee, I., Wakefield, J., Houslay, E. S., Wishart, W., Bolger, G., Frame, M. & Houslay, M. D. (1996) The SH3 domain of Src tyrosyl protein kinase interacts with the N-terminal splice region of the PDE4A cAMP-specific phosphodiesterase RPDE-6 (RNPDE4A5), *Biochem. J.* 318, 255-62.
71. Richter, W. & Conti, M. (2004) The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases, *J Biol Chem.* 279, 30338-48.
72. Sette, C., Conti, M. (1996) Phosphorylation and Activation of a cAMP-specific Phosphodiesterase by the cAMP-dependent Protein Kinase, *The Journal of Biological Chemistry.* 271, 16526-34.
73. Hoffmann, R., Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., Yarwood, S. J. & Houslay, M. D. (1999) The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579, *The EMBO Journal.* 18, 893-903.
74. Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Feil, R., Hofmann, F. & Beavo, J. A. (2002) Regulation of cGMP-specific Phosphodiesterase (PDE5) Phosphorylation in Smooth Muscle Cells, *The Journal of Biological Chemistry.* 277, 3310-7.
75. Francis, S. H., Bessay, E. P., Kotera, J., Grimes, K. A., Liu, L., Thompson, W. J. & Corbin, J. D. (2002) Phosphorylation of Isolated Human Phosphodiesterase-5 Regulatory Domain Induces an Apparent Conformational Change and Increases cGMP Binding Affinity, *The Journal of Biological Chemistry.* 277, 47581-7.

- 
76. Corbin, J. D., Turko, I. V., Beasley, A. & Francis, S. H. (2000) Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities, *Eur J Biochem.* 267, 2760-7.
77. Turko, I. V., Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1998) Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation, *Biochem J.* 329 ( Pt 3), 505-10.
78. Thomas, M. K., Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1990) Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP, *J Biol Chem.* 265, 14971-8.
79. Bruder, S., Schultz, A. & Schultz, J. E. (2006) Characterization of the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 5 using a cyanobacterial adenylyl cyclase as a reporter enzyme, *J Biol Chem.* 281, 19969-76.
80. Sharma, R. K. & Wang, J. H. (1985) Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin-dependent phosphatase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 2603-7.
81. Palmer, D., Jimmo, S. L., Raymond, D. R., Wilson, L. S., Carter, R. L. & Maurice, D. H. (2007) Protein Kinase A Phosphorylation of Human Phosphodiesterase 3B Promotes 14-3-3 Protein Binding and Inhibits Phosphatase-catalyzed Inactivation, *J Biol Chem.* 282, 9411-9.
82. Nemoz, G. & Sette, C., Conti, M. (1997) Selective Activation of Rolipram-Sensitive, cAMP-Specific Phosphodiesterase Isoforms by Phosphatidic Acid, *Molecular Pharmacology.* 51, 242-9.
83. Fujishige, K., Kotera, J., Michibata, H., Yuasa, K., Takebayashi, S., Okumura, K. & Omori, K. (1999) Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A), *J Biol Chem.* 274, 18438-45.
84. Soderling, S. H., Bayuga, S. J. & Beavo, J. A. (1999) Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 7071-6.
85. Loughney, K., Snyder, P. B., Uher, L., Rosman, G. J., Ferguson, K. & Florio, V. A. (1999) Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase, *Gene.* 234, 109-17.
86. Fawcett, L., Baxendale, R., Stacey, P., McGrouther, C., Harrow, I., Soderling, S., Hetman, J., Beavo, J. A. & Phillips, S. C. (2000) Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 3702-7.
87. Fujishige, K., Kotera, J., Yuasa, K. & Omori, K. (2000) The human phosphodiesterase PDE10A gene: Genomic organization and evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains, *Eur. J. Biochem.* 267, 5943-51.

88. Fujishige, K., Kotera, J. & Omori, K. (1999) Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A, *Eur J Biochem.* 266, 1118-27.
89. Seeger, T. F., Bartlett, B., Coskran, T. M., Culp, J. S., James, L. C., Krull, D. L., Lanfear, J., Ryan, A. M., Schmidt, C. J., Strick, C. A., Varghese, A. H., Williams, R. D., Wylie, P. G. & Menniti, F. S. (2003) Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain, *Brain Res.* 985, 113-26.
90. Kotera, J., Fujishige, K., Yuasa, K. & Omori, K. (1999) Characterization and phosphorylation of PDE10A2, a novel alternative splice variant of human phosphodiesterase that hydrolyzes cAMP and cGMP, *Biochem Biophys Res Commun.* 261, 551-7.
91. Kotera, J., Sasaki, T., Kobayashi, T., Fujishige, K., Yamashita, Y. & Omori, K. (2004) Subcellular localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 10A variants, and alteration of the localization by cAMP-dependent protein kinase-dependent phosphorylation, *J Biol Chem.* 279, 4366-75.
92. Linder, J. U. (2006) Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 63, 1736-51.
93. Katayama, M. & Ohmori, M. (1997) Isolation and characterization of multiple adenylyl cyclase genes from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, *J Bacteriol.* 179, 3588-93.
94. Kanacher, T. (2003) *Die Adenylyl cyclase CyaB1 aus Anabaena sp. PCC 7120 ist ein cAMP-sensitives Protein*, Dissertation der Universität Tübingen.
95. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
96. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 5463-7.
97. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72, 248-54.
98. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227, 680-5.
99. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 4350-4.
100. Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.*

