

Biochemische Charakterisierung der Funktion der GAF-Domänen der Phosphodiesterase 11A4

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Marco Groß-Langenhoff

Tag der Disputation: 28.06.2007
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 Februar 2004 und März 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 spannenden Themas, sein stetiges Interesse an der Arbeit und zahlreiche gute Ratschläge.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bedanken bei

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

Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer und Herrn Prof. Dr. Oliver Werz für die Abnahme der Promotionsprüfung.

Herrn Prof. Dr. Arnulf Stenzl und Herrn Jörg Hennenlotter aus der Universitätsklinik für Urologie, Tübingen für die Bereitstellung von Gewebeproben und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Florian Altenberend vom Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung Immunologie für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Herrn Dr. Christoph Schall vom Interfakultären Institut für Biochemie der Universität Tübingen und Herrn Dr. Jörg Martin vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen für die Unterstützung bei Kristallisationsvorhaben.

Frau Dr. Sandra Bruder für die Einarbeitung in die Methoden und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Anita Schultz für Hilfe bei Klonierungen.

Frau Ursula Kurz für jedwede Unterstützung im Labor.

Frau Laura Garcia Mondejar für ihre aufopferungsvolle Mithilfe im Rahmen eines freiwilligen Praktikums.

meiner Familie und Inge Mohry für ihre Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir jederzeit gegeben haben.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGEN	IV
NOMENKLATUR DER UNTERSUCHTEN KONSTRUKTE.....	V
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIALIEN	10
2.1 CHEMIKALIEN, KITS, VERBRAUCHSMATERIALIEN	10
2.2 GERÄTE	12
2.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	14
2.3.1 Molekularbiologie.....	14
2.3.2 Proteinchemie	15
2.4 OLIGONUKLEOTIDE.....	19
2.4.1 Klonierungsprimer	19
2.4.2 Sequenzierprimer	23
2.5 PLASMIDE.....	24
3 METHODEN	25
3.1 GENTECHNOLOGISCHE METHODEN	25
3.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA	25
3.1.2 Enzymatische Reaktionen.....	27
3.1.3 Transformation von <i>E. coli</i>	29
3.2 PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	30
3.2.1 Biorad Proteinbestimmung	30
3.2.2 Proteinfällung mit TCA.....	30
3.2.3 SDS-PAGE	31
3.2.4 Western Blot.....	31
3.2.5 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	32
3.2.6 Lyse	32
3.2.7 Ni ²⁺ -NTA-Affinitätsreinigung.....	32
3.2.8 Dialyse	33
3.2.9 Aufkonzentrierung und Umpufferung.....	33
3.2.10 Säulenchromatographie	33
3.2.11 Homogenisierung von Gewebe.....	33
3.3 ENZYMTESTS	34
3.3.1 Adenylatcyclasetest	34
3.3.2 Test auf Proteaseaktivität.....	34
3.4 KRISTALLISATION.....	35
3.5 PHOSPHORYLIERUNG MIT DER PKA.....	35
3.6 VERDAU MIT DER TEV-PROTEASE	35
3.7 KLONIERUNGEN.....	36
3.7.1 Ausgangsklone	36
3.7.2 PDE11A4/CyaB1-Chimären	37
3.7.3 PDE11A3/CyaB1-Chimären	53
3.7.4 PDE11A4 GAF-Konstrukte für Kristallisationsversuche.....	56
4 ERGEBNISSE	62
4.1 UNTERSUCHUNG DER PDE11A4/CYAB1-CHIMÄREN.....	62
4.1.1 Biochemische Charakterisierung der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus	62
4.1.2 Biochemische Charakterisierung der PDE11/CyaB1-Chimäre	67
4.1.3 Untersuchungen zur Nukleotidbindung und -spezifität.....	74
4.1.4 Einfluss der Phosphorylierung an Ser-117 und Ser-162.....	80
4.1.5 Untersuchungen zum Einfluss des N-Terminus.....	85
4.2 UNTERSUCHUNG DER PDE11A3/CYAB1-CHIMÄREN.....	94
4.2.1 Dosis-Wirkung von PDE11A4/CyaB1 mit zusätzlichem PDE11A3 N-Terminus	95
4.2.2 Dosis-Wirkung von PDE11A3/CyaB1	95

4.3	UNTERSUCHUNGEN VON PROSTATA- UND ANDEREN GEWEBEHOMOGENATEN AUF PDE11A4-SPEZIFISCHE PROTEASEAKTIVITÄT	97
4.3.1	<i>Vorversuche zur Untersuchung der Proteaseaktivität des Prostatahomogenats</i>	97
4.3.2	<i>Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit dem Prostatahomogenat</i>	98
4.3.3	<i>Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit anderen Gewebhomogenaten</i>	101
4.3.4	<i>Massenspektrometrische Analyse der PDE11A4-Abbauprodukte</i>	102
4.4	VERSUCHE ZUR KRISTALLISATION DER PDE11A4 GAF- DOMÄNEN.....	104
4.4.1	<i>Kristallisationskonstrukt ab Met-1</i>	105
4.4.2	<i>Kristallisationskonstrukt ab Asn-181</i>	105
4.4.3	<i>Kristallisationskonstrukte ab Pro-187</i>	106
4.4.4	<i>Kristallisationskonstrukte ab Lys-197</i>	109
4.4.5	<i>Kristallisationskonstrukt ab Asp-217</i>	111
5	DISKUSSION	113
5.1	DIE PDE11A4 GAF-DOMÄNEN STIMULIEREN ÜBER DIE BINDUNG VON cGMP	113
5.2	MODULATION DER REGULATION DER PDE11A4 GAF-DOMÄNEN	115
5.3	ERST DIE STRUKTURAUFKLÄRUNG DER PDE11 GAF-DOMÄNEN WIRD DEREN GENAUEN AUFBAU ZEIGEN	118
5.4	MÖGLICHE (PATHO-)PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN DER PDE11	118
5.5	EIN BLICK IN DIE ZUKUNFT DER PDE-FORSCHUNG	121
5.6	OFFENE FRAGEN UND AUSBLICK	122
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	124
7	ANHANG	125
7.1	PDE11 HOLOENZYM	125
7.1.1	<i>DNA- und Proteinsequenz</i>	125
7.1.2	<i>Kinetische Parameter</i>	125
7.1.3	<i>Posttranslationale Modifikationen [137]</i>	126
7.2	DNA- UND PROTEINSEQUENZEN	126
7.2.1	<i>PDE11A4</i>	126
7.2.2	<i>PDE11A3</i>	129
7.2.3	<i>CyaB1</i>	129
	LITERATURVERZEICHNIS	132
	LEBENS LAUF	144

Abkürzungen

AC(n)	Adenylatcyclase(n)
AK	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AS(n)	Aminosäure(n)
AU	arbitrary unit(s)
BPH	benigne Prostatahyperplasie
cN	cyclische(s) Nukleotid(e)
CaM	Calmodulin
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	De(s)oxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Dide(s)oxynukleosidtriphosphat
EHNA	<i>Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin</i>
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GC(n)	Guanylatcyclase(n)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
LB-Medium	Luria-Bertani Kulturmedium
MCS	multiple cloning site
n. d.	nicht detektierbar/bestimmbar
Ni²⁺-IDA	Nickel-Iminodiacetic acid
Ni²⁺-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
O/N	über Nacht
PDE(n)	Phosphodiesterase(n)
PKA/G	cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBS	Tris Buffered Saline
TEV	Tobacco Etch Virus
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Nomenklatur der untersuchten Konstrukte

Der besseren Lesbarkeit wegen wurden die untersuchten Konstrukte mit Kurznamen versehen. Die verwendeten Namen wurden von der Zusammensetzung der entsprechenden Chimäre abgeleitet:

PDE11/CyaB1	N-Terminus und GAF-Domänen der PDE11A4 (AS Pos. 1-568), PAS- und katalytische Domäne der CyaB1 (AS Pos. 386-859)
PDE11/CyaB1 mit CyaB1 N-Terminus	N-Terminus der CyaB1 (AS Pos. 1-50), GAF-Domänen der PDE11A4 (AS Pos. 197-568), PAS- und katalytische Domäne der CyaB1 (AS Pos. 386-859)
PDE11/CyaB1-D355A	Einzelpunktmutante in PDE11/CyaB1 (hier: D355A)
PDE11/CyaB1 ab Lys-197	N-terminal verkürzte Variante von PDE11/CyaB1, hier beginnend mit Lys-197, d.h. der 196ASn lange PDE11A4 N-Terminus wurde entfernt
PDE11/CyaB1 ab Lys-197-D355A	Einzelpunktmutante (hier: D355A) in N-terminal verkürzter Variante von PDE11/CyaB1 (hier: ab Lys-197)
PDE11A3/CyaB1	N-Terminus und GAF-Domänen der PDE11A3 (AS Pos. 1-318), PAS- und katalytische Domäne der CyaB1 (AS Pos. 386-859); hier handelt es sich um die tatsächlich vorkommene PDE11A3 (vgl. 4.2)
PDE11A4/CyaB1 mit zusätzlichem PDE11A3 N-Terminus	N-terminal verlängerte Variante von PDE11/CyaB1; der 54ASn lange N-Terminus der PDE11A3 wurde vor den PDE11A4 N-Terminus kloniert; diese PDE11A3-Variante war zu Beginn dieser Arbeit in der SMART Datenbank aufgeführt, wurde aber später gelöscht, da sie nicht existiert (vgl. 4.2)

1 Einleitung

1.1 *Second messenger*

Um auf Umwelteinflüsse reagieren zu können, leiten Organismen externe Reize, seien sie chemischer oder physikalischer Natur, über eine mehrstufige, intrazelluläre Kaskade bis zu einer entsprechenden Antwort weiter. Dabei binden extrazellulär zirkulierende Botenstoffe (*first messenger*) wie Hormone und Neurotransmitter nach einem Stimulus an Oberflächenrezeptoren. Durch die Rezeptorbindung ins Zellinnere weitergegebene Signale führen zur Bildung von sekundären Botenstoffen (*second messengern*), die dann die eigentliche intrazelluläre Reaktion einleiten. Die Entdeckung von cAMP [1, 2] als erstem intrazellulären Botenstoff führte zur Formulierung dieses *second messenger*-Konzepts. Das cyclische Monophosphat des anderen biologischen Purins, cGMP, wurde wenige Jahre später entdeckt [3].

Der intrazelluläre Spiegel wird im Wesentlichen bestimmt durch das Verhältnis von Synthese zu Abbau dieser Substanzen. Die Synthese erfolgt durch die entsprechenden Cyclasen, also Adenylat- und Guanylatcyclasen, der Abbau zu den nichtcyclischen Monophosphaten geschieht durch Phosphodiesterasen. Im Laufe der Zeit wurde sowohl der Einfluss der cyclischen Nukleotide auf Effektorproteine untersucht als auch die Regulation der Synthese und des Abbaus von cAMP und cGMP. Zu den wichtigsten *downstream*-Effektorproteinen von cAMP und cGMP gehören PDEn [4], cN-abhängige Proteinkinasen [5] und cN-gesteuerte Ionenkanäle [6]. Durch sie werden verschiedene physiologische Vorgänge gesteuert. cGMP ist z. B. an der Relaxation der Gefäßmuskulatur beteiligt [7] oder auch an der Übertragung des Lichtreizes in der Retina [8]. cAMP spielt u. a. bei der Spermatogenese [9] und der Zelldifferenzierung [10] eine bedeutende Rolle.

Die Regulation erfolgt über *feedback*-Mechanismen, Modulation durch andere *second messenger* und durch subzelluläre Kompartimentierung, also Prozesse, die sich während der cAMP/cGMP-Signalkaskaden ständig wiederholen [11]. Diese Regulation und Kontrolle an zahlreichen Stellen während der Signalkaskaden sorgen für feingesteuerte Antworten auf verschiedene Stimuli. Vor allem auf den cN-Abbau durch Phosphodiesterasen und deren Regulation soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.2 Phosphodiesterasen

1.2.1 Allgemein

Phosphodiesterasen¹ sind eine Klasse von Phosphohydrolasen, die spezifisch die cyclische 3'-Phosphatbindung von cAMP und/oder cGMP lösen und somit als Gegenspieler der ACn bzw. GCn den intrazellulären Spiegel an cyclischen Nukleotiden senken. Etwas differenzierter kann man die Aufgabe der PDEn darin sehen, die cyclischen Nukleotide einer Zelle in Mikrodomänen zusammenzuhalten, so dass diese sich nicht weit über die Zelle verteilen und somit der Zugang zu spezifischen Rezeptoren in bestimmten Regionen innerhalb der Zelle beschränkt bleibt [4, 11].

Die Phosphodiesterasen werden in drei Klassen unterteilt [12, 13]: zu den Klasse I PDEn gehören u. a. alle Mammalia-PDEn. Sie besitzen ein etwa 250-300 ASn umfassendes

¹ Klasse 3.1.4.x nach der EC-Klassifizierung (*Enzyme Commission numbers*):
3. Hydrolasen; 3.1 Esterhydrolasen; 3.1.4 Phosphodiesterhydrolasen

konserviertes Segment im C-terminalen Bereich, das die katalytische Domäne enthält. Alle Klasse I PDEn kommen intrazellulär vor, können sich allerdings in der subzellulären Verteilung unterscheiden. Die Klasse II umfasst nur wenige PDEn, z. B. aus Nematoden oder *Drosophila dunce*. Diese haben ein gemeinsames HXHLDH Motiv, das wahrscheinlich an der Metallionenbindung beteiligt ist. Klasse III PDEn (u. a. aus *Mycobacterium tuberculosis*) weisen ebenfalls gemeinsame Motive innerhalb ihrer katalytischen Domäne auf und zeigen ähnliche Sekundärstrukturen.

Die Säuger-PDEn lassen sich in elf Familien einteilen. Die Einteilung erfolgt anhand der AS-Sequenz [12]. Die genetischen Informationen für die über 50 Enzyme der elf Familien finden sich auf insgesamt 21 Genen. Durch alternatives Spleißen und variierende Transkriptionsstartpunkte kommt es zu dieser hohen Anzahl an verschiedenen Proteinen.

Die PDEn aus Säugern weisen alle einen ähnlichen modularen Aufbau auf: im N-terminalen Bereich können sich Regulator- und Dimerisierungsdomänen befinden, die katalytischen Domänen sind C-terminal dazu angeordnet. Eine Gruppierung der PDE-Familien lässt sich auch anhand der Substratspezifität und der regulatorischen Domänen vornehmen (vgl. Abb. 1-1).

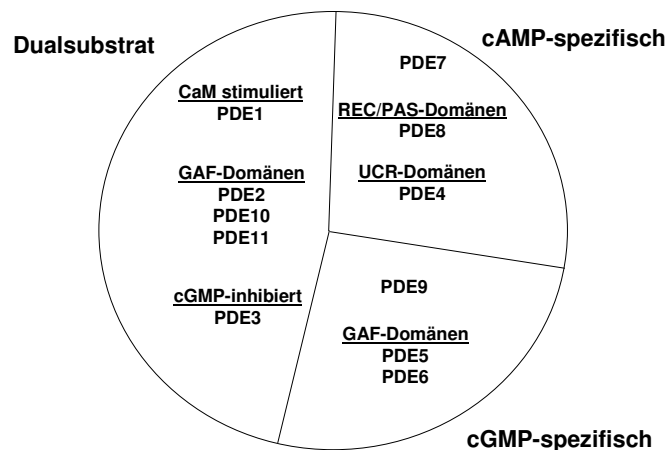


Abb. 1-1: Klassifizierung der Säuger-PDEn nach Substratspezifität und regulatorischen Domänen (nach [4])

Die größte Sequenzähnlichkeit weisen die elf PDE Familien im katalytischen Bereich auf (20-45%), wobei diese innerhalb einzelner Familien bis zu 70-80% betragen kann [12]. Für die eigentliche cN-Umsetzung ist nur die katalytische Domäne selbst zwingend erforderlich, die N-terminalen Bereiche, die beispielsweise für die Regulation zuständig sind (vgl. 1.2.2), werden für die katalytische Reaktion nicht benötigt (u. a. [14]). Der Phosphodiesterrest und der Purinrest der Substrate sind entscheidend für die Spezifität des cAMP/cGMP-Abbaus. Der Phosphodiesterrest der cyclischen Nukleotide ist essentiell für die Interaktion des Substrats mit dem katalytischen Zentrum. Andere Nukleotide werden durch die PDEn nicht umgesetzt und umgekehrt werden cAMP und cGMP auch nicht von anderen Phosphoesterasen (z. B. Phosphatasen, Ribonukleasen) abgebaut [12]. Über Wechselwirkungen mit dem Purinrest erfolgt eine Diskriminierung zwischen cAMP und cGMP. So sorgt z. B. in der PDE5 das Hydrophilie/Lipophilie-Muster der ASn im Bereich um das invariante Glu-772 für die hohe cGMP-Spezifität der katalytischen Domäne [15]. Für die katalytische Aktivität ist die Anwesenheit zweiwertiger Kationen erforderlich, wobei die bedeutendste Rolle dem Zn^{2+} zukommt [16]. Aber auch andere Kationen können die Katalyse positiv beeinflussen. Wahrscheinlich liegt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Kationen mit unterschiedlichen Präferenzen der einzelnen Isoformen vor, das auch die teilweise stark voneinander abweichenden kinetischen Parameter der PDE-Isoformen erklären könnte [12].

Die PDEn zeigen untereinander große Unterschiede in ihrer Gewebeverteilung und auch in ihrer subzellulären Verteilung (Tab. 1.1). Auch wenn alle PDEn cAMP und/oder cGMP abbauen, so können sie dadurch spezifische Funktionen übernehmen, dass spezialisierte Zellen die PDEn in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisieren, so dass bestimmte physiologische Prozesse gesteuert werden können. Zur weiteren Aufklärung der physiologischen Funktion einzelner Isoformen kann der Einsatz von siRNA, isoformspezifischen Inhibitoren und variantenspezifischen Knockout-Mäusen beitragen.

Isoform	Substrat Spezifität	Regulation	Gewebeverteilung	Erhältliche spezifische Inhibitoren
PDE1A/B	cAMP < cGMP	Ca ²⁺ /Calmodulin	Glatte Muskulatur (GM), Herz, Hirn, Hoden	Vinpocetin
PDE1C	cAMP = cGMP			
PDE2A	cAMP = cGMP	cGMP stimuliert	Adrenale Medulla, Hirn, Herz	EHNA
PDE3A/B	cAMP > cGMP	cGMP inhibiert	Herz, GM, Adipozyten	Cilostamin, Milrinon, Cilastazol
PDE4A-D	cAMP > cGMP	Phosphorylierung	Lunge Neuronen, Hirn, Immunzellen (IZ)	Rolipram, Cilomilast, Roflumilast
PDE5A	cAMP < cGMP	cGMP stimuliert, Phosphorylierung	Plättchen, vaskuläre GM, Hirn, Lunge, Herz	Zaprinast, Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil
PDE6A-C	cAMP < cGMP	cGMP	Retina	
PDE7A/B	cAMP > cGMP	-	Skelettmuskulatur, IZ, Herz, Hirn	
PDE8A/B	cAMP > cGMP	-	IZ, Hoden, Schilddrüse	
PDE9A	cAMP < cGMP	-	Niere, Hirn	
PDE10A	cAMP > cGMP	cAMP stimuliert	Hirn, Hoden, Herz, Schilddrüse	
PDE11A	cAMP = cGMP	cGMP stimuliert	Prostata, Hoden	

Tab. 1-1: Zusammenfassung wichtiger Eigenschaften verschiedener PDE Isoformen; modifiziert nach [4, 11, 17]

Die angesprochenen spezifischen Funktionen der PDE-Isoformen bieten eine Menge Möglichkeiten für die Entwicklung von Inhibitoren für die Therapie verschiedenster Krankheitsbilder, stellen aber gleichzeitig auch die größten Ansprüche an deren Selektivität.

Die erste Klasse von PDE-Hemmern auf dem Markt waren die PDE5-Hemmer Sildenafil (Viagra[®]), Vardenafil (Levitra[®]) und Tadalafil (Cialis[®]). Sie werden zur Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt [18-23]. Die Hemmung der PDE5 im *Corpus cavernosum* führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur durch NO und geringeren cGMP-Abbau und dadurch zu einer verstärkten Durchblutung.

Die Relaxation der glatten Muskulatur in der Lunge durch Hemmung der PDE5 mit Sildenafil (Revatio[®]) ist das Wirkprinzip bei der Behandlung des pulmonalen arteriellen Bluthochdrucks [24, 25].

Zur Behandlung chronisch entzündlicher Atemwegserkrankungen wie Asthma und chronischer obstruktiver pulmonaler Erkrankung (COPD) sind PDE4-Hemmer wie Roflumilast (Daxas[®]) und Cilomilast (Airflo[®]) in der Entwicklung [26-29].

Anagrelid (Xagrid[®]) wird bei Patienten mit essentieller Thrombozythämie eingesetzt. Als möglicher Wirkungsmechanismus wird u. a. die Hemmung der PDE3 angenommen [30, 31].

Ein Blick in die Zukunft der PDE-Forschung wird im Diskussionsteil gewagt (Kap. 5.5).

1.2.2 Regulation der Phosphodiesterasen

Die Beeinflussung physiologischer Prozesse durch PDEn ist durch die vielfältigen Regulationsmechanismen komplex. Die Regulation erfolgt im Wesentlichen über N-terminale regulatorische Domänen und über posttranslationale Modifikationen, aber auch auf der Ebene von Transkription [32, 33] und Translation [34]. Fünf der elf Säuger PDE Familien besitzen N-terminal angeordnete GAF-Domänen (PDEn 2, 5, 6, 10 und 11) [35]. Auf die Eigenschaften und Funktionen dieser Domänen wird in Abschnitt 1.3 eingegangen. Die Regulation der PDE1-Familie erfolgt über die Bindung von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und über die Phosphorylierung durch PKA. Im N-terminalen Bereich finden sich zwei Bindungsstellen, eine Inhibitorregion und zwei PKA-Phosphorylierungsstellen. In Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ bilden sich Tetramere aus, die aus je zwei Monomeren PDE1 und zwei Molekülen CaM bestehen. Durch die Tetramerbildung wird die Hemmung der katalytischen Domäne durch die Inhibitorregion aufgelöst [36]. Phosphorylierung verringert die Affinität der PDE1 für $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ [37].

Die Phosphorylierung der PDE3 führt zu einer Aktivierung des katalytischen Zentrums. Diese Phosphorylierung kann bei der PDE3B indirekt durch *first messenger* wie Insulin und IGF1 induziert werden [38].

Sehr komplex ist die Regulation der PDE4 Isoformen. Sie erfolgt im Wesentlichen über die sogenannten *upstream conserved regions* (UCR). Durch alternatives Spleißen haben sie in den über 20 verschiedenen Spleißvarianten unterschiedliche Längen und teilweise stark voneinander abweichende Regulationsmechanismen. Die PDE4A5 wird im N-terminalen Bereich durch die Caspase-3 geschnitten, wodurch sich zum einen die katalytischen Eigenschaften ändern und zum anderen die Interaktion mit der SH3-Domäne der Tyrosinkinase LYN nicht mehr möglich ist. Dieser Regulationsmechanismus ist sehr spezifisch, da nur die PDE4A5 mit SH3-Domänen wechselwirken kann [39]. Der *receptor for activated C-kinase1* (RACK1) interagiert mit der PDE4D5 und führt zu einer erhöhten Sensitivität dieser Spleißvariante gegenüber Rolipram [40]. Neben diesen beiden Beispielen werden in der Literatur zahlreiche weitere Regulationsmechanismen der PDE4 beschrieben (z. B. in [4, 41]).

Über die Funktion der regulatorischen REC- und PAS-Domäne in der PDE8, sowie die Regulation der PDEn 7 und 9 ist noch nichts Genaues bekannt [4].

1.2.3 PDE11 Familie

PDE11A ist das Gen der zuletzt identifizierten PDE-Familie beim Menschen. Aufgrund der Entschlüsselung des humanen Genoms (u. a. [42, 43]) wird es wohl auch die letzte bleiben. Die grundlegenden Untersuchungen wurden etwa gleichzeitig von Joe Beavos und Kenji Omoris Gruppen gemacht. Die Informationen für die PDE11-Familie finden sich auf einem Gen, das entsprechend der gängigen Nomenklatur PDE11A genannt wurde [44].

Die PDE11 Familie gehört wie die PDEn 1, 2, 3 und 10 zu den Dualsubstrat-PDEn, setzt also sowohl cAMP als auch cGMP um. Phylogenetisch ist sie den anderen GAF-haltigen PDEn am ähnlichsten (PDEn 2, 5, 6, 10), wobei die Identität mit der PDE5 am größten ist (50% Identität, 70% Ähnlichkeit [44]). Durch unterschiedliche Transkriptionsinitiationsstellen und alternatives Spleißen codiert PDE11A für vier verschiedene Spleißvarianten (PDE11A1 bis PDE11A4). Abb. 1-2 zeigt, dass die vier Spleißvarianten ab Exon 8 bzw. auf Proteinebene ab Met-499² übereinstimmen. PDE11A4 (MW 104kDa) ist die einzige Spleißvariante, die über ein vollständiges GAF-Tandem verfügt und zudem noch einen N-Terminus mit 196 ASn und zwei Phosphorylierungsstellen an den Positionen Ser-117 und Ser-162 enthält [45]. PDE11A3 hat eine verkürzte GAF-A (ab Asp-359) und einen N-Terminus von 54 ASn, der sich allerdings von dem

² die Nummerierung bezieht sich in der gesamten Arbeit, wenn nicht anders vermerkt, auf die Spleißvariante PDE11A4

der PDE11A4 unterscheidet (Exons 1, 2). PDE11A2 (ab Met-413) und PDE11A1 (ab Met-499)³ sind N-terminal noch weiter verkürzt. Bezüglich ihrer kinetischen Parameter, Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren, etc. unterscheiden sich die vier humanen Spleißvarianten. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Ergebnisse bei verschiedenen Studien zu einzelnen Spleißvarianten. Eine Übersicht findet sich in [46] und im Anhang (Kap. 7.1.2).

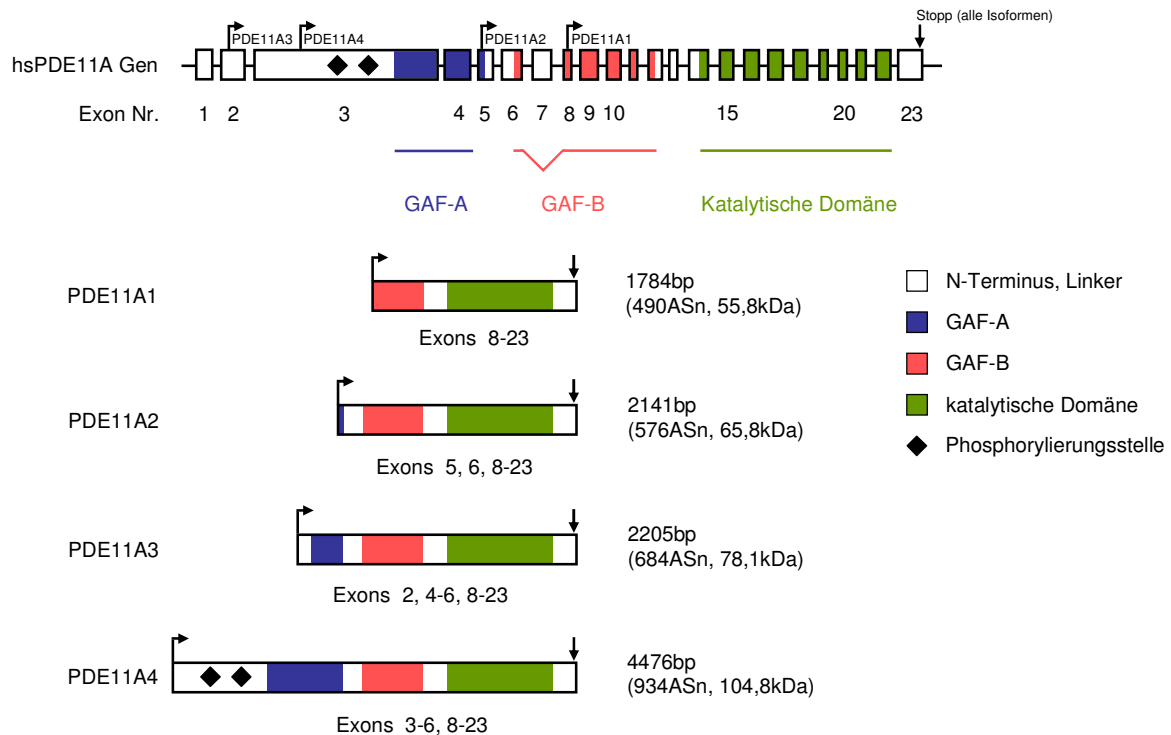


Abb. 1-2.: Genstruktur von hsPDE11A (nach [46]); oben sind alle Exons des hsPDE11A Gens dargestellt, darunter die offenen Leserahmen der vier Spleißvarianten inkl. der entsprechenden Exons; die einzelnen Domänen sind farbig gekennzeichnet; die Varianten A1 bis A4 sind die gegenwärtig in der SMART Datenbank aufgeführten Spleißvarianten der PDE11; hs: Homo sapiens

Die Gewebeverteilung der Mitglieder der PDE11 Familie ist noch nicht abschließend geklärt. Die Untersuchung von Geweben unterschiedlicher Organismen (Maus [47, 48], Ratte [49], Mensch [44, 45, 50-52]) und der Einsatz verschiedener Techniken (Western Blot, Northern Blot, Dot Blot, RT-PCR) führte zu uneinheitlichen Aussagen. Gesichert scheint das Vorkommen der PDE11A4 vor allem im Urogenitalbereich. Exprimiertes Protein wurde nachgewiesen in der humanen Prostata, sowohl in benignem als auch in malignem Gewebe, [44, 45, 50, 51, 53] und in den Hoden (Mensch und Maus [45, 48, 50, 54]), sowie die PDE11A3 in den Hoden (Mensch und Ratte [46]). Weitere Hinweise auf das Vorkommen von PDE11-Spleißvarianten gab es u. a. in Spermatozoen (Mensch und Maus [47, 48]), in der humanen Klitoris [55] und Skelettmuskulatur [44, 51].

Zuletzt wurde auch das Vorkommen der PDE11A4 in der Nebennierenrinde durch eine genomweite SNP-Genotypisierung bei der Suche nach Mutationen, die zum Cushing-Syndrom bei Patienten mit gleichzeitiger adrenocorticaler Hyperplasie führen, nachgewiesen ([56]; früherer Hinweis bereits bei [47]). Die nicht eindeutig geklärte Gewebeverteilung und zudem der Mangel an spezifischen Inhibitoren lassen auch die physiologischen Funktionen der PDE11-Familie weitestgehend im Dunkeln.

³ Exon 7 gehört zu PDE11A1, wird aber nicht translatiert

Aufgrund des Vorkommens der PDE11 in der Prostata und in den Hoden ist von einer Beteiligung der PDE11 an der Spermatogenese und der Kapazitation der Spermien auszugehen. Klinische Studien und Untersuchungen an Knockout-Mäusen deuten ebenfalls darauf hin [46, 48]. In weiteren präklinischen Untersuchungen fanden sich Hinweise auf einen Einfluss der PDE11 auf die Proliferation von prostatistischem Gewebe [57]. Obwohl bisher kein Mitglied der PDE11-Familie im ZNS nachgewiesen werden konnte [11], so scheint die PDE11 dennoch an der Pathophysiologie der MDD (major depressive disorder) beteiligt zu sein. Dies zeigt zumindest eine SNP-Genotypisierung von MDD-Patienten [58]. Auf die physiologische Bedeutung der PDE11 wird – unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit – im Diskussionsteil (Kap. 5.4) noch detaillierter eingegangen.

1.3 GAF-Domänen

GAF-Domänen stellen eine große Gruppe von sogenannten *small molecule binding domains* (SMBD) dar. Sie wurden zuerst von Aravind und Ponting beim Vergleich der Phototransduktion über Phytochrome (in Pflanzen und Cyanobakterien) und Phosphodiesterasen (in (In-) Vertebraten) beschrieben [59]. Die Abkürzung GAF leitet sich von den Namen der Proteine ab, in denen GAF-Domänen zuerst entdeckt wurden: in cGMP-bindenden Phosphodiesterasen, *Anabaena* Adenylatcyclasen und im *E. coli* Transkriptionsfaktor FhlA.

GAF-Domänen tauchen in den unterschiedlichsten Proteinen und Organismen auf. In Bakterien finden sie sich in Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (z. B. in Adenylatcyclasen [60], Histidinkinasen [61], Diguanylatcyclasen/-phosphodiesterasen [35, 62]) und sind auch an der Genregulation [63, 64] und an metabolischen Vorgängen beteiligt [35]. In Pflanzen sind sie u. a. an metabolischen Vorgängen [35] und an der Phototransduktion beteiligt [65]. Für diese Arbeit am bedeutsamsten ist das Vorkommen der GAF-Domänen in Phosphodiesterasen zahlreicher Organismen. So findet man z.B. in den Parasiten *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania major* GAF-Tandemhaltige PDEn. PDE2B aus *Trypanosoma brucei* (TbrPDE2B) ist eine cAMP-spezifische PDE und bindet cAMP an GAF-A [66], genauso wie PDEB1 aus *Trypanosoma cruzi* (TcrPDEB1) [67]. Die Funktion der GAF-Domänen der LmjPDEB1 aus *Leishmania major* ist noch nicht bekannt, interessanterweise befindet sich hier eine Phosphorylierungsstelle für die PKA im Linkerbereich zwischen GAF-A und -B [68].

Bei den Säugern findet man GAF-Domänen in den PDEn 2, 5, 6, 10 und 11 und somit sind die Säuger-PDEn die Superfamilie mit dem stärksten Vorkommen an GAF-Domänen [35]. Abgesehen von den PDE11-Spleißvarianten A1, A2 und A3 liegen sie jeweils als vollständiges Tandem vor. Die einzelnen GAF-Domänen haben eine Länge von etwa 160 ASn und sind über einen Linker mit ca. 30 ASn miteinander verknüpft. Sie wurden 1990 zuerst in der PDE2 und der PDE6 als nichtkatalytische cGMP-Bindedomänen entdeckt, auch wenn sie damals noch nicht als GAF-Domänen deklariert wurden [69].

In 12 der 14 GAF-Domänen⁴ der Mammalia-PDEn erscheint das NKFDE Motiv, wobei der Phe-Rest dieses Motivs die einzige invariante AS in allen 14 Mammalia-PDE GAF-Domänen ist [35]. Aufgrund des häufigen Vorkommens des NKFDE-Motivs wurde eine Beteiligung an der Nukleotidbindung vermutet. Zumal die GAF-Domäne des *Saccharomyces cerevisiae* Proteins YKG9, das kein cyclisches Nukleotid bindet, auch kein NKFDE Motiv aufweist [70]. Erste Untersuchungen schienen diese Theorie zu bestätigen [71, 72], die Aufklärung der Kristallstruktur der mPDE2 GAF-Domänen zeigte allerdings, dass das NKFDE Motiv relativ

⁴ die PDEn 6A, A' und B haben unterschiedliche GAF-Domänen, daher gibt es in fünf PDE-Familien 14 GAF-Domänen (Abb. 1-3)

weit von der cGMP-Bindungstasche entfernt liegt [73]. Mutationsstudien, bei denen alle fünf Reste einzeln gegen Alanin ausgetauscht wurden, führten dennoch sämtlich zu einem Verlust der Fähigkeit der GAF-Domänen, cGMP zu binden [74]. Daher scheint das NKFDE eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Stabilisierung der Bindungstasche für das jeweilige cyclische Nukleotid zu spielen. Für die eigentliche Nukleotidbindung wurden elf ASn in der GAF-B der mPDE2 ausgemacht [73] (vgl. Abb. 1-3).

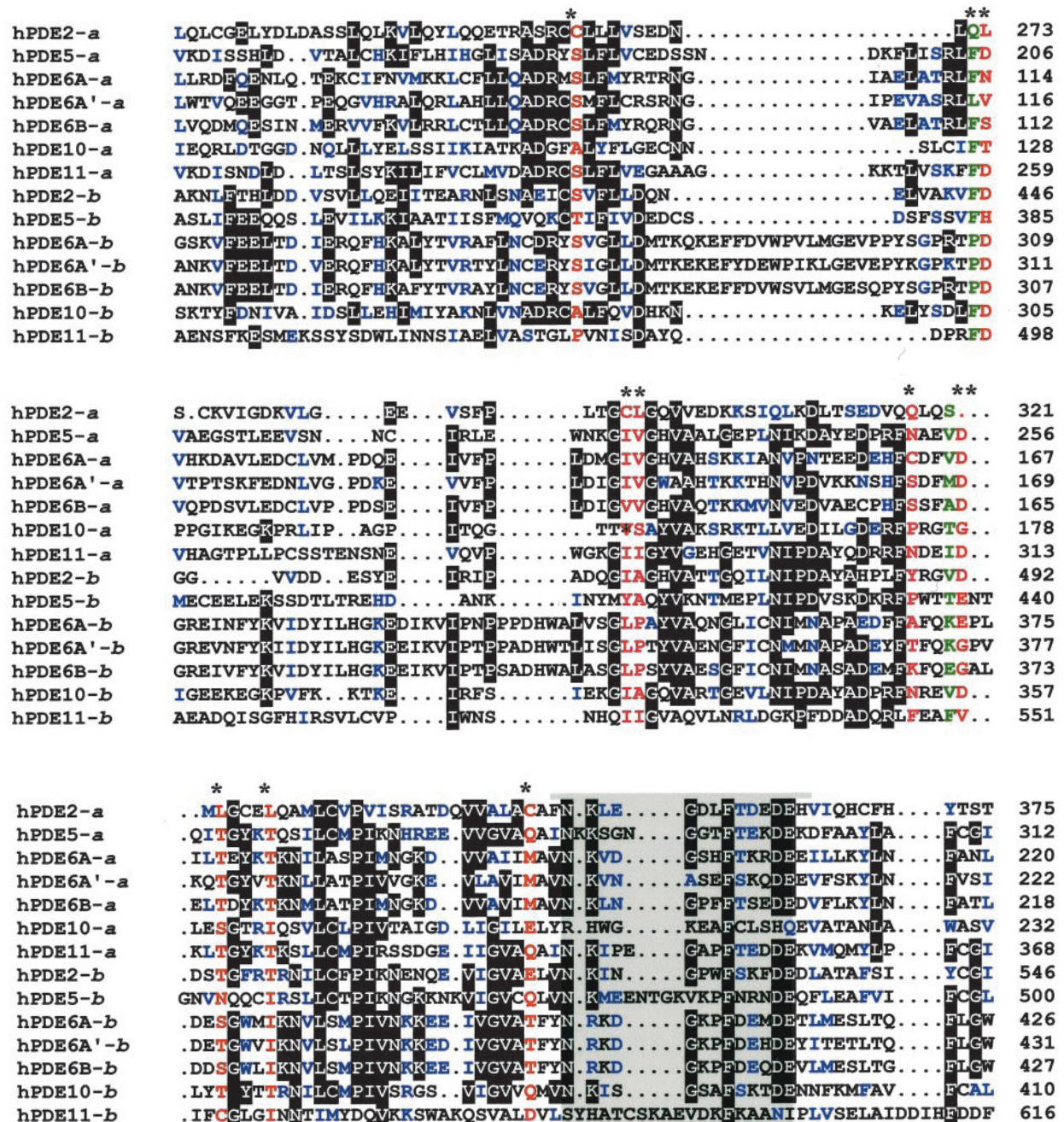


Abb. 1-3 : Clustal W Alignment der GAF-Domänen aus Säuger-PDEn (aus [35]); weiße Schrift: hoch konservierte ASn; blaue Schrift: konservierte ASn; farbige Spalten: geben den Kontakt mit cGMP an, wie er in der mPDE2 GAF-Kristallstruktur gezeigt wurde; rote Schrift: polare Seitenketten, grün: hydrophobe Seitenketten; pink: Amide; * Positionen der elf ASn, die an der Bindung des cGMP beteiligt sind; grau unterlegt: Bereich des NKFDE Motivs

Innerhalb der PDE-Superfamilie ist die Ähnlichkeit der PDE11 GAF-A mit der PDE5 GAF-B am größten (51,6%), wobei allgemein gilt, dass die Ähnlichkeit zwischen verschiedenen GAF-A bzw. GAF-B Domänen nicht signifikant größer ist, als die Ähnlichkeit zwischen einzelnen GAF-A und -B Domänen [35]. Dies würde eine gängige Theorie stützen, die davon ausgeht, dass die Tandem-GAF-Domänen aus einem einzelnen Vorgängergen, das später in der Evolution dupliziert wurde, hervorgegangen sind.