101. Pingoud, A., Urbanke, C. (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie*, Berlin; New York: Walter de Gruyter.
102. Nayak, S., Li, L. & Lee, J. (2003) Enhanced TEV Protease extends enzyme stability for long-term activity, *Focus (Invitrogen Journal)*. 25, 12-4.
103. Dougherty, W. G., Carrington, J. C., Cary, S. M. & Parks, T. D. (1988) Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site, *Embo J.* 7, 1281-7.
104. Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. (1988) A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 3391-5.
105. Kapust, R. B., Tözser, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S., Copeland, T. D., Waugh, D. S. (2001) Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency, *Protein Engineering.* 14, 993-1000.
106. Salomon, Y., Londos, C. & Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylylate cyclase assay, *Anal Biochem.* 58, 541-8.
107. Bruder, S. (2006) *cAMP- und cGMP-bindende Tandem-GAF-Domänen – Biochemische Untersuchungen mit einer cyanobakteriellen Adenylylacyclase*, Dissertation der Universität Tübingen.
108. Groß-Langenhoff, M. (2007) *Biochemische Charakterisierung der Funktion der GAF-Domänen der Phosphodiesterase 11A4*, Dissertation der Universität Tübingen.
109. Ho, Y. S., Burden, L. M. & Hurley, J. H. (2000) Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor, *Embo J.* 19, 5288-99.
110. Zoraghi, R., Bessay, E. P., Corbin, J. D. & Francis, S. H. (2005) Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation, *J Biol Chem.* 280, 12051-63.
111. Sopory, S., Balaji, S., Srinivasan, N. & Visweswariah, S. S. (2003) Modeling and mutational analysis of the GAF domain of the cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase, PDE5, *FEBS Lett.* 539, 161-6.
112. Greengard, P., Allen, P. B. & Nairn, A. C. (1999) Beyond the Dopamine Receptor: the DARPP-32/Protein Phosphatase-1 Cascade, *Neuron.* 23, 435-47.
113. Baxendale, R. W. & Fraser, L. R. (2005) Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation, *Mol Reprod Dev.* 71, 495-508.



Meine akademischen Lehrer in Jena waren die Damen und Herren:

PD Dr. H.-J. Agricola	Zellbiologie
PD Dr. F.-D. Böhmer	Molekulare Medizin, Molekulare Pathologie
Prof. Dr. J. Bolz	Allgemeine Zoologie, Tierphysiologie
PD Dr. S. Brantl	Molekularbiologie
Prof. Dr. W. Braune	Allgemeine Botanik
Prof. Dr. I. Dahse	Biophysik
PD Dr. H.-U. Demuth	Enzymologie
Prof. Dr. S. Diekmann	Molekularbiologie
Prof. Dr. W. F. Fleck	Technologiefolgeabschätzung
PD Dr. R. Glöckner	Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. S. Grabley	Biochemische Analytik
Prof. Dr. U. Gräfe	Naturstoffchemie
Prof. Dr. K.-O. Greulich	Biophysik
Prof. Dr. F. Große	Biochemie
Prof. Dr. U.-W. Grummt	Physikalische Chemie
Prof. Dr. S. Heinemann	Molekulare Medizin
Prof. Dr. R. Hilgenfeld	Molekularbiologie
Prof. Dr. A. Hinnen	Biochemische Analytik
Prof. Dr. E.-G. Jäger	Bioanorganische Chemie
Prof. Dr. D. Klemm	Organische Chemie, Bioorganische Chemie
Prof. Dr. W. A. Knorre	Biotechnologie/Verfahrenstechnik
Prof. Dr. C. Liebmann	Biochemie, Molekulare Pathologie
Prof. Dr. H. Malke	Genetik
Prof. Dr. R. Oelmüller	Pflanzenphysiologie
Prof. Dr. S. Reißmann	Biochemie
Prof. Dr. W. Richter	Physik
Prof. Dr. A. Stelzner	Virologie, Immunologie
Prof. Dr. A. S. Ulrich	Spektroskopische Methoden
Prof. Dr. W. Weigand	Allgemeine und Anorganische Chemie
Prof. Dr. R. Wetzker	Molekulare Medizin
Prof. Dr. B. Wiederanders	Medizinische Biochemie/Pathobiochemie
Prof. Dr. J. Wöstemeyer	Mikrobiologie

# Lebenslauf

**Name** Karina Hofbauer

**Geburtsdatum** 01.02.1980

**Geburtsort** Gera

## Schulbildung

1986 – 1991 Polytechnische Oberschule, Gera

1991 – 1998 Friedrich-Schiller-Gymnasium, Gera  
Abschluss Abitur

## Berufsausbildung

09/1998 – 07/1999 Ausbildung zur Staatlich geprüften Gestaltungstechnischen Assistentin an der Höheren Berufsfachschule Hermsdorf

## Hochschulstudium

10/1999 – 09/2004 Diplomstudiengang Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena  
Abschluss als Diplom-Biochemikerin

10/2003 – 08/2004 Diplomarbeit im Forschungslabor der Klinik für Urologie sowie dem Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät der FSU Jena unter der Anleitung von PD Dr. K. Junker und Prof. Dr. B. Wiederanders  
Thema: Die Expression von Kathepsinen in Nierenzellkarzinomen

## Promotion

10/2004 – 06/2007 Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit mit dem Titel „Die GAF-Domänen der humanen Phosphodiesterase 10“ in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biochemie des Pharmazeutischen Instituts der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. E. Schultz