Die PDE GAF-Domänen haben, soweit bekannt, unterschiedliche Funktionen. Durch die bereits beschriebene Bindung von Liganden kann das katalytische Zentrum stimuliert werden [75, 76], die Affinität des katalytischen Zentrums für Substrate und Inhibitoren kann erhöht werden [77, 78] und die Phosphorylierung entsprechender Phosphorylierungsstellen kann verstärkt werden [79]. Zudem können GAF-Domänen für die Dimerisierung zuständig sein [73, 80], oder für sonstige Protein-Protein-Interaktionen. Zum Beispiel wurde kürzlich nachgewiesen, dass das Co-Chaperon XAP2 an die GAF-B der PDE2A bindet [81].

Mittlerweile wurden sechs Kristallstrukturen aufgeklärt: die einzelne GAF-Domäne des *Saccharomyces cerevisiae* Proteins YKG9 [70], die des bakteriellen Transkriptionsregulator CodY [82], des Transkriptionsrepressors HrcA aus *Thermogata maritima* [83] und der Chromophorbindungsdomäne DrCBD aus *Deinococcus radiodurans* [84], sowie die Tandem-GAF-Domänen der mPDE2 [73] und der cyanobakteriellen Adenylatcyclase CyaB2 [80].

Die für diese Arbeit interessanten Strukturen der GAF-Domänen der mPDE2 und CyaB2 zeigen große Unterschiede in ihrer Gesamtstruktur [73, 80]. Während die mPDE2 GAF-Domänen als paralleles Homodimer angeordnet sind, zeigt CyaB2 eine antiparallele Anordnung der beiden Monomere zueinander. Die Dimerisierung der PDE2 GAF-Domänen erfolgt über die beiden GAF-A Domänen und einen kurzen Bereich der Linker zwischen GAF-A und -B. Neben diesen Wechselwirkungen dimerisiert die PDE2 auch über eine intermolekulare Disulfidbrücke, die durch Cys-386 ausgebildet wird. Die GAF-B Domänen sind jeweils vom Linker weggedreht und liegen daher weit auseinander. In der CyaB2 erfolgt die Dimerisierung über alle vier GAF-Domänen, wobei jeweils GAF-A und -B von unterschiedlichen Monomeren miteinander wechselwirken. Die beiden Verbindungshelices zwischen GAF-A und -B verlaufen nahezu parallel zueinander, wodurch ein großer Bereich zur Interaktion ausgebildet wird. Das gesamte Homodimer ist kompakter als das der PDE2 GAF-Domänen, da sich die GAF-Domänen zur Verbindungshelix drehen. Diese beiden Strukturen deuten bereits an, dass es nicht nur eine Art der Dimerisierung zu geben scheint, sondern verschiedene in den einzelnen GAF-Tandems.

In der Art der Ligandenbindung unterscheiden sich die PDE2 und CyaB2 GAF-Domänen im wesentlichen in vier Punkten voneinander [80]. Augenscheinlich ist zunächst, dass in der PDE2 cGMP nur an die GAF-B bindet, während in der CyaB2 cAMP an beide GAF-Domänen bindet. In der PDE2 liegt der Phosphoesterring bei der Bindung in der Wannenkonformation vor, in der CyaB2 in der Sesselkonformation. Die β 2- β 3-Schleife spielt eine wichtige Rolle bei der Ligandenspezifität und weist, beim Vergleich dieser Region verschiedener GAF-Domänen, so auch der PDE2 und CyaB2, eine große Variabilität auf. Der letzte große Unterschied hat ebenfalls einen Einfluss auf die Spezifität. Arg-103 in GAF-A bzw. Arg-291 in GAF-B der CyaB2 bilden eine Wasserstoffbrücke zum N1 des cAMP aus, würden aber keine H-Brücke zum protonierten N1 des cGMP ausbilden können. In der PDE2 GAF-B befindet sich an dieser Stelle dagegen Ile-422, das nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt ist, aber sich in nicht allzu weiter Entfernung zum N1 des cGMP befindet.

1.4 Die Adenylatcyclase CyaB1 aus *Anabaena sp. PCC 7120*

Das Gen *cyaB1* aus *Anabaena sp. PCC 7120* codiert für eine Klasse-IIIb-Adenylatcyclase, die aus einem N-terminalen Tandem GAF-Ensemble, einer PAS-Domäne, der katalytischen Domäne und einer TPR-ähnlichen Domäne (*Tetratrico peptide repeat*) besteht. Eine Stimulation des katalytischen Zentrums erfolgt über Bindung von cAMP an die GAF-B. Interessanterweise stellte sich heraus, dass der Austausch der CyaB1 GAF-Domänen gegen die GAF-Domänen der rPDE2 die CyaB1 in eine cGMP-stimulierte Adenylatcyclase umwandelte, die Funktion der rPDE2 GAF-Domänen, nämlich die Stimulation des katalytischen Zentrums über Bindung von cGMP an die GAF-B, erhalten geblieben ist. Das deutete darauf hin, dass der Mechanismus der Signalweiterleitung von den GAF-Domänen auf die katalytische Domäne auch nach zwei Milliarden Jahren Evolution noch erhalten geblieben ist [60, 85]. Dies eröffnete prinzipiell die Möglichkeit die CyaB1 als Readout-System zur Untersuchung anderer GAF-Domänen zu verwenden. Dies ist, neben der PDE2, bereits mit den GAF-Domänen der PDE5 und CyaB2 gelungen [75, 86-88].

1.5 Aufgabenstellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung von Dr. T. Kanacher, dass durch einen Einbau der rPDE2 GAF-Domänen in die cyanobakterielle Adenylatcyclase CyaB1 die Funktion der GAF-Domänen erhalten geblieben ist [60, 85]. Zu diesem Zeitpunkt war die Funktion der Tandem-GAF-Domänen der PDE11A4 unbekannt [44, 45, 89, 90]. Am Anfang dieser Arbeit stand somit der Versuch des Einbaus der PDE11A4 GAF-Domänen in die CyaB1. Falls dieser gelänge, so sollte mit Hilfe der PDE11/CyaB1-Chimäre die Funktion der GAF-Domänen untersucht werden. Auch der 196 ASn lange N-Terminus sollte untersucht werden, da eine Funktion zum einen aufgrund seiner Länge und zum anderen wegen der zwei Phosphorylierungsstellen an den Positionen Ser-117 und Ser-162 nicht auszuschließen war. Außerdem sollte die Aufklärung der Kristallstruktur des GAF-Ensembles die genaue räumliche Anordnung zeigen, da bisher kein einheitlicher Aufbau des sich ausbildenden Homodimers gefunden wurde [73, 80].

2 Materialien

2.1 Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterialien

AGS, Heidelberg: Restriktionsendonukleasen mit 10x-Reaktionspuffern

American National Can, Menasha (USA): Parafilm M

Amersham Biosciences, Freiburg: *ECL Plus Western Blotting Detection System*, Hyperfilm-ECL, *Thermo-Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*, *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, [2,8-³H]-cAMP

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

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

Bachem, Bubendorf (Schweiz): zVAD (z-Val-Ala-DL-Asp-Fluoromethylketon)

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

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

Biolog Life Science Institute, Bremen: cGMP-Analoga

Bio-Rad, München: *Bio-Rad Proteinassay-Reagenz*, Ni²⁺-IDA

Biozym Diagnostics, Hess. Oldendorf: *Sequagel XR*, *Sequagel Complete Buffer Reagent*, *Chill-Out™ 14 Liquid Wax*

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

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

Fluka BioChemika, Buchs (Schweiz): SDS, Glucose, cAMP

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, 100% PEG 400, *Izit Crystal Dye*

Hartman Analytik, Braunschweig: α -³²P-ATP

ICN Biomedicals, Aurora (USA): Ethidiumbromid-Tabletten

Invitrogen, Karlsruhe: AcTEV Protease

Kimberly-Clark, Roswell (USA): *Safeskin Satin Plus*-Latex-Untersuchungshandschuhe, *Kimtech^{Science}*-Präzisionswischtücher

Macherey-Nagel, Düren: *Nucleotrap Kit*, Blotmembran *porablot PVDF* (2µm Porenweite)

Merck, Darmstadt: Aluminiumoxid 90% aktiv, Ethanol, Methanol, 2-Mercaptoethanol, DMSO, Harnstoff, Natriumpyrophosphat, Natriumchlorid, Trichloressigsäure, Chloroform, Imidazol, Glycerol 87%, Essigsäure 100%, sonstige nicht aufgeführte Chemikalien

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

New England Biolabs, Frankfurt/Main: Restriktionsendonukleasen mit 10x-Reaktionspuffern, *T4-Polynucleotid-Kinase*, BSA 100x für Molekularbiologie, cAMP-dependent Protein Kinase (PKA, catalytic subunit)

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

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

PeqLab, Erlangen: peqGOLD-Agarose, peqGOLD-Protein Marker

Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston (USA): *Ultima Gold XR*-LSC-Szintillator, Super Polyethylene Vials 20ml

Promega, Madison (USA): *Wizard Plus Plasmid Purification Kit (Minipreps)*, *Pfu*-DNA-Polymerase mit 10x-Reaktionspuffer

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

Qiagen, Hilden: *pQE30*-, *pQE60*- und *pQE80*-Expressionsvektor, *pRep4*, Ni^{2+} -NTA-Agarose, monoklonale *RGS-Tetra-His* und *Tetra-His* Antikörper

Roche Diagnostics, Mannheim: Restriktionsendonucleasen, Alkalische Phosphatase, Klenow-Polymerase jeweils mit 10x-Reaktionspuffern, *Rapid DNA Ligation Kit*, λ -DNA, ATP, dNTPs, Creatinkinase, Creatinphosphat, *Complete-EDTA-free*-Proteaseinhibitortabletten, Aprotinin, TLCK, E-64, PMSF, *Quick-Spin Columns (Sephadex G-50 (fine)) for radiolabeled DNA Purification*

Roth, Karlsruhe: Brilliantblau R250 und G250, Glycin, Ampicillin, Kanamycin, LB-Medium (Lennox)

Sartorius, Göttingen: Minisart[®] Sterilfilter (0,22µm), HAWP Filter (0,45µm), Vivaspin 2 Zentrifugalkonzentratoren

Serva, Heidelberg: TES, *Visking Dialyse*-Schlauch 8/32 (Durchmesser 6mm) und 27/32 (Durchmesser 21mm)

Sigma-Aldrich, Steinheim und Seelze: Ethanol absolut, IPTG, X-Gal, Monothioglycerol, Tris-Base, EDTA, TEMED, MOPS, Tween20, Azocasein, Dowex 50WX4-400, LB-Agar (Lennox L Agar), LB-Broth-Fertigpulver, Na-Citrat, Harnstoff, DMSO, BSA, Tetracyclin, APS, Bromphenolblau

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

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

TPP, Trasadingen (Schweiz): 50ml Zentrifugalröhrchen

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

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

2.2 Geräte

Amersham Pharmacia, Freiburg: Elektrophorese-Spannungsquellen *EPS 301*, *EPS 601*, *Macrodrive 1 Powersupply 2301 (LKB Bromma)*, *Liquid Scintillation Counter Rackbeta 1209* (LKB Wallac), *ÄKTA-FPLC-Proteinreinigungsanlage* mit Zubehör und Säulen, *Hoefler Mighty Small SE245*-Gelgießapparatur für 8x7cm Gele, *Mighty Small II*-Gellaufkammer, Kämmen und Spacer

B. Braun, Melsungen: Glashomogenisatoren

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

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

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

Bio-Rad, München: Blotapparatur *Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell*

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

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

Canon, Krefeld: *PowerShot G2* Digitalkamera

Ceag Schirp (CS) Reinraumtechnik, Borken: *Envirco*-Cleanbench

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

Edotronik, München: Drehzahlregler DR 800 für Potter RW 42

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

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

Gilson, Middleton (USA): Pipetten 1-20µl, 20-200µl

Haake, Berlin: GH Heiz-Kühlwasserbad, D8 Thermostatfühler und -regler

Heidolph, Schwabach: *MR 2002* Laborrührer

Heinemann, Schwäbisch Gmünd: *FRENCH-PRESS*-Presse mit Zubehör

Heraeus, Osterode: *Megafuge 1.0R (BS 4402/A)*, *Varifuge 3.0*, *Laminair HLB2448*

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

Janke & Kunkel, Staufen, Br.: Potter Typ RW 42 (50-1400U/min)

Junghans, Dunningen: Stoppuhren

H. Saur Laborbedarf, Reutlingen: Membranvakuumpumpe, Bachofer-Vacuum-Concentrator (*Speedvac*)

Idaho Technology, Idaho Falls (USA): *Kapillar Air Thermocycler 1605*

Infors, Bottmingen (Schweiz): *Unitron*-Kühlbrutschrank, HT-Wasserbad-Kühlschüttler

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

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

Liebherr, Kirchdorf an der Iller: Kühlschränke

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

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

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

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

Moulinex, Ecully Cedex (Frankreich): Mikrowellengeräte *Micro Chef FM B 935 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*

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

RUMED Rubarth Apparate, Laatzten: Kühlschränke

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

Schott, Mainz: Glasgeräte

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

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

TPP, Schweiz: Zentrifugenröhrchen 50ml

Vetter, Wiesloch: UV-Kontaktlampe *Chroma 43*

Wolf, Geislingen: Tischautoklav *Sanoclav*

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

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

2.3 Puffer und Lösungen

2.3.1 Molekularbiologie

2.3.1.1 Lösungen zum Arbeiten mit DNA

TAE

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

10x TBE-Puffer (LI-COR)

1,34M Tris/HCl pH 8,3
440mM Borsäure
25mM EDTA

TE-Puffer

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

BX-Puffer für Agarosegele

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

10x CM-Puffer

100mM CaCl₂
100mM MgCl₂

dNTP-Mix

20mM pro dNTP

10x Hot Air PCR-Puffer

500mM Tris/HCl pH 8,3
2,5mg/ml BSA
30mM MgCl₂

10x Dephosphorylierungspuffer

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

10x Klenowpuffer BSA-frei

200mM Tris/HCl pH 7,9
60mM MgCl₂
10mM Dithiothreitol

2.3.1.2 Nährmedien für *E. coli*

LB-Medium

20g/l LB Broth

LB-Plattenagar

35g/l LB Agar

LB-Medium mit Antibiotika

100µg/ml Ampicillin und/oder
50µg/ml Kanamycin

LB-Plattenagar mit Antibiotika

100 µg/ml Ampicillin (und
50 µg/ml Kanamycin)

2.3.2 Proteinchemie

2.3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer

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

Hoefer-Laufpuffer

25mM Tris
192mM Glycin
0,1% SDS

Sammelgelpuffer

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

4x Probenpuffer

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

Coomassie Färbelösung

45% Ethanol
10% Eisessig
0,2% Brilliant Blue R250

Coomassie Entfärbelösung

30% Ethanol
10% Eisessig

2.3.2.2 Western Blot

Towbin-Transferpuffer

25mM Tris
192mM Glycin
20% Methanol

M-TBS-T

5% Milchpulver
in TBS-T-Puffer

TBS-Puffer

20mM Tris/HCl pH 7,6
140mM NaCl

primäre Antikörper

RGS-His₄-Antikörper
0,04-0,2µg/ml in M-TBS-T

His₄-Antikörper
0,1µg/ml in M-TBS-T

TBS-T

0,1% Tween20
in TBS-Puffer

sekundärer Antikörper

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

2.3.2.3 Lösungen zur Zellyse und Ni²⁺-NTA-Reinigung

Zellwaschpuffer

50mM Tris/HCl pH 8,5

Waschpuffer A

50mM Tris/HCl, pH 8,5
400mM NaCl
2mM MgCl₂
5mM Imidazol, pH 8,5
20% Glycerol

Zellysepuffer

50mM Tris/HCl, pH 8,5
50mM NaCl
20% Glycerol
+ Complete-EDTA-free-Protease-
Inhibitortabletten⁵
(+ Imidazol, pH 8,5)⁶

Waschpuffer B

50mM Tris/HCl, pH 8,5
400mM NaCl
2mM MgCl₂
15mM Imidazol, pH 8,5
20% Glycerol

⁵ eine Tablette auf 50ml Lysepuffer

⁶ zur Verringerung unspezifischer
Wechselwirkungen; Menge an zugebenem Imidazol
ist bei den entstprechenden Proteinen angeben

Waschpuffer C

50mM Tris/HCl, pH 8,5
10mM NaCl
2mM MgCl₂
25mM Imidazol, pH 8,5
20% Glycerol

Elutionspuffer A

50mM Tris/HCl, pH 8,5
10mM NaCl
2mM MgCl₂
300mM Imidazol, pH 8,5
10% oder 35% Glycerol

Waschpuffer D

50mM Tris/HCl, pH 8,5
400mM NaCl
2mM MgCl₂
70mM Imidazol, pH 8,5
20% Glycerol

Elutionspuffer B

50mM Na₂HPO₄, pH 8,5
100mM NaCl
300mM Imidazol, pH 8,5
10% Glycerol

Waschpuffer E

50mM Na₂HPO₄, pH 8,5
100mM NaCl
70mM Imidazol, pH 8,5
10% Glycerol

Dialysepuffer A

50mM Tris/HCl, pH 8,5
10mM NaCl
2mM MgCl₂
10% oder 35% Glycerol

Waschpuffer F

50mM Na₂HPO₄, pH 8,5
100mM NaCl
10mM Imidazol, pH 8,5
10% Glycerol

Dialysepuffer B

50mM Na₂HPO₄, pH 8,5
100mM NaCl
10% Glycerol

2.3.2.4 Puffer und Lösungen für AC-Enzymtests

10x AC-Substrat-Lösung

750µM ATP pH 7,5
inkl. 16-30kBq [α -³²P]-ATP
für Kinetik-Versuche zusätzlich 200µM und 2,5mM

2x AC-Cocktail

50% Glycerol
100mM Tris/HCl pH 7,5 bzw. entspr. Puffer für pH-Abhängigkeit
10mM MgCl₂
100µg/ml BSA
(+ 0,43mg/ml Creatinkinase
+ 6mM Creatinphosphat)⁷

⁷ als regenerierendes System bei Test des ungereinigten Zelllysats

1,5x AC-Stoppuffer

3mM cAMP
3mM ATP
1,5% SDS

³H-cAMP-Lösung (interner Standard)

20mM cAMP
mit 10–20 kBq/ml [2,8-³H-cAMP] (NH₄⁺-Salz)
mit Tris-Lösung auf pH 7,5 eingestellt

2.3.2.5 Weitere Puffer

Kristallisationspuffer

10mM Tris/HCl pH 8,5
1mM MgCl₂
0,02% Thioglycerol
10% Glycerol

ÄKTA-Puffer für Superdex 200

50mM Na₂HPO₄
100mM NaCl

ÄKTA-Puffer A für MonoQ-Säule

10mM Tris/HCl pH 7,2
10% Glycerin

20x TEV-Reaktionspuffer

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

ÄKTA-Puffer B für MonoQ-Säule

10mM Tris/HCl pH 7,2
1M NaCl
10% Glycerin

Azocasein-Lösung

3% Azocasein in demineralisiertem
Wasser

2.4 Oligonukleotide

2.4.1 Klonierungsprimer

Name	⁸	Sequenz (Position)
Klonierungsprimer für PDE11/CyaB1-Chimären - CyaB1 Primer		
AC ab VEK BglII (s)	s	5'-AAA <u>AGA TCT</u> GTC GAG AAA CAA TAT CAA-3' ⁹ Pos. 1156-1173 (CyaB1-Holoenzym)
Fügt BglII-Schnittstelle vor Pos. 1156 der CyaB1 ein; Val entstand durch Verknüpfung der GAF-Domänen der PDE11 mit CyaB1 über Sal und Xho (ursprünglich in CyaB1: Leu-386)		
PDE11 MfeI (as)	as	5'-TTT <u>CAA TTG</u> GTA CAA TTT CCC AAA-3' Pos. 1340-1363 (CyaB1-Holoenzym)
Primer für MfeI-Schnittstelle an Pos. 1356 (CyaB1-Holoenzym)		
AC Ende SmaI (as)	as	5'-TTT <u>CCC GGG</u> CTG CAG GAA TTC ACT-3' Pos. 2613-2633
CyaB1 + 26 bp genomische <i>Anabaena</i> Sequenz + 21 bp Polylinker aus pGEM-Teasy + MCS von pQE30 (Klon VP321,6 K3; S. 41 [85])		
- PDE11A4 Primer		
NcoI MAAS (s)	s	5'-AAA <u>CCA TGG</u> ATG GCA GCC TCC CGC CTG-3' Pos. 1-18
Fügt NcoI-Schnittstelle vor Pos. 1 ein		
PDE11BamHI (s)	s	5'-AAA <u>GGA TCC</u> ATG GCA GCC TCC CGC CTG GAC-3' Pos. 1-21
Fügt BamHI-Schnittstelle vor Pos. 1 ein		
154er N-Term Nde (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> AGT CAG GGT CAG GGG GCT-3' Pos. 127-144
Für N-Terminus-Verkürzung ab Ser-43; fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 127 ein		
PDE11KpnI (s)	s	5'-AAA <u>GGT ACC</u> AGC AGC TTG GCT CAC AGC-3' Pos. 169-192
Primer für KpnI-Schnittstelle an Pos. 173		
87er N-Term Nde (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> GGG AAC CTG CAG CGG AGA-3' Pos. 328-345
Für N-Terminus-Verkürzung ab Gly-110; fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 328 ein		
PDE11A4 S117D sense	s	5'-CCT GCA GCG GAG AGC <i>Tga</i> TCA GAA AGA GCT AAG G-3' Pos. 333-366
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Ser-117 zu Asp-117		
PDE11A4 S117D antisense	as	5'-CCT TAG CTC TTT CTG <i>Atc</i> AGC TCT CCG CTG CAG G-3' Pos. 333-366
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Ser-117 zu Asp-117		

⁸ Orientierung

⁹ unterstrichen: Erkennungssequenz für Restriktionsenzym
Fettdruck, kleingeschrieben: eingefügte Mutation

Name	⁸	Sequenz (Position)
PDE11A4 S117E sense	s	5'-CCT GCA GCG GAG AGC <i>Tga aCA</i> GAA AGA GCT AAG G-3' Pos. 333-366
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Ser-117 zu Glu-117		
PDE11A4 S117E antisense	as	5'-CCT TAG CTC TTT CTG <i>ttc</i> AGC TCT CCG CTG CAG G-3' Pos. 333-366
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Ser-117 zu Glu-117		
78er N-Term Nde (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> AAA GAG CTA AGG AAG AGT-3' Pos. 355-372
Für N-Terminus-Verkürzung ab Lys-119; fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 355 ein		
48er N-Term Nde (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> CTG AGT AGT GTG CGA CGG-3' Pos. 445-462
Für N-Terminus-Verkürzung ab Leu-149; fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 445 ein		
PDE11A4 S162D sense	s	5'-CTT CTC CGG AAG GCA <i>gaC</i> TCC CTG CCC ACC-3' Pos. 469-501
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Ser-162 zu Asp-162		
PDE11A4 S162D antisense	as	5'-GGT GGG GGG CAG GGA <i>Gtc</i> TGC CTT CCG GAG AAG-3' Pos. 469-501
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Ser-162 zu Asp-162		
PDE11A4 S162E sense	s	5'-CTT CTC CGG AAG GCA <i>gaa</i> TCC CTG CCC ACC-3' Pos. 469-501
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Ser-162 zu Glu-162		
PDE11A4 S162E antisense	as	5'-GGT GGG GGG CAG GGA <i>ttc</i> TGC CTT CCG GAG AAG-3' Pos. 469-501
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Ser-162 zu Glu-162		
33er N-Term Nde (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> CTG CCC ACC ACA GCC-3' Pos. 490-507
Für N-Terminus-Verkürzung ab Leu-164; fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 490 ein		
28er N-Term Nde (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> GCC CAT ATT CTC AGT GCG-3' Pos. 505-522
Für N-Terminus-Verkürzung ab Ala-169; fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 505 ein		
20er N-Term Nde (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> GAA TCG AGA GTG AAT CTG-3' Pos. 529-546
Für N-Terminus-Verkürzung ab Glu-177; fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 529 ein		
10er N-Term Nde (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> CCT ACA GCC ATC GAC TAC-3' Pos. 559-576
Für N-Terminus-Verkürzung ab Pro-187; fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 559 ein		
BamHI KKH (as)	as	5'-AAA <u>GGA TCC</u> ATG CTT TTT CAG ATG GCA-3' Pos. 580-597
Fügt BamHI-Schnittstelle hinter Pos. 597 ein		
SalI KKH (as)	as	5'-AAA <u>GTC GAC</u> ATG CTT TTT CAG ATG GCA-3' Pos. 580-597
Fügt SalI-Schnittstelle hinter Pos. 597 ein		

Name	⁸	Sequenz (Position)
PDE11SfuI (s)	s	5'-AAA <u>TTC GAA</u> CTG AAA AAG CAT AAT GAG CGT-3' Pos. 586-606
Fügt SfuI-Schnittstelle vor Pos. 586 ein		
PDE11NdeI (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG</u> AAA AAG CAT AAT GAG CGT CAG-3' Pos. 589-609
Fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 589 ein		
PDE11 ab KH Nde (s)	S	5'-AAA <u>CAT ATG</u> AAG CAT AAT GAG CGT CAG-3' Pos. 592-609
Fügt NdeI-Schnittstelle vor Pos. 592 ein		
PDE11F312A (s)	s	5'-TCC AAA TTC <u>gcT</u> GAT GTG CAT GCA-3' Pos. 763-786
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Phe-312 zu Ala-312		
PDE11D313A (as)	as	5'-TGC ATG CAC <u>AgC</u> AAA GAA TTT GGA-3' Pos. 763-786
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Asp-313 zu Ala-313		
PDE11 D355A (s)	s	5'-AAG <u>GAG CTC</u> CAT TTA CTG AAG ATG <u>cTG</u> AAA AAG TTA TGC AGA-3' Pos. 1040-1081
Mutageneseprimer; mutiert Asp-355 zu Ala-355; enthält SacI-Schnittstelle (Pos. 1047)		
PDE11StuI (as)	as	5'-TTT <u>AGG CCT</u> GTT GAA GCA ACC AGC TCA-3' Pos. 1428-1451
Primer für StuI-Schnittstelle an Pos. 1448		
PDE11D534A (s)	s	5'-GAT GAT GCA <u>GcT</u> CAA CGA CTT TTT-3' Pos. 1618-1641
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Asp-534 zu Ala-534		
PDE11Q535E (as)	as	5'-AAA AAG TCG <u>Ttc</u> ATC TGC ATC ATC-3' Pos. 1618-1641
Mutageneseprimer für Fusions-PCR; mutiert Gln-535 zu Glu-535		
PDE11SalI (as)	as	5'-AAA <u>GTC GAC</u> CTT CAC TTG ATC ATA CAT AAT-3' Pos. 1684-1704
Fügt SalI-Schnittstelle hinter Pos. 1704 ein		
- PDE11A3Primer		
PDE11A3BamHI (s)	s	5'-AAA <u>GGA TCC</u> ATG CTG AAG CAG GCA AGA AGA CCT TTA TTC AGA AAT GTG CTC AGT GCC ACA CAG TGG AAA AAG GTG AAA ATC ACA AGA CTG GTC CAA TCT CTG GGG CCT CT-3' Pos. 1-102 (PDE11A3) grau: Überlapp mit PDE11A3Xho(as)
Template für die ersten 34 Asn der PDE11A3 (Met-1 bis Ser-34); fügt zudem BamHI-Schnittstelle vor Pos. 1 ein		

Name	⁸	Sequenz (Position)
PDE11A3Xho (as)	as	5'-AAA <u>CTC GAG GCT GCC ATC</u> TTT GTT TTT GTT TGC CTC TGT AT AAG AAA ATC CTG GTG CTT TTC CTG TTT TTC AGC CAA AGA GGC CCC AGA GAT TTG GAC CAG TCT TGT GATT-3' Pos. 69-162 (PDE11A3) und Pos. 1-10 (PDE11A4) grau: Überlapp mit PDE11A3BamHI(s) gestrichelte Linie: PDE11A4
Template für die ASn Leu-35 bis Lys-54 der PDE11A3 und die ersten drei AS der PDE11A4; fügt zudem XhoI-Schnittstelle hinter Pos. 10 (PDE11A4) ein		
PDE11A4forA3XhoI (s)	s	5'-AAA <u>CTC GAG GCT GGA CTT CGG GGA GGT</u> -3' Pos. 9-32 (PDE11A4)
Übergangsstück zwischen dem PDE11A3 und dem PDE11A4 N-Terminus; fügt XhoI-Schnittstelle an Pos. 10 durch Silent Mutation ein		
PDE11A4forA3Bam (as)	as	5'-AAA <u>GGA TCC TGG TAG GCA TCA CTG</u> -3' Pos. 1464-1484
Antisense-Primer für Übergangsstück zwischen PDE11A3 und PDE11A4 N-Terminus; enthält BamHI-Schnittstelle von Pos.1479		
PDE11A3 MLKQ NdeI (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG CTG AAG CAG GCA AGA AGA CCT</u> -3' Pos. 1-24 (PDE11A3)
Fügt NdeI-Schnittstelle vor dem PDE11A3 N-Terminus ein		
PDE11A3 MLKQ Ende (as)	as	5'-CTT TGT TTT TGT TTG CCT CTG-3' Pos. 142-162 (PDE11A3)
Antisense-Primer für die letzten 21 bp des PDE11A3 N-Terminus		
PDE11A3 DRRF Begin (s)	s	5'-CAA ACA AAA ACA AAG <u>GAT CGA CGA TTC AAT</u> -3' Pos. 148-162 (PDE11A3) und 913-927 (PDE11A4) gestrichelte Linie: PDE11A4
Primer für den Übergang vom PDE11A3 N-Terminus in die GAF-A (Beginn der GAF-A entspricht Pos. 913 der PDE11A4 bzw. Asp-305)		
Klonierungsprimer für PDE11-GAF-Kristallisationskonstrukte		
Cryst3NcoI (s)	s	5'-AAA <u>CCA TGG ATG GCA GCC TCG AGG</u> -3' Pos. 1-15
Fügt NcoI-Schnittstelle vor Pos. 1 ein		
Cryst2NcoI (s)	s	5'-AAA <u>CCA TGG ATG AAT CTG CCT CAG TAT CCC</u> -3' Pos. 541-558
Fügt NcoI-Schnittstelle vor Pos. 541 ein		
GAFa ab NLP Bam (s)	s	5'-AAA <u>GGA TCC AAT CTG CCT CAG TAT CCC</u> -3' Pos. 541-558
Fügt BamHI-Schnittstelle vor Pos. 541 ein		
PDE11 Nde TEV (s)	s	5'-AAA <u>CAT ATG GAG AAT CTT TAC TTC CAA GGG GGA GGA GGA CCT ACA GCC ATC GAC TAC A</u> -3' Pos. 559-577 gestrichelte Linie: TEV-Schnittstelle
Fügt NdeI-Schnittstelle und Triplets für TEV-Schnittstelle vor Pos. 559 (vor Pro-187) ein		

Name	⁸	Sequenz (Position)
Cryst KKH NcoI (s)	s	5'-AAA <u>CCA TGG</u> ATG AAA AAG CAT AAT GAG CGT-3' Pos. 589-606
Fügt NcoI-Schnittstelle vor Pos. 589 ein		
PDE11NcoI (s)	s	5'-AAA <u>CCA TGG ACC</u> TTG ACC TCA CCA GC-3' Pos. 644-660
Fügt NcoI-Schnittstelle vor Asp-215 ein		
CrystSacI (as)	as	5'-AAA AGT AAA TGG <u>AGC TCC</u> TTC-3' Pos. 1039-1056
Primer für SacI-Schnittstelle an Pos. 1047		
GAFa Ende BglII (as)	as	5'-TTT <u>AGA TCT</u> TAT GGC GAT TCC ACA AAA-3' Pos. 1093-1110
Fügt BglII-Schnittstelle hinter Pos. 1110 ein		
PDE11BamBglEco (s)	s	5'-TAC CAa GAT CCG CGC TTT GAT GCA GAG GCA GAC CAG ATt TCT GGT TTT CAC ATA AGg TCT GTT CTT TGT-3' Pos. 1474-1542
Zur Mutation der BamHI-, EcoRV- und BglII-Schnittstellen in der GAF-B		
PDE11BamBglEco (as)	as	5'-AGA cCT TAT GTG AAA ACC AGA aAT CTG GTC TGC CTC TGC ATC AAA GCG CGG ATC tTG GTA GGC ATC-3' Pos. 1468-1533
Zur Mutation der BamHI-, EcoRV- und BglII-Schnittstellen in der GAF-B		
PDE11BamHI (as)	as	5'-AAA <u>GGA TCC</u> GGC CCA GGA CTT CTT CAC TTG ATC ATA CAT-3' Pos. 1687-1716
Fügt BamHI-Schnittstelle hinter Pos. 1716 ein		

2.4.2 Sequenzierprimer

Name		Sequenz (Position)	T _m	Zielsequenz
T3	s	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3' 772-791	56°C	pBSK
T7	as	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' 626-645 463-482 5320-5249	56°C	pBSK pET16b pET16b mit pQE30 MCS
U-pQE-IR	s	5'-GAA TTC ATT AAA GAG GAG AAA-3' 88-108 88-108 88-108	54°C	pQE30 pQE60 pQE80
R-pQE-IR	as	5'-CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G-3' 212-233 177-198 212-233	54°C	pQE30 pQE60 pQE80

Name		Sequenz (Position)	T _m	Zielsequenz
pRSET reverse	s	5'-TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG-3' 258-277	56 °C	pET16b
R-800-pETMCS pQE30	as	5'-ACC CCT CAA GAC CCG TTT AGA-3' 5423-5443	56°C	pET16b mit pQE30 MCS
PDE11 GAF	as	5'-CTC CAG GTC AGT CTG TTC TTC-3' 1192-1212	56°C	PDE11 Holo
PDE11 GAFa	as	5'-GAG GTC AAG GTC ATT GGA GAT-3' 634-654	56°C	PDE11 Holo
U-IR-800 CyaB1-PAS2	s	5'-GCT TGT CAG ATG CTG TAA TTT C-3' 1190-1211	56°C	CyaB1 Holo
R-IR-800 CyaB1-GAF	as	5'-ACT TTT ATG ATT AGC ATC ACC-3' 1279-1299	56°C	CyaB1 Holo
U-IR-800 CyaB1-Kat	s	5'-GAT GCC TTA ATG GTT GGT G-3' 1768-1786	56°C	CyaB1 Holo

2.5 Plasmide

Verwendung fanden die Plasmide pBluescript II SK (-) (von Fa. Stratagene), pET16b (von Fa. Novagen) und pQE30, pQE60, pQE80 (von Fa. Qiagen). Beschreibungen der Plasmide finden sich auf den Homepages der entsprechenden Hersteller. Zusätzlich wurde ein pET16b-Vektor verwendet, der die MCS des pQE30-Vektors enthält (von Anita Schultz kloniert).

3 Methoden

3.1 Gentechnologische Methoden

3.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA

3.1.1.1 Plasmidisolierung von DNA

Aus dem Glycerolstock wurde eine 5ml LB-Medium Kultur angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C kultiviert. Die anschließende Ernte und Plasmidisolierung erfolgte gemäß dem Protokoll des *Wizard Plus Plasmid Purification Kits* (für bis zu 50µg DNA). Die DNA wurde mit 50-75µl Wasser eluiert und bei 4°C oder -20°C gelagert.

3.1.1.2 Auftrennung und Detektion von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle oder Trennung der DNA wurden PCR-Produkte oder mit Restriktionsendonukleasen verdaute DNA mit BX-Puffer versetzt (Verhältnis ca. 1:3) und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei 90-105V für 30-60min. Zum Anfärben wurde das Gel für 2min in ein Ethidiumbromidbad (10mg/l) gelegt. Die Detektion erfolgte nach weiteren 10min Elektrophorese bei 302nm. Als Standard zur Fragmentgrößenbestimmung dienten *EcoRI/HindIII* verdaute λ -DNA (λ -Marker) und *MspI/SspI*-verdautes Plasmid *pBlueskript II SK(-)* (π -Marker).

λ -Marker	π -Marker
21226bp	489bp
5148bp	404bp
4973bp	312bp
4268bp	270bp
3530bp	242/241bp
2027bp	215bp
1904bp	190bp
1584bp	157bp
1375bp	147bp
947bp	110bp
831bp	67bp
564bp	57bp
125bp	34bp
	26bp

Die Konzentration des Agarosegels richtete sich nach den zu erwartenden Fragmentgrößen:

≥ 800 bp	1%
500–800 bp	2%
≤ 500 bp	4%

3.1.1.3 Isolierung von DNA aus Agaraosegelen

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und nach Herstellerangaben des *NucleoTrap Kits* oder des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits* aufgereinigt. Die DNA wurde mit 20-50µl Wasser eluiert und bei 4°C oder -20°C gelagert.

3.1.1.4 Isolierung, Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA aus wässrigen Lösungen

3.1.1.4.1 Entsalzen von DNA

Mit den unter 3.1.1.3 beschriebenen Kits konnte eine DNA-Lösung auch entsalzt werden, falls mehrere Reaktionsschritte in unterschiedlichen Puffern notwendig waren. Elution und Lagerung erfolgten analog.

3.1.1.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus DNA-haltigen Lösungen, v.a. nach Plasmidisolierung aus *BL21(DE3)[pRep4]*-Zellen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Plasmidisolierung wurde wie unter 3.1.1.1 beschrieben durchgeführt, allerdings wurde mit TE-Puffer anstelle von Wasser eluiert. Zum Eluat wurde das gleiche Volumen einer mit Tris/HCl pH 8,0 gesättigten Phenollösung gegeben. Nach ca. einminütigem Vortexen wurde 1min bei 12000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Zwischen der oberen wässrigen und der unteren organischen Phase bildet sich eine weiße Interphase, die Proteine enthält. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in einem neuen Eppi-Cup dreimal mit dem gleichen Volumen eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (1:24) zum Entfernen des Phenols versetzt, aufgeschüttelt und zentrifugiert.

Die proteinfreie wässrige DNA-Lösung mußte anschließend noch durch Ethanol-fällung konzentriert werden, d.h. das exakte Volumen der wässrigen DNA-Lösung wurde bestimmt. Nach Zugabe des 0,1-fachen Volumens an 3M NaOAc bzw. des 0,375-fachen Volumens an 10M NH₄OAc und der 2,5-fachen Menge des Gesamtvolumens an 96%igem Ethanol (4°C) wurde gevortext und der Ansatz zur Ethanol-fällung für 30-60min bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wurde für 20-30min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und 500µl Ethanol 70% (4°C) wurden zum Waschen zugegeben. Nach weiteren 10min Zentrifugation (12000xg, 4°C) wurde der Überstand abgeschüttelt, kurz zentrifugiert und das restliche Ethanol mit einer Pipette entnommen. Zum Trocknen stand das Cup für ca. 10min bei Raumtemperatur. Abschließend wurde der Niederschlag mit Wasser aufgenommen.

3.1.1.4.4 Aufkonzentrierung

Falls eine Aufkonzentrierung wässriger DNA-Lösungen notwendig war, so wurde diese bei 40°C und ca. 100mbar für 5-20min in der *SpeedVac* durchgeführt.

3.1.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration wurde entweder durch den Vergleich der Intensität der Bandenstärke einer DNA-Probe mit DNA-Markerbanden auf einem Agarosegel abgeschätzt, oder mit dem Eppendorf Fotometer bei $\lambda=260\text{nm}$ bestimmt. Zudem konnte bei 280nm auf Proteinverunreinigungen geprüft werden. Das Verhältnis $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.1.2 Enzymatische Reaktionen

3.1.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wird die Polymerasekettenreaktion durchgeführt [91, 92]. Ein üblicher PCR-Ansatz enthält in einem 50µl Volumen 1-5ng der zu amplifizierenden DNA als Template, die Primer (jeweils 500nM), je 200µM der dNTPs, 1U *Taq*-Polymerase bzw. 2U *Pfu*-Polymerase, sowie 5µl des entsprechenden 10x Puffers (mit 2mM MgCl₂). Teilweise war der Zusatz von 5% DMSO oder 100ng *Single Strand Binding Protein (SSB)* notwendig.

Das im Thermocycler zu durchlaufende Programm sah wie folgt aus:

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	5min	-
Denaturierung	95°C	1min	20-35
Annealing	variabel	1min	
Elongation	72°C	2min	
Auffüllen	72°C	5min	-
Kühlen	4°C	Pause	-

Die Anlagerungstemperatur errechnete sich nach folgender Formel:

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

Sofern sich die Temperaturen zweier gemeinsam benutzter Primer unterschieden, wurde mit der niedrigeren gearbeitet.

Bei der Durchführung einer Fusions-PCR zum Zusammenfügen zweier PCR-Produkte wurde zur Anlagerung häufig ein Temperaturgradient eingestellt. Während der ersten fünf Zyklen wurde eine Temperatur gewählt, die etwa 8°C unter der errechneten Annealingtemperatur lag. Für die folgenden 20-25 Zyklen wurde die Temperatur um 2-6°C erhöht.

Zur Amplifizierung mancher DNA-Stücke hat sich die *HotAir*-PCR bewährt, da diese eine sehr schnelle Einstellung der jeweiligen Temperatur ermöglicht. Die Reaktion fand nicht in Standard Eppi-Cups, sondern in Glaskapillaren (5,1cm Länge) statt. Das Gesamtvolumen betrug 10µl und anstelle der kommerziellen Puffer wurde hier ein spezieller *HotAir*-Puffer verwendet (2.3.1.1). Auch das Programm war leicht modifiziert:

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	30sek	-
Denaturierung	95°C	10sek	20
Annealing	variabel	10sek	
Elongation	72°C	100sek	
Auffüllen	72°C	30sek	-
Kühlen	4°C	Pause	-

Nach Durchführung der PCR wurden die Ansätze über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA aufgereinigt.

3.1.2.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger [93] mit einem *Thermo-Sequenase Primer Cycle Sequencing* Kit. Zunächst wurde ein sogenannter Premix vorbereitet. Dieser enthielt:

- 130ng DNA pro 1000bp Plasmid
- 1µl Sequenzierprimer (5'-IRD 800-markiert, 4µM)
- 0,7µl DMSO
- Wasser ad 13µl

Je 2µl der Reaktionslösung (enthält jeweils ein ddNTP, vier dNTPs, 7-deaza-dGTP, Reaktionspuffer mit Mg²⁺, Pyrophosphatase und DNA-Polymerase [94] des Kits) wurden mit 3µl des Premixes zusammengegeben und kurz gevortext.

Die Reaktionsansätze wurden mit je einem Tropfen *Chill-Out 14 Liquid Wax* überschichtet, zentrifugiert und die Reaktion wurde schließlich auf dem *TRIO-Thermoblock Thermocycler* gestartet.

Das Programm unterschied sich von dem der Standard-PCR:

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	2min	-
Denaturierung	95°C	20sek	20-30
Annealing	variabel	20sek	
Elongation	72°C	30sek	
Auffüllen	72°C	30sek	-
Kühlen	4°C	Pause	-

Nach Reaktionsende wurde das gleiche Volumen Formamid-Stoppuffer zur Denaturierung zugegeben, gevortext und zentrifugiert.

Je 1-1,2µl der Proben wurden auf ein 6% Polyacrylamidgel mit 7M Harnstoff im *LI-COR*-Sequenator aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 50°C, 50W, einer maximalen Spannung von 1500V und einer Stromstärke von 37mA.

Die Auswertung des Gels erfolgte anschließend mit der *BaseImagIR version 4.0* Software, sowie dem *DNA-Star* Paket.

3.1.2.3 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Ein typischer Ansatz von 10µl enthielt 200-500ng Plasmid-DNA, 1U Enzym, sowie häufig zur Stabilisierung der Enzyme 3-5µg *purified BSA*. Die Inkubationszeit betrug meist 60min. Zur Kontrolle oder zur Gewinnung der entstandenen DNA-Fragmente wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

3.1.2.4 Glätten von DNA-Überhängen

Um glatte (*blunt*) DNA-Enden zu erzeugen, wurde nach einer PCR oder nach einem Restriktionsverdau das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt 7,2µl DNA, 1µl 10x Klenow-Puffer und 0,8U Klenowenzym (1µl).

Zum Glätten von 3'-Überhängen wurde zunächst 10min bei 37 °C inkubiert, zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurde ein Mix mit 2mM von jedem dNTP zugegeben und der Ansatz für weitere 40min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C 10min denaturiert.

3.1.2.5 5'-Dephosphorylierung

Um eine Religation linearisierter Plasmide, in die DNA-Fragmente eingebaut werden sollen, zu verhindern, wurden diese zur Dephosphorylierung mit *Alkalischer Phosphatase* (AP) behandelt. Während des Restriktionsverbaus oder im Anschluss daran wurde das Plasmid mit 1U AP umgesetzt. Die Reaktion erfolgte im Normalfall in einem Gesamtvolumen von 10µl für 1,5h bei 37°C.

3.1.2.6 5'-Phosphorylierung

Zum Einbau in dephosphorylierte Plasmide mußten PCR-Produkte am 5'-Ende phosphoryliert werden, da *Taq*- und *Pfu*-Polymerase keine phosphorylierten 5'-Enden erzeugen. Dazu wurde das PCR-Produkt mit 10U der *T4-Polynucleotidkinase* (PNK) und 1mM ATP in PNK-Puffer für 1h bei 37°C inkubiert.

3.1.2.7 Ligation von DNA-Molekülen

Der *Rapid DNA Ligation* Kit wurde zur Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren gemäß Herstellerangaben verwendet. Das ideale Stoffmengenverhältnis betrug 1:1 bis 1:3, wobei vom Vektor i.d.R. 50ng eingesetzt wurden. Die Ligationsdauer betrug 15-30min bei Raumtemperatur.

3.1.3 Transformation von *E. coli*

3.1.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Aus dem Glycerolstock wurden *E. coli*-Zellen in 5ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C angezogen. Bei *BL21(DE3)[pRep4]*-Zellen wurde Kanamycin (50µg/ml), bei *XLI*-Zellen Tetracyclin (10µg/ml) zugesetzt.

Die Vorkultur wurde zu 200ml frischem LB-Medium gegeben (bei *BL21(DE3)[pRep4]*-Zellen unter Kanamycin-Zusatz) und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,6 (nach ca. 3h) inkubiert.

Die Zellen wurden für 15-20min auf Eis gekühlt und anschließend für 10min bei 2000xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50ml eisgekühlter 0,1M CaCl₂-Lösung vorsichtig resuspendiert und für 20min auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 10ml 0,1M CaCl₂/20% Glycerol-Lösung vorsichtig resuspendiert und für 4-6h auf Eis unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Das Calcium sorgte für eine erhöhte Porosität der Zellmembran, so dass bei einer späteren Transformation die Aufnahme der Plasmide erleichtert wurde.

Die Zellen wurden zu je 100µl in Eppi-Cups abgefüllt und bei -80°C gelagert.

3.1.3.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli*-Zellen wurde ein kompletter Ligationsansatz (3.1.2.7) zusammen mit 69µl Wasser und 10µl CM-Puffer 10x auf 100µl aufgetaute *E. coli*-Zellen gegeben. Zur Aufnahme der Plasmide wurden die Zellen zunächst für 20min auf Eis, dann für 45-60sek bei 42°C und nochmals für 10min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500µl LB-Medium wurde für 60-90min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100-300µl auf einer Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Retransformation von Plasmiden aus MiniPrep-Lösungen war es ausreichend, 1µl der entsprechenden DNA-Lösung auf 100µl *E. coli*-Zellen zu geben und dann wie oben beschrieben fortzufahren.

3.1.3.3 *E. coli*-Dauerkulturen

Zur Lagerung von Plasmiden wurden Glycerolstocks angelegt. 3ml Übernachtskultur wurden in einem Eppi-Cup in zwei Schritten abzentrifugiert und vorsichtig in 600µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden 200µl Glycerol 87% zugegeben, um ein vollständiges Gefrieren der Suspension zu vermeiden. Die Glycerolstocks wurden bei -80°C gelagert.

3.1.3.4 Blau-Weiß-Screen

Um die Rekombination eines *pBluescript II SK(-)*-Vektors zu überprüfen, wurde ein Blau-Weiß-Screen durchgeführt. Auf vorgetrocknete LB-Platten wurden je 40µl 0,1M IPTG und 40µl 2% X-Gal aufgetragen und die transformierten Zellen ausgestrichen (37°C, O/N). Bakterienkolonien, die inserthaltige Plasmide trugen, erschienen weiß, solche ohne Insert waren blau gefärbt.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Biorad Proteinbestimmung¹⁰

1-5µg proteinhaltiger Lösung wurden mit Wasser auf 800µl aufgefüllt und mit 200µl des Biorad-Reagenzes versetzt. Nach Vortexen und fünfminütiger Inkubation wurde bei $\lambda = 595\text{nm}$ vermessen. Als Proteinstandard dienten 0, 2, 4, 6, 10, 12µg BSA.

3.2.2 Proteinfällung mit TCA

Die zu fällende Proteinlösung wurde mit dem doppelten Volumen an Wasser verdünnt und 10% TCA Endkonzentration zugegeben. Nach einer Stunde auf Eis, wurde 5min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden 300µl Ethanol zugegeben und erneut 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend mit 5µl SDS Probenpuffer aufgenommen.

¹⁰ modifiziert nach [95]

3.2.3 SDS-PAGE

Mit der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli [96] wurden Proteine aufgetrennt. Die Proben wurden mit 5µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt, zur Denaturierung für 5min auf 95°C erhitzt und anschließend auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

Zur Analyse unlöslicher Proteine wurden 50-60mg der Zellpellets, die nach Lyse der Zellen und Zentrifugation bei 48000xg erhalten wurden (3.3.4) eingewogen, in 50µl SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 5min auf 95°C erhitzt und anschließend mit 50µl Wasser vermischt. Auf das Gel wurden 2-7µl aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in einer *Hoefer Mighty Small SE45* Vertikalelektrophoresekammer bei 20mA pro Gel für etwa 1h.

Trenngel pH 8,8 (12,5%)		Sammelgel pH 6,8 (4,5%)	
Trenngelpuffer	3ml	Sammelgelpuffer	1ml
Wasser	4ml	Wasser	2,4ml
Acrylamid/Bisacrylamid 37,1:1 30%	5ml	Acrylamid/Bisacrylamid 37,1:1 30%	0,6ml
TEMED	10µl	TEMED	10µl
APS	80µl	APS	40µl

Zusammensetzung der Acrylamidgele; Menge für zwei Minigele

Das Gel wurde anschließend entweder für den Western Blot vorbereitet (3.2.4) oder mit *Coomassie Brilliant Blue* ca. 45min angefärbt, daraufhin zunächst mit Entfärbelösung und abschließend in Wasser entfärbt.

Standards für die Gelelektrophorese:

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

Zur Dokumentation der erhaltenen Gele wurde die *Biocapt Software* verwendet.

3.2.4 Western Blot

Mit einem Western Blot war ein deutlich empfindlicherer Nachweis möglich, da die Detektion über spezifische Antikörper erfolgte.

Nach der SDS-PAGE folgte das eigentliche Blotting, d.h. die Übertragung der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran mittels Semidry-Elektrotransfers [97, 98]. Eine Membran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten (ca. 6x8cm), quoll für 10min in Methanol (wässrige Lösungen benetzen trockene PVDF-Membranen nicht) und wurde danach für 10min in

Wasser eingeweicht. Anschließend wurden Membran, Gel und sechs zurechtgeschnittene (6x9,5cm) *Whatman 3MM-Paper* in Towbin Blotpuffer voräquilibriert. Auf der Anodenplatte der Blotkammer wurden drei *Whatman-Paper*, die Membran, das Gel und wiederum drei *Whatman-Paper* aufgeschichtet und für 3h bei 200mA (für eine Membran) geblottet. Anschließend wurden die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran durch Schütteln in M-TBS-T-Lösung blockiert (20min). Nach zweimaligem Waschen für 2min in TBS-T erfolgte die Bindung des primären Antikörpers. Die Membran schüttelte für ca. 1h in einer AK-haltigen M-TBS-T-Lösung bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T (jeweils 5min) wurde die Membran in eine M-TBS-T-Lösung mit sekundärem Antikörper gegeben und ebenfalls für 1h geschüttelt. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Chemilumineszenzreaktion mit dem *ECL Plus Western Blot Detection System* nach Herstellerangaben durchgeführt, die Belichtungszeit betrug 5sek bis 10min. Zur Dokumentation wurde auch hier die *Biocapt Software* verwendet.

3.2.5 Proteinexpression in *E. coli*¹¹

Aus dem Glycerolstock wurde eine Vorkultur in 50-150ml LB-Medium mit 50µg/ml Kanamycin und 100µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C kultiviert. 200ml LB-Medium (ebenfalls mit 50µg/ml Kanamycin und 100µg/ml Ampicillin) wurden mit 5-15ml Vorkultur angeimpft und wuchsen, je nach Konstrukt, bei 21-30°C an. Bei einer OD von etwa 0,6 wurde auf die Expressionstemperatur eingestellt und mit 200-1000µM IPTG induziert. Die übliche Expressionsdauer war 4-16h.

Für die Ernte wurde in 250ml Metallbechern für 10min bei 4°C und 3200xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und ein bis vier Pellets wurden in einem Falcon vereinigt und in 30-40ml 50mM Tris/HCl pH 8,5 auf Eis resuspendiert. Anschließend wurde für 20-30min bei 4°C und 4500rpm in der *Heraeus Megafuge* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden entweder bei -80°C eingelagert oder lysiert.

3.2.6 Lyse

Das Zellpellet wurde in etwa 20ml Lysispuffer, eventuell mit zugesetztem Proteaseinhibitor-Cocktail (*Complete EDTA-free-Tabletten*), resuspendiert und in zwei bis drei Durchgängen mit der *French Press* aufgebrochen (Druck \geq 1000 psi). Die Proteine zur Umsetzung mit dem Prostatahomogenat (4.3) wurden durch Behandlung mit Ultraschall unter Eiskühlung lysiert (7 x 5sek mit dem *Branson Sonifier B-12*, Stufe 3). Im Anschluß erfolgte zur Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile eine Zentrifugation für 30min bei 4°C und 48000xg.

3.2.7 Ni²⁺-NTA-Affinitätsreinigung

Die Expressionsvektoren enthielten N- oder C-terminal einen poly-Histidin-Tag (His-Tag), zum einen zur Detektion beim Western Blot (3.2.4), zum anderen zur Affinitätsreinigung mit Ni-NTA oder Ni-IDA.

¹¹ die Expression aller Proteine erfolgte in *E. coli BL21 (DE3) [pREP4]*-Zellen.

Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand mit 1ml Lysispuffer und 100-200µl Ni-Material in ein Falcon gegeben und für 2h auf Eis geschüttelt. Das Ni-Material mit den gebundenen Proteinen wurde in der *Heraeus Megafuge* herunterzentrifugiert (10min, 1100xg, 4°C) und auf eine Miniprep-Säule des *Wizard Plasmid Purification Kits* mit aufgeschraubter 10ml Spritze überführt. Anschließend wurde mit Puffern mit aufsteigenden Imidazolkonzentrationen gewaschen. Die Pufferzusammensetzungen finden sich bei der Beschreibung einzelner Konstrukte im Ergebnisteil. Für die Elution wurden meist 300µl Puffer mit 300mM Imidazol verwendet. Für höhere Ausbeuten wurden diese 300µl dreimal durch die Säule gedrückt.

3.2.8 Dialyse

Zur Entfernung des Imidazols oder zum vollständigen Pufferwechsel wurde mit einem Dialyseschlauch (*Visking Dialyse Schlauch*) dialysiert (zweimal 1h bei 4°C in jeweils 300-500ml des Dialysepuffers).

3.2.9 Aufkonzentrierung und Umpufferung

Zur Umpufferung größerer Volumina und zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Sartorius-Konzentratoren verwendet (*Heraeus Megafuge* bei 4300rpm und 4°C).

Bei Umpufferung wurde bis zu zehnmals entsprechend dem vorliegenden Volumen das gleiche Volumen an neuem Puffer zugegeben und auf in etwa die gleiche Menge herunterzentrifugiert. Dadurch wurde der Gehalt an altem Puffer auf unter 1% bei gleichbleibender Proteinkonzentration reduziert.

3.2.10 Säulenchromatographie

Es wurde eine ÄKTA-Anlage verwendet. Die Puffer wurden mit MilliQ-Wasser hergestellt, filtriert (0,2µM) und entgast.

Ionenaustauschchromatographie von PDE11A4 (1-568) in pQE60:

Säulenmaterial	MonoQ HR 5/5
Säulenvolumen	0,98ml
Flussrate	1,0ml/min
Equilibrierung	5ml Puffer A, 10ml Puffer B, 5ml Puffer A
fraktioniert ab	70ml
Fraktionsgröße	0,5ml
Salzstufen	je 15ml 150mM, 200mM, 300mM, 500mM NaCl und 10ml 1M NaCl

3.2.11 Homogenisierung von Gewebe

Zur Homogenisierung von humanem Prostata- oder Nierengewebe wurde dieses auf einer gekühlten Metallplatte mit einem Skalpell zunächst zerkleinert und mit Puffer in einen Potterhomogenisator überführt und unter ständiger Kühlung für 3min bei maximaler Leistung

homogenisiert. Das Homogenat wurde für 30min bei 48000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde gekühlt aufbewahrt (4°C).

3.3 Enzymtests

3.3.1 Adenylatcyclasetest

Adenylatcyclase-Aktivität wurde nach Salomon et al. mit α - ^{32}P -ATP als Substrat gemessen [99]. Als interner Standard zur Ausbeutebestimmung wurde (2,8- ^3H)-cAMP verwendet. Das cAMP wurde chromatographisch isoliert mit Hilfe zweier hintereinander geschalteter Säulen (1. Säule: 1,2g *Dowex-50WX40-400*; 2. Säule: 1g *Al₂O₃ 90 aktiv, neutral*).

Der Test erfolgte mit 100 μl (50 μl AC-Cocktail (2.3.2.4), 10 μl Protein, 10 μl α - ^{32}P -ATP (i.d.R. 75 μM), allfällige Zusätze, Wasser ad 100 μl).

Vor dem Start des Tests mit Substrat befanden sich die Proben in Eis. Nach i.d.R. zehnmütiger Inkubation bei 37°C wurde auf Eis mit 150 μl AC-Stopp (2.3.2.4) gestoppt. Es wurden 10 μl des internen Standards (20mM ^3H -cAMP) und 750 μl Wasser zugegeben.

Die Proben wurden auf die *Dowex*-Säulen gekippt und nach dem Einsickern wurde mit 3-4ml Wasser (je nach Elutionsprofil der verwendeten Säulen) gewaschen. Daraufhin wurde mit 5ml Wasser auf *Alox*-Säulen eluiert. Die Elution des cAMP von den *Alox*-Säulen erfolgte mit 4ml 0,1M Tris/HCl pH7,5 in Szintillationsvials, in welche bereits 4ml Szintillator *Ultima Gold XR* vorgelegt worden war. Nach Schütteln der Proben wurde im *Liquid Szintillation Counter* ausgezählt.

Zur Bestimmung der eingesetzten Mengen an radioaktiv markiertem cAMP und ATP wurden ^3H - und ^{32}P -Totals direkt in Elutionspuffer und Szintillatorlösung ausgezählt.

Die Regeneration der Säulen geschah wie folgt:

Dowex-Säulen: 1x 5ml 2N HCl, 1x 10ml Wasser, 1x 5ml Wasser

Alox-Säulen: 2x 4ml 0,1M Tris/HCl pH 7,5.

Die Aktivität wurde mit der Formel

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

berechnet.

3.3.2 Test auf Proteaseaktivität

Proteaseaktivität in Gewebehomogenaten wurde nach der Methode von Charney und Tomarelli ([100], modifiziert nach [101]) mit Azocasein als chromogenem Substrat bestimmt. Bei proteolytischem Abbau des Azocaseins entstanden lösliche gefärbte Azo-Oligopeptide. Die Proteasereaktion wurde durch Zugabe von TCA gestoppt, wobei nicht verdautes Azocasein ausfiel. Nach Zentrifugation wurde der Überstand photometrisch bei $\lambda = 420\text{nm}$ vermessen.

3.4 Kristallisation

Die Kristallisation erfolgte nach der Hanging Drop Methode. Dazu wurden in den Reservoirs von VDX 24-Well Platten 500µl der entsprechenden Kristallisationspuffer vorgelegt. 1µl mit 2-20µg des Proteins wurde mittig auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert und mit 1µl des Puffers aus dem Reservoir vermischt. Das Deckglas wurde umgekehrt auf das Reservoir gelegt und luftdicht abgeschlossen.

Die Platten wurden mit einem *Zeiss Axioskop 40* in der ersten Woche täglich und danach in längerem Abstand betrachtet.

3.5 Phosphorylierung mit der PKA

Die Phosphorylierung im N-Terminus der PDE11A4 (Ser-117 und Ser-162) erfolgte mit der katalytischen Untereinheit von PKA modifiziert nach [102] in 50µl mit 12µg Protein mit 5000U PKA in einem Cocktail, bestehend aus 2mM ATP, 0,6µg/µl BSA und 10x PKA-Puffer (500mM Tris/HCl pH 7,5, 100mM MgCl₂), für 2h bei 30°C umgesetzt. Zur Abtrennung des nicht umgesetzten ATP wurde auf *Quick-Spin Columns for radiolabeled DNA Purification* von Roche Diagnostics aufgetragen und für 5min bei 1100xg in der *Heraeus Megafuge* zentrifugiert. Das Protein wurde dann auf AC-Aktivität untersucht. Als Kontrolle diente ohne PKA inkubiertes Protein.

3.6 Verdau mit der TEV-Protease

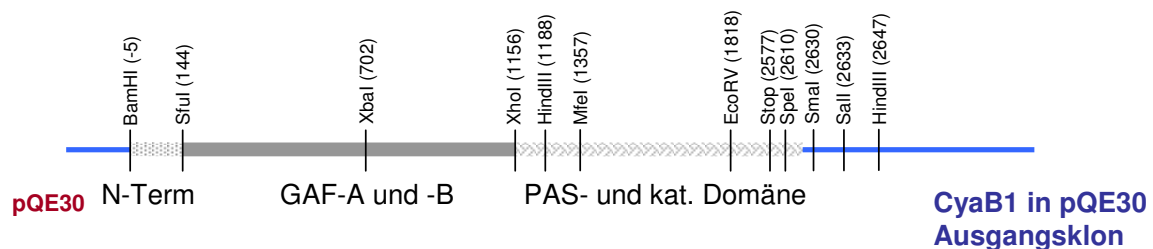
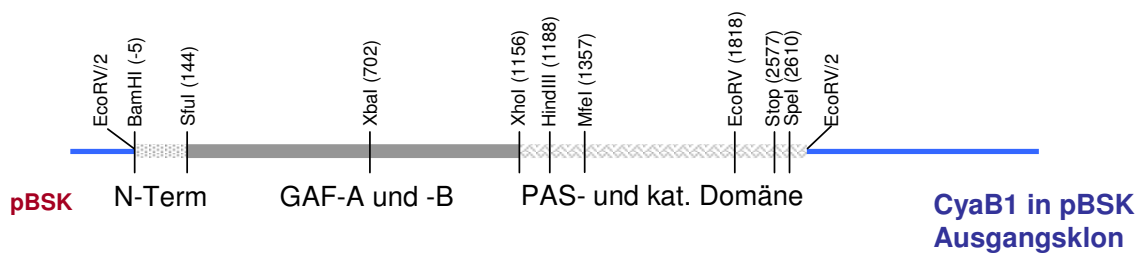
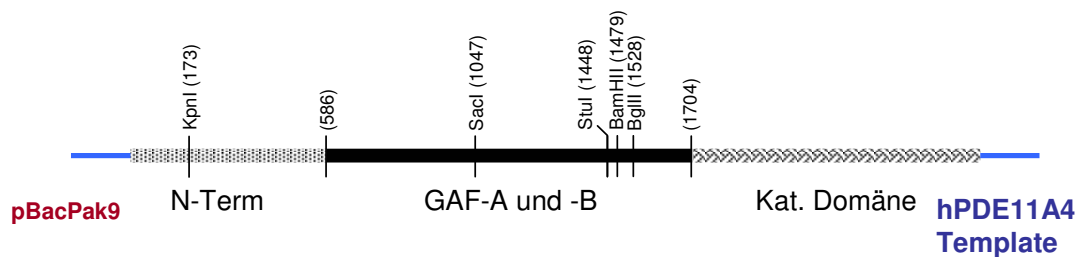
Mit der AcTEV-Protease von Invitrogen [103-105] wurde der N-terminale His-Tag des TEV-Konstrukts entfernt, da eine TEV-Schnittstelle zwischen His-Tag und Beginn von PDE11A4 (187-568) kloniert wurde (3.7.4.5). Die Umsetzung erfolgte nach Herstellerangaben. 20µg Protein wurden mit 1U AcTEV-Protease über Nacht bei 4°C umgesetzt. Anschließend wurde die AcTEV-Protease aufgrund ihres N-terminalen His-Tags durch Ni-IDA Affinitätschromatographie vom verdauten Protein getrennt. Das Vorgehen beim TEV-Verdau ist im Ergebnisteil beschrieben (4.4.3).

3.7 Klonierungen

Alle PCR-Produkte wurden in einen EcoRV-verdauten pBlueskript Vektor kloniert und sequenziert, wie auch alle Endkonstrukte. Einige Klonierungen wurden von Anita Schultz bzw. Laura Garcia Mondejar durchgeführt.

3.7.1 Ausgangsklone¹²

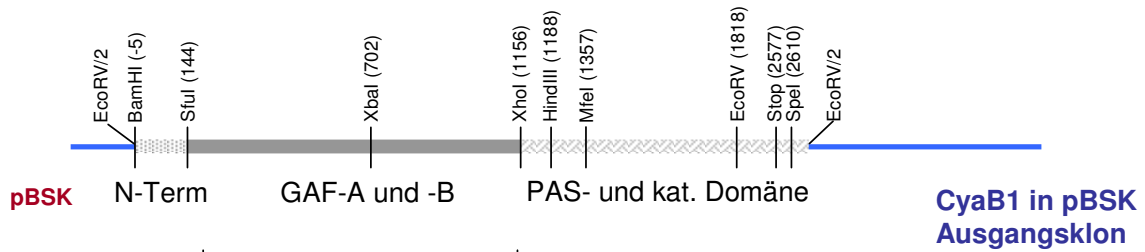
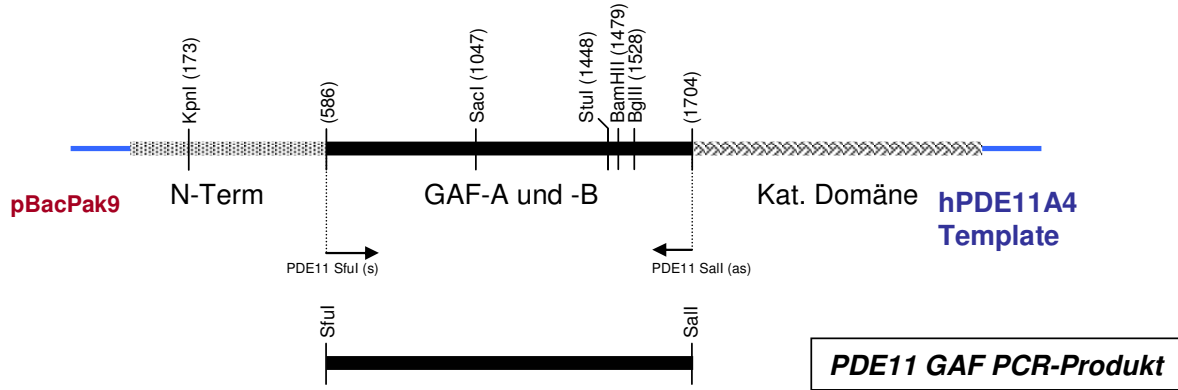
Das hPDE11A4-Template wurde von ALTANA Pharma zur Verfügung gestellt, die beiden CyaB1-Konstrukte waren von Tobias Kanacher [85].



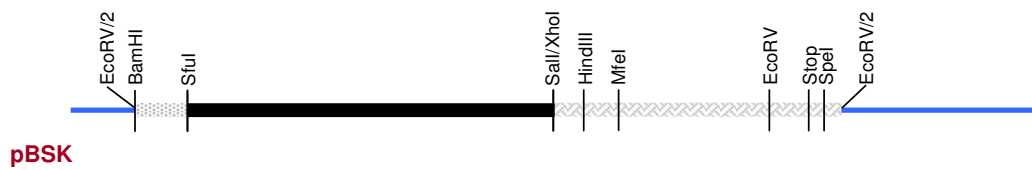
¹² Farb- und Mustercodierung: schwarz: PDE11; grau: CyaB1; gepunktet: N-Terminus; gefüllt: GAF-Domänen; Gewebe: katalytische Domäne

3.7.2 PDE11A4/CyaB1-Chimären

3.7.2.1 PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus



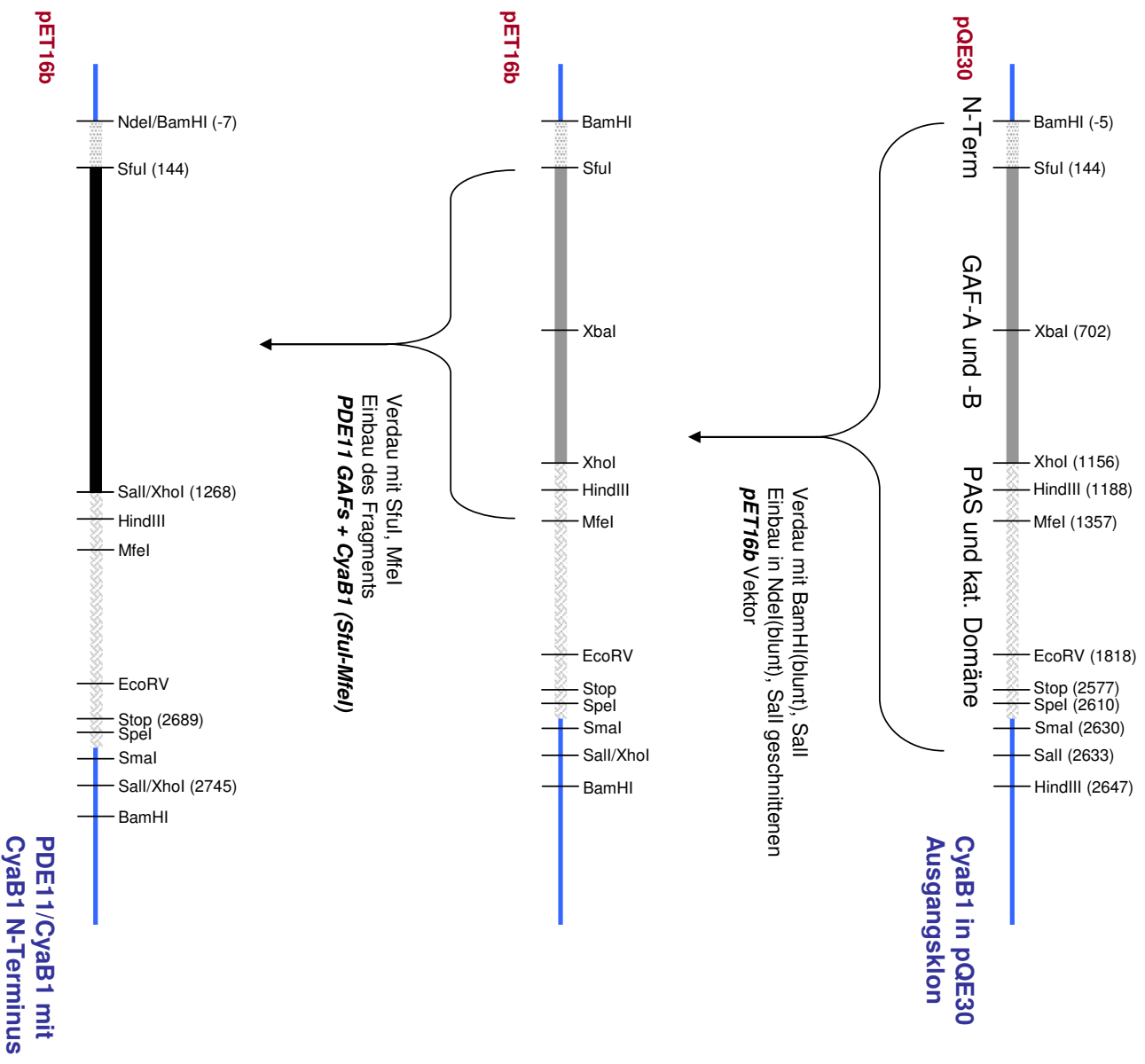
Verdau mit SfuI, XhoI
Einbau des PDE11 GAF PCR-Produkts



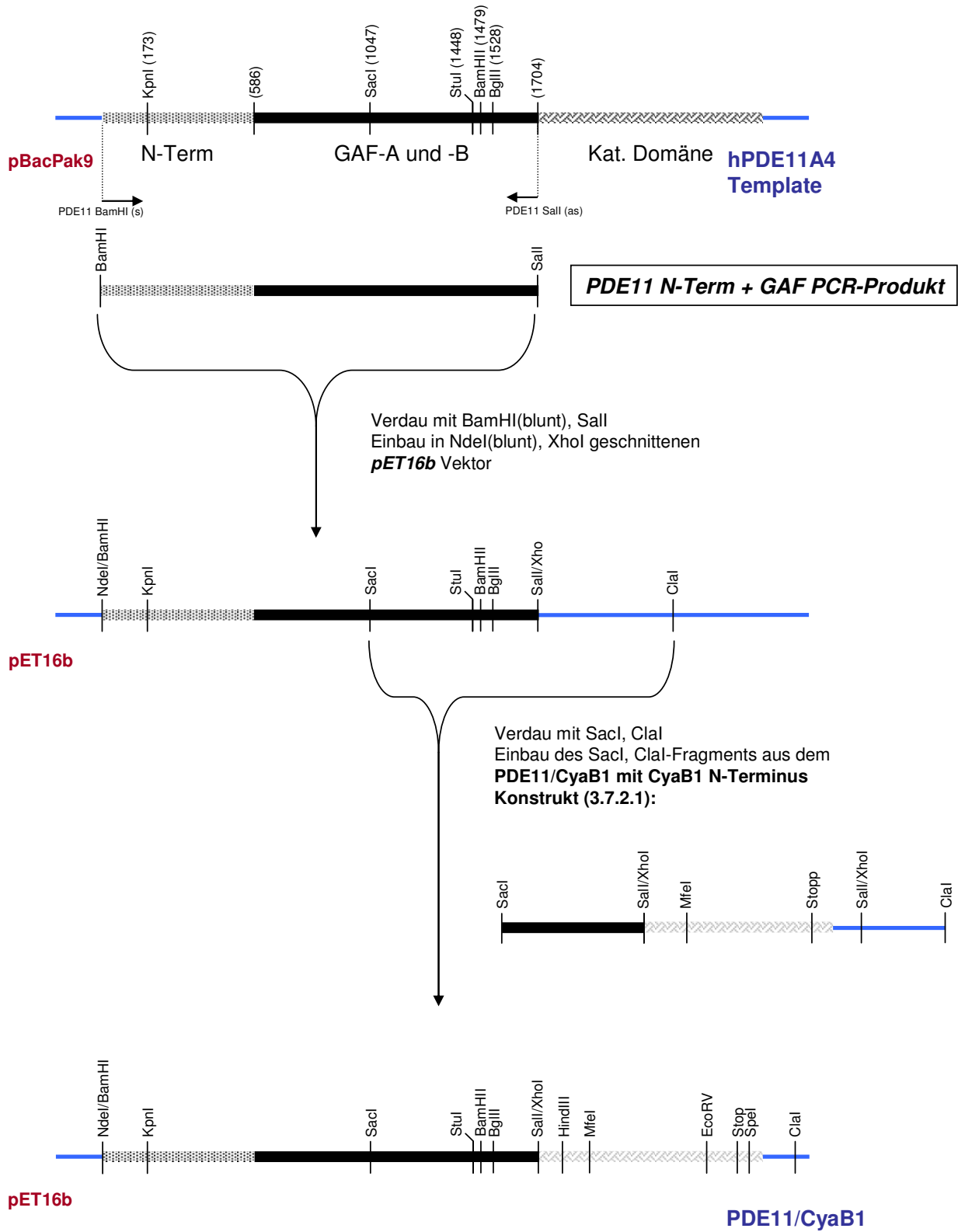
Verdau mit SfuI, MfeI



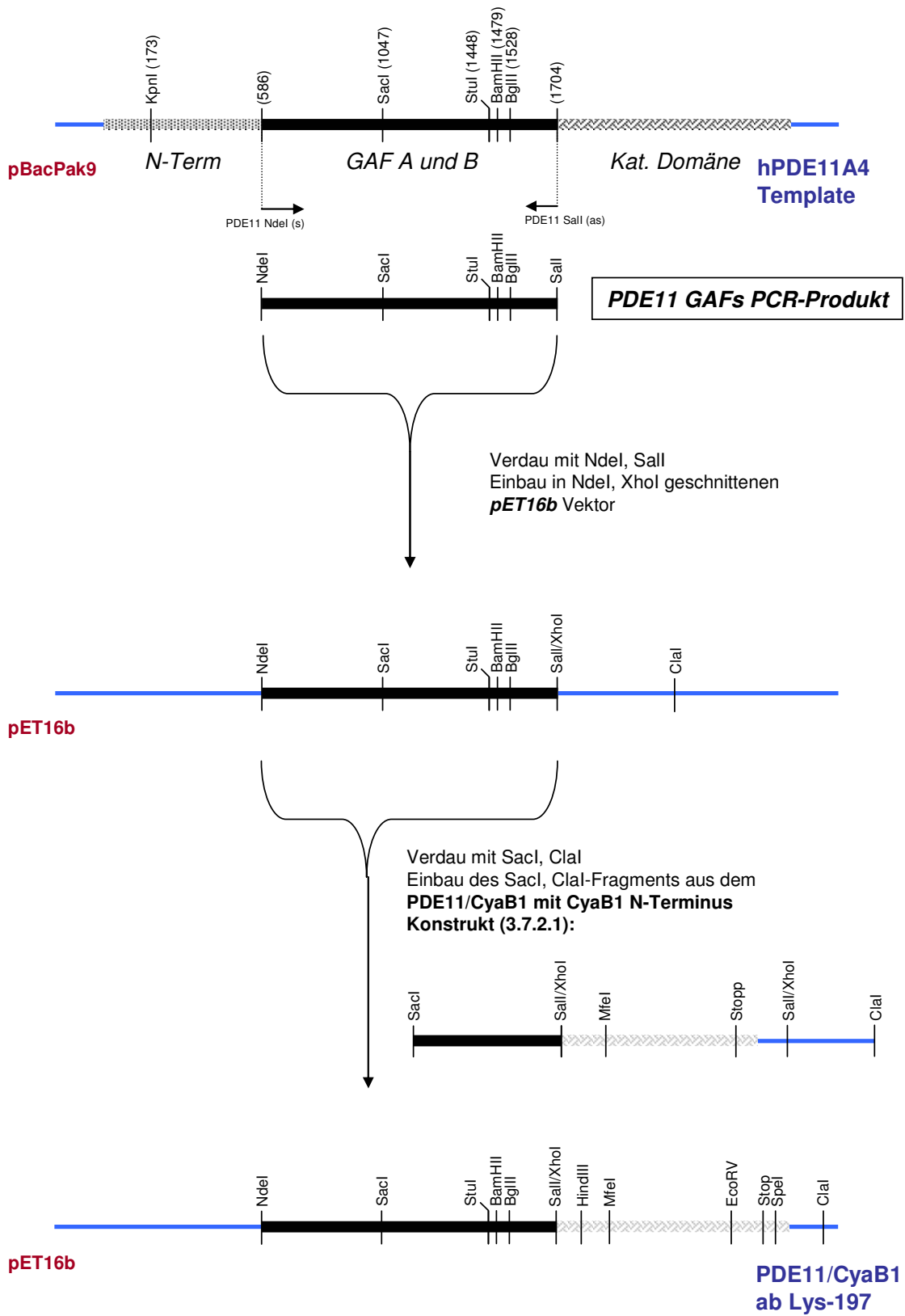
PDE11 GAFs + CyaB1 (SfuI – MfeI)



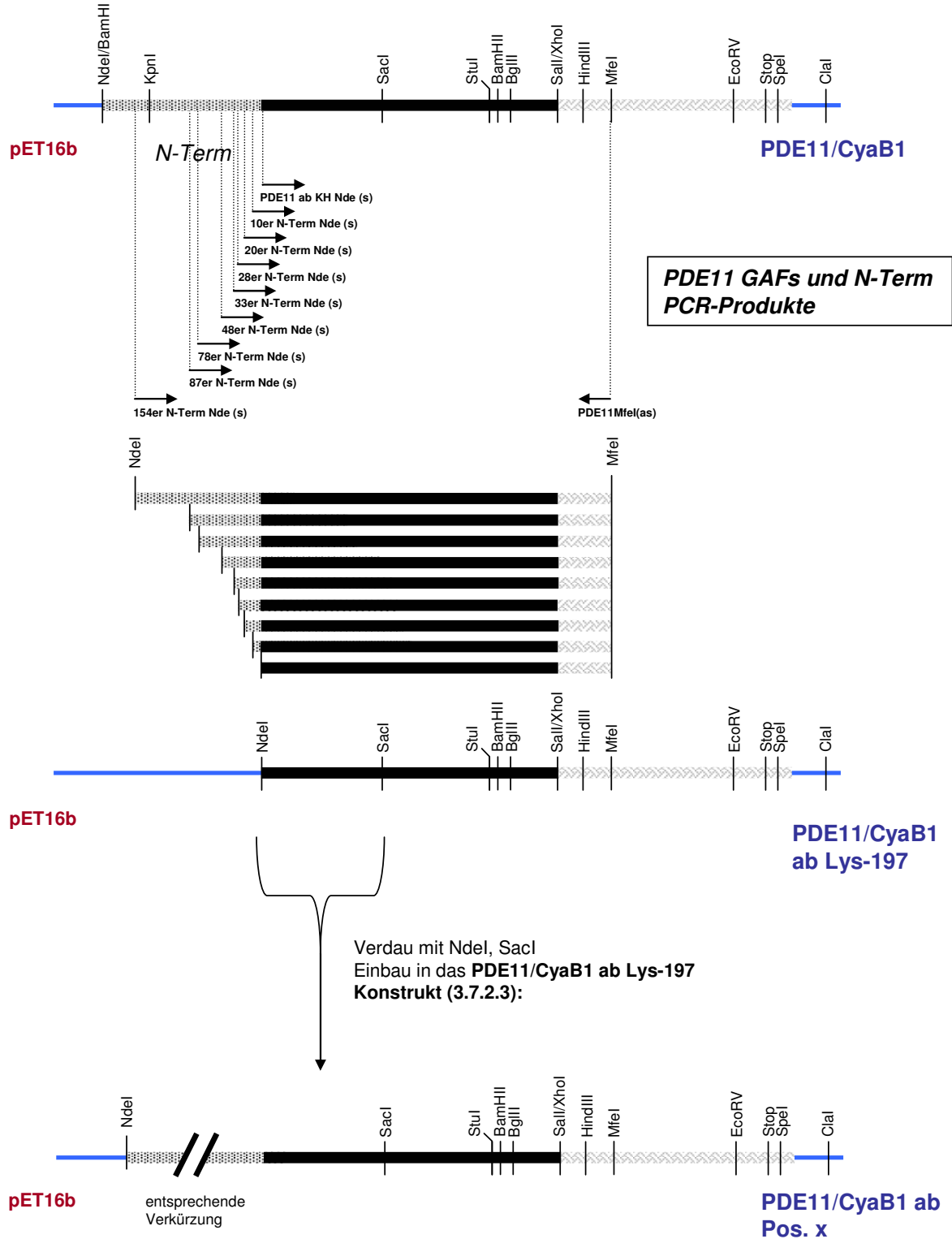
3.7.2.2 PDE11/CyaB1-Chimäre



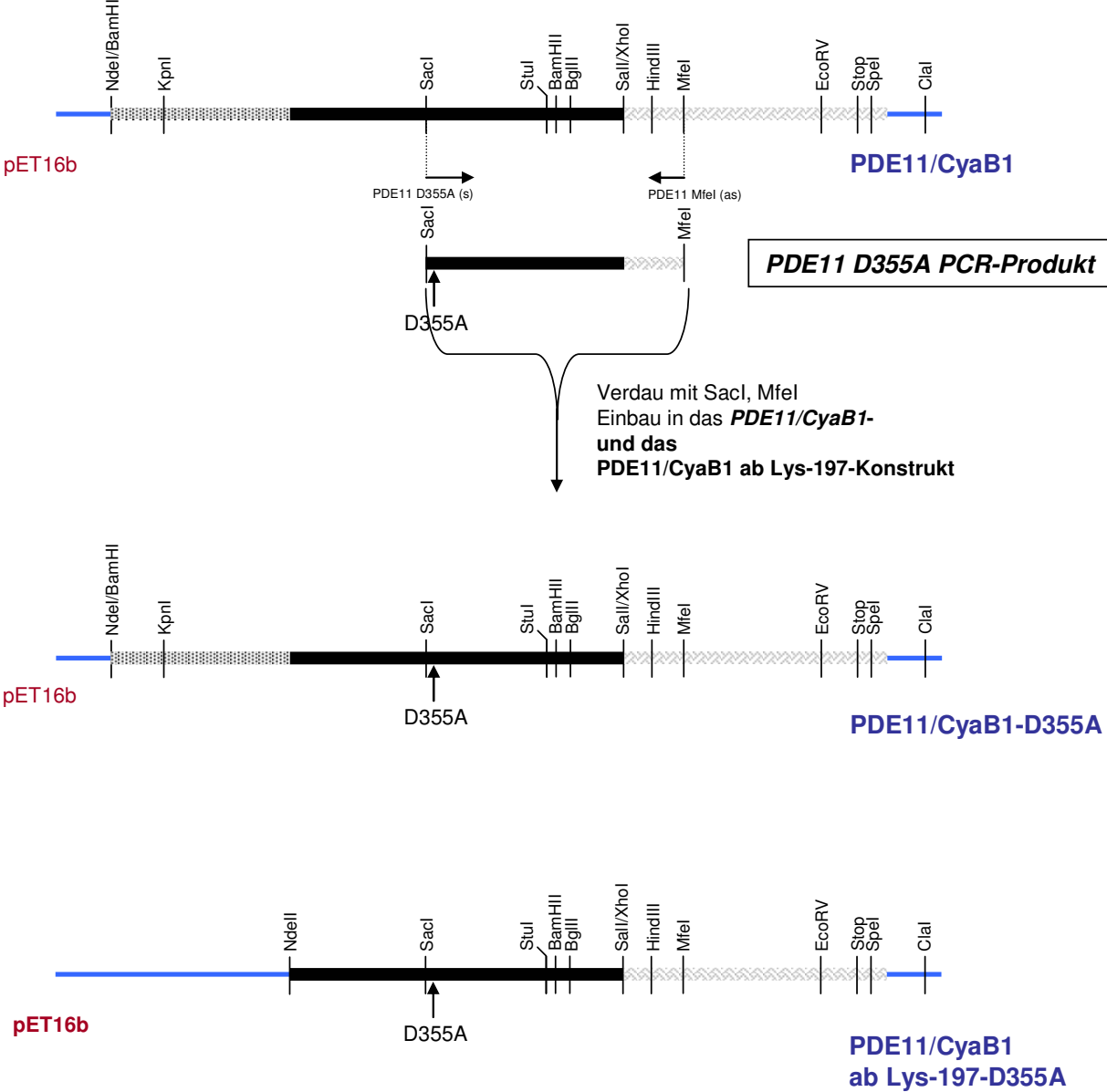
3.7.2.3 PDE11/CyaB1-Chimäre ab Lys-197



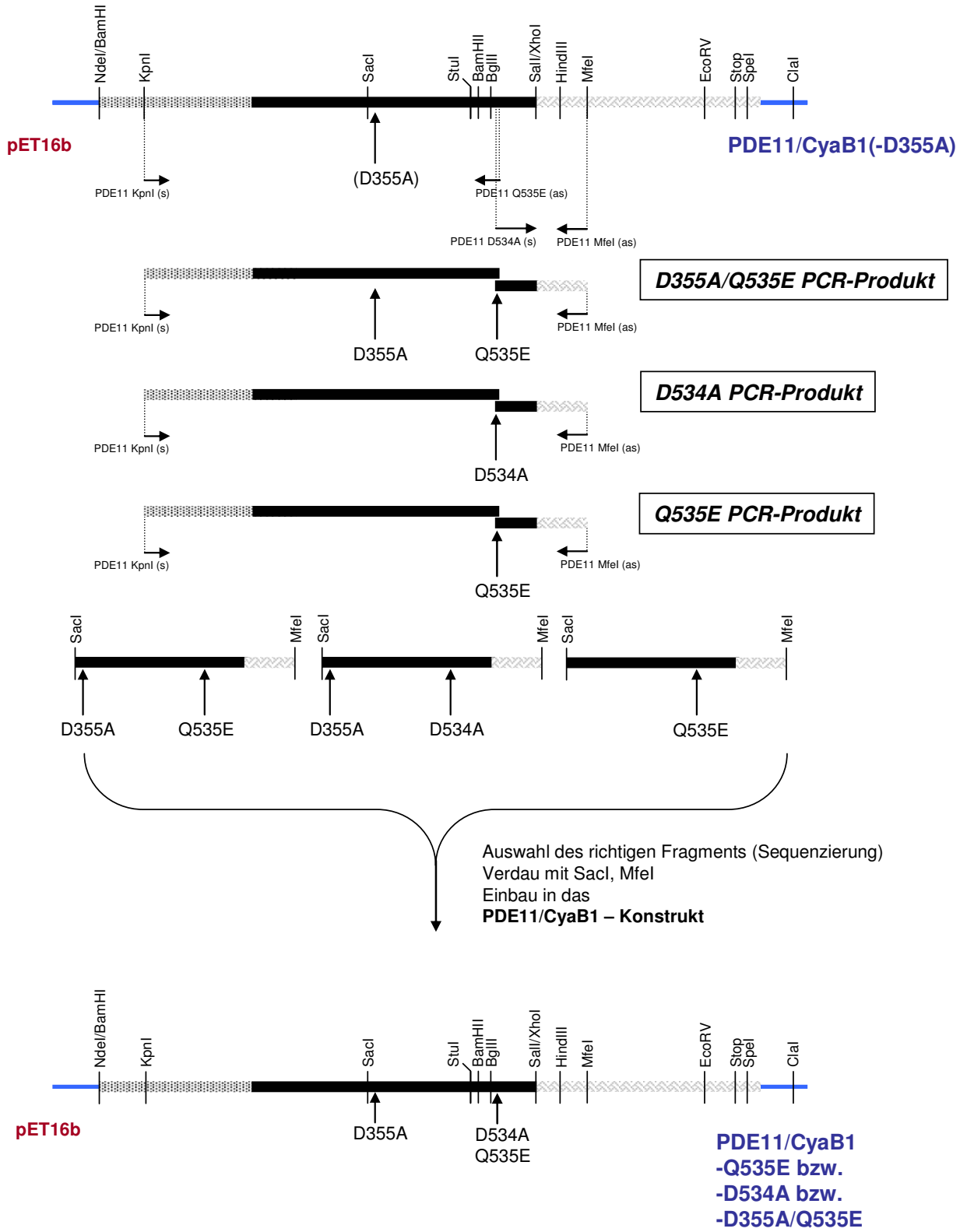
3.7.2.4 N-Terminus Verkürzungen



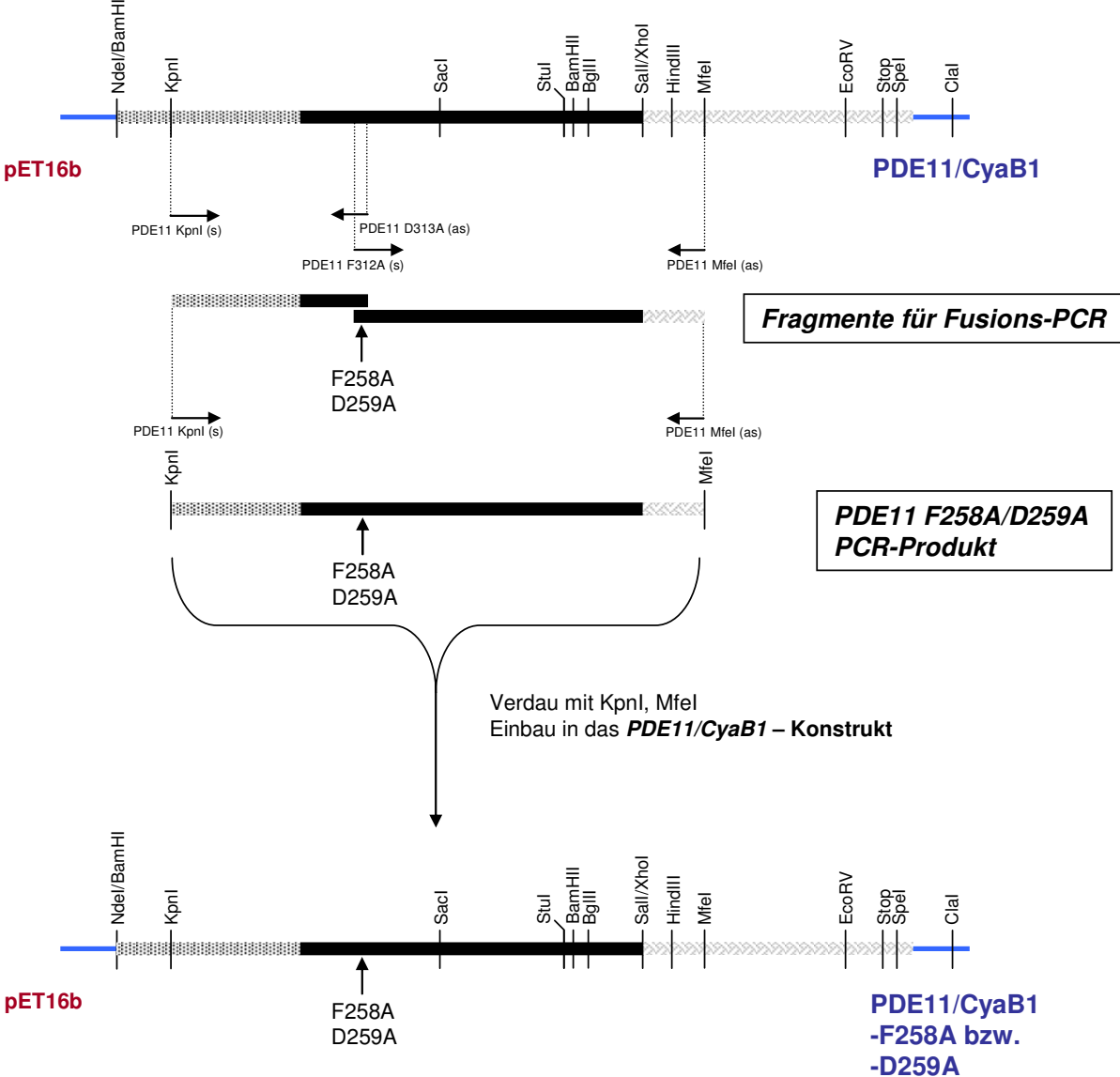
3.7.2.5 PDE11/CyaB1-D355A und PDE11/CyaB1 ab Lys-197-D355A



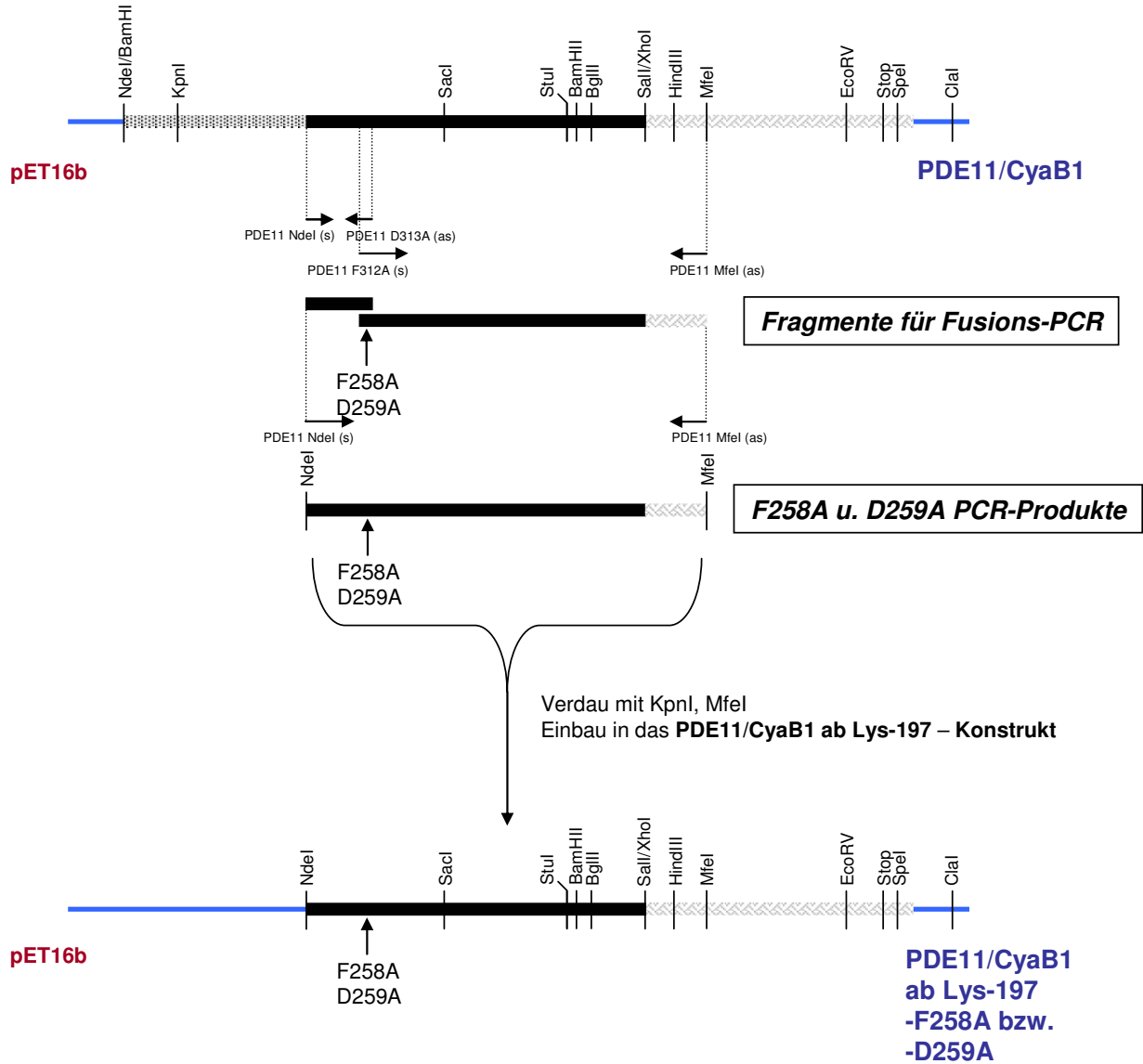
3.7.2.6 PDE11/CyaB1-D534A, -Q535E und -D355A/Q535E



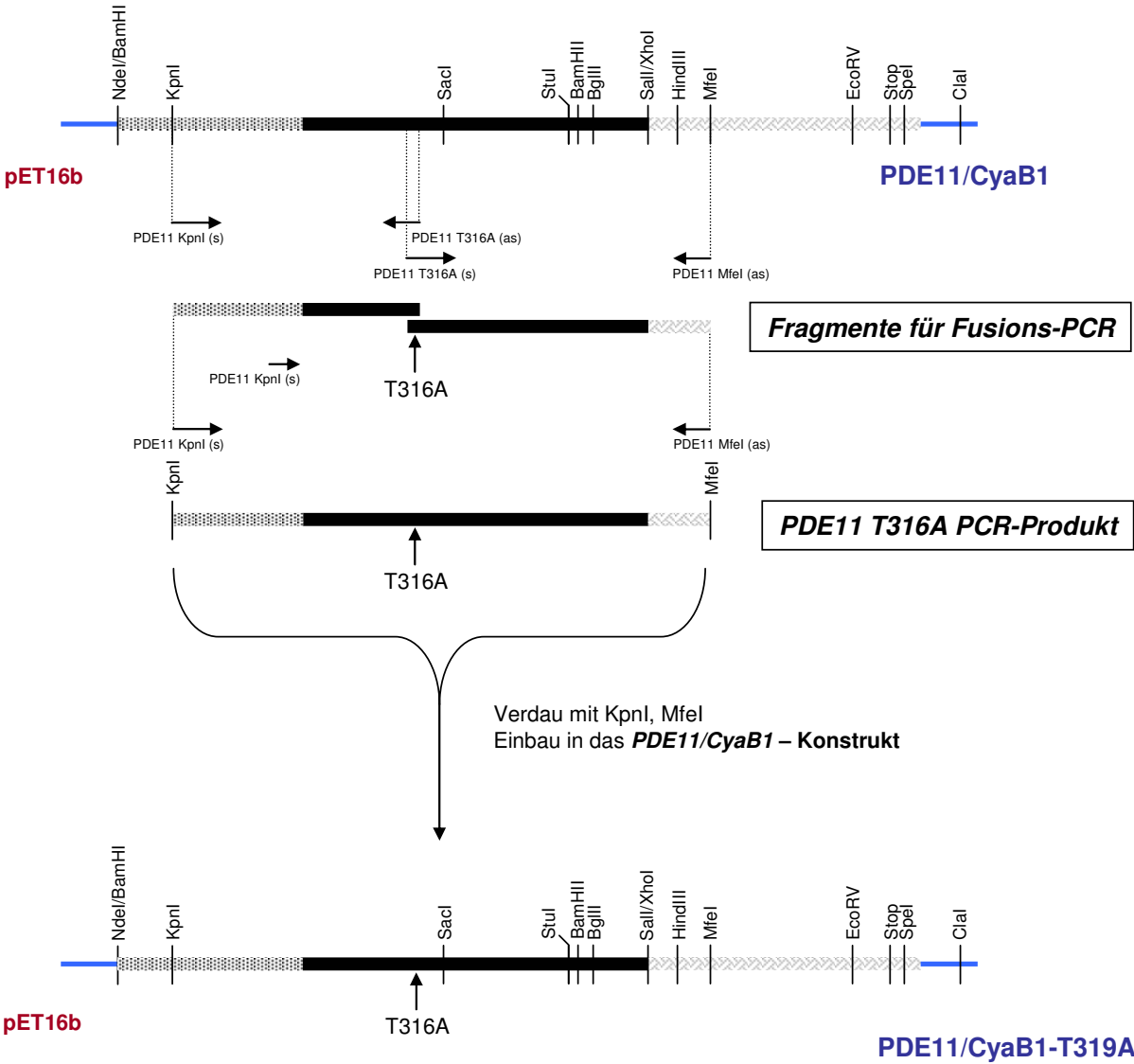
3.7.2.7 PDE11/CyaB1-F258A und -D259A



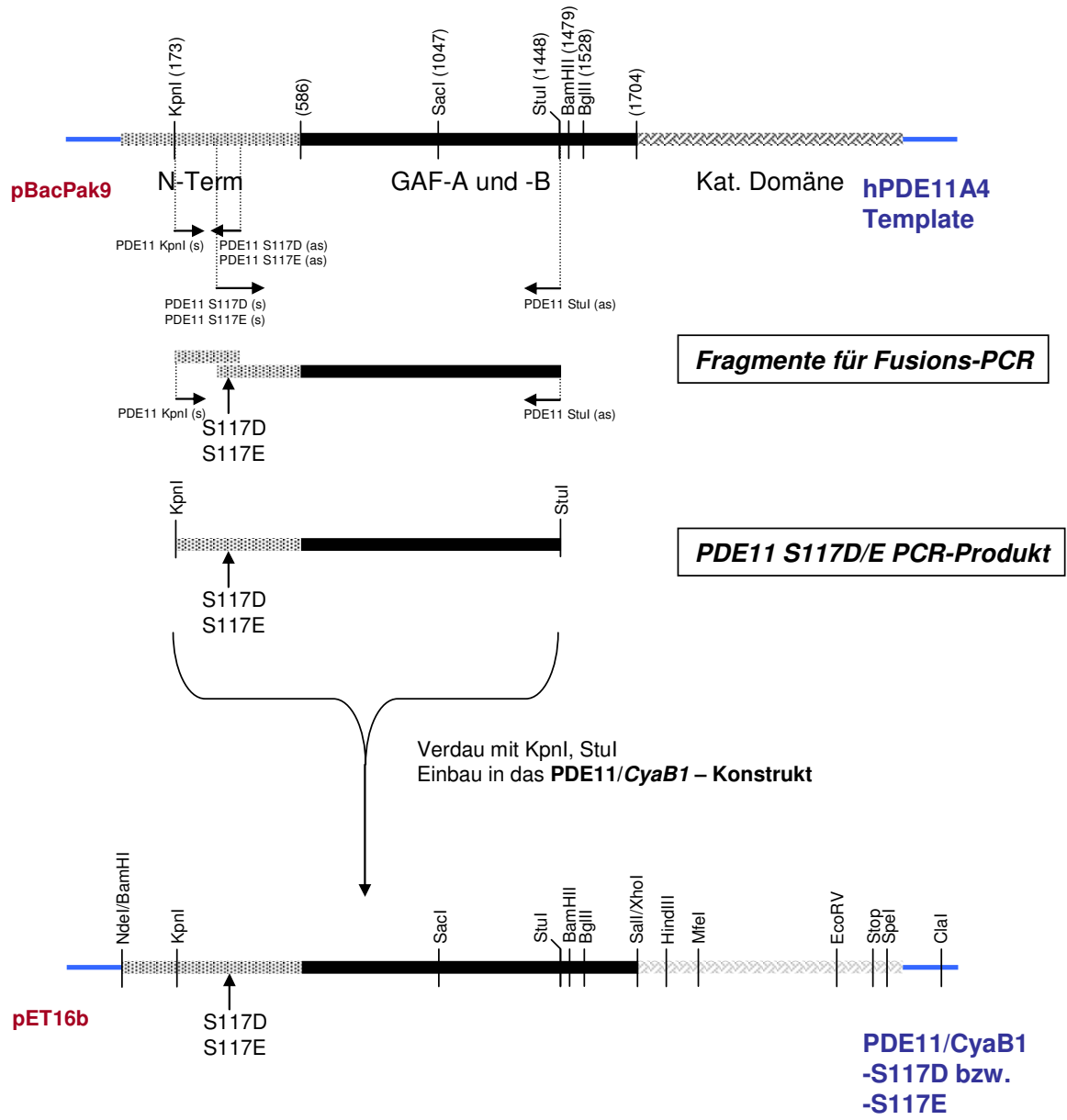
3.7.2.8 PDE11/CyaB1 ab Lys-197-F258A und -D259A



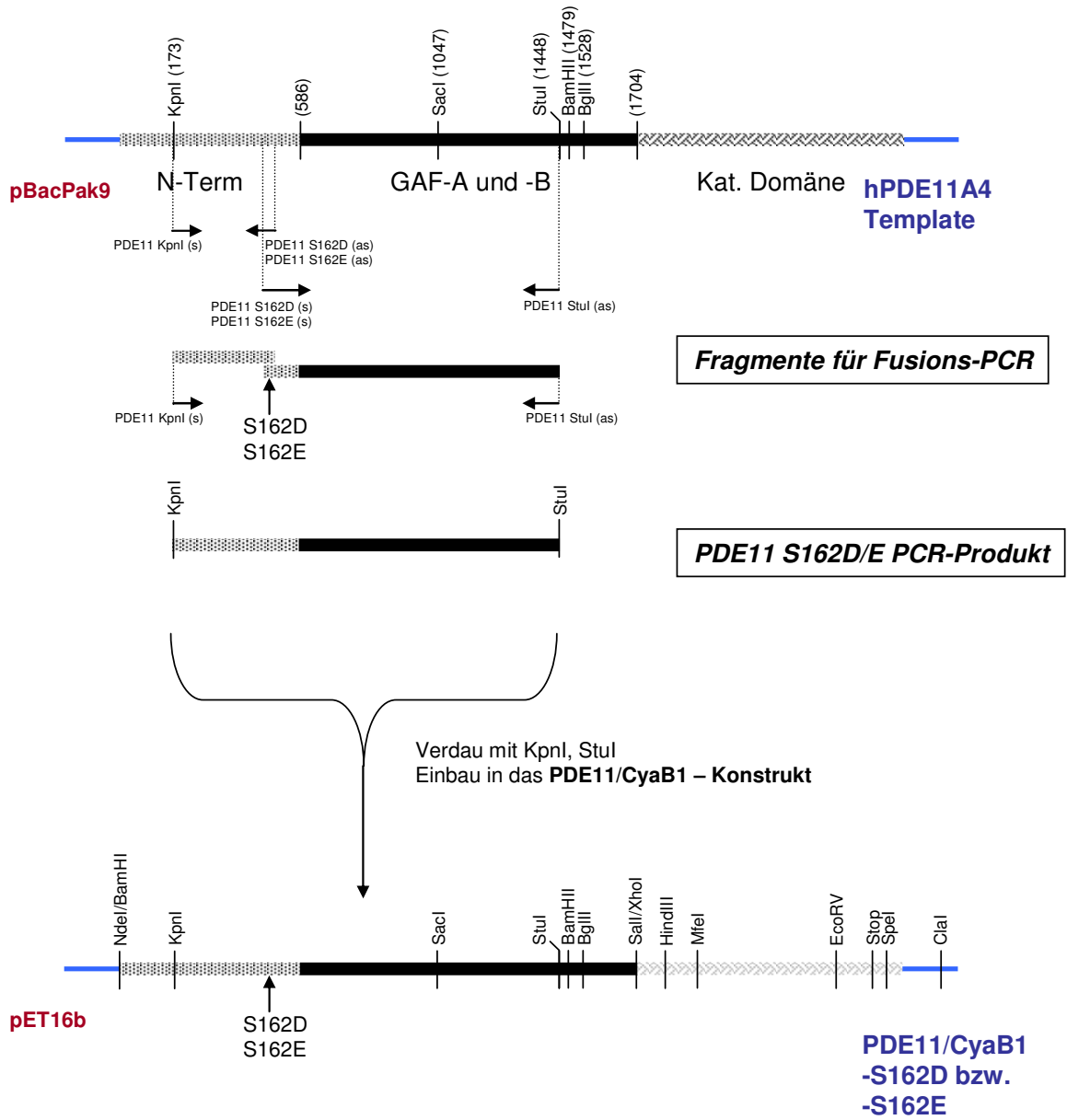
3.7.2.9 PDE11/CyaB1-T316A



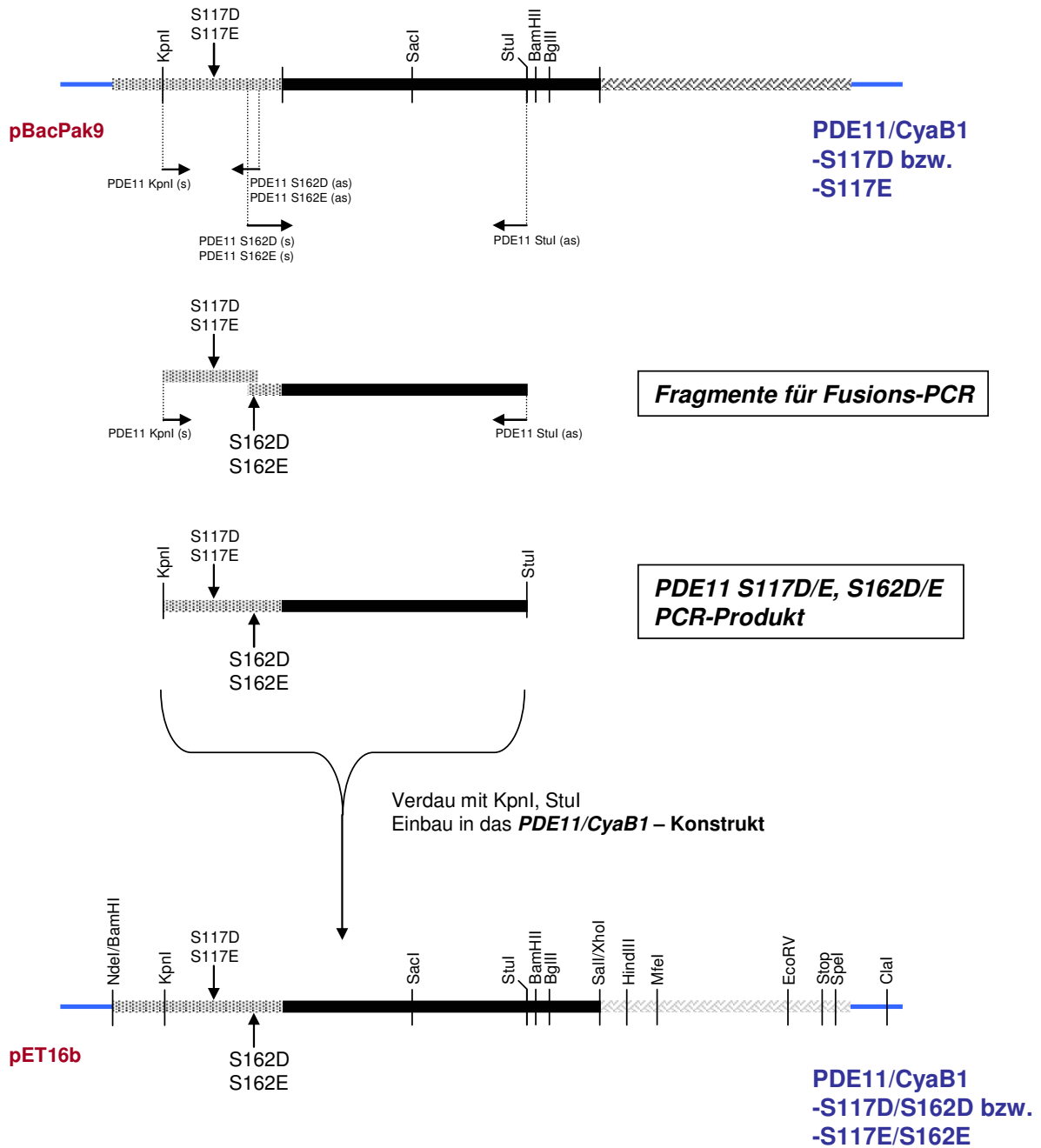
3.7.2.10 PDE11/CyaB1-S117D und -S117E



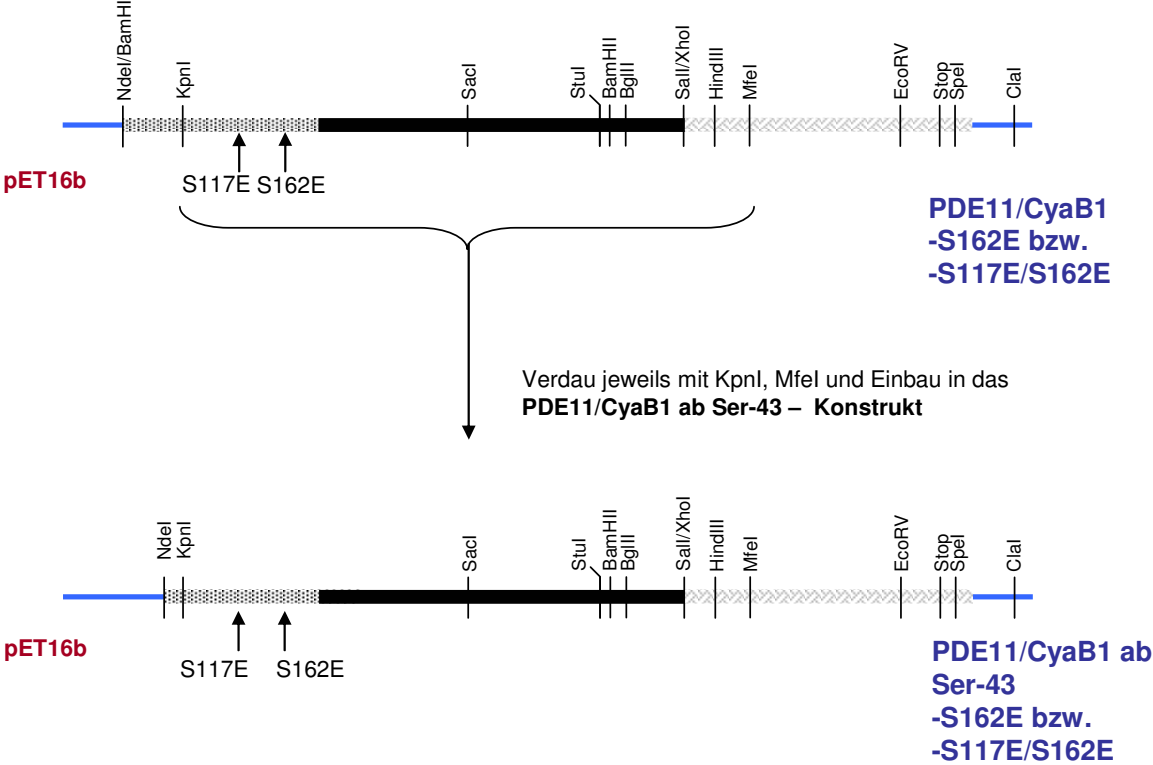
3.7.2.11 PDE11/CyaB1-S162D und -S162E



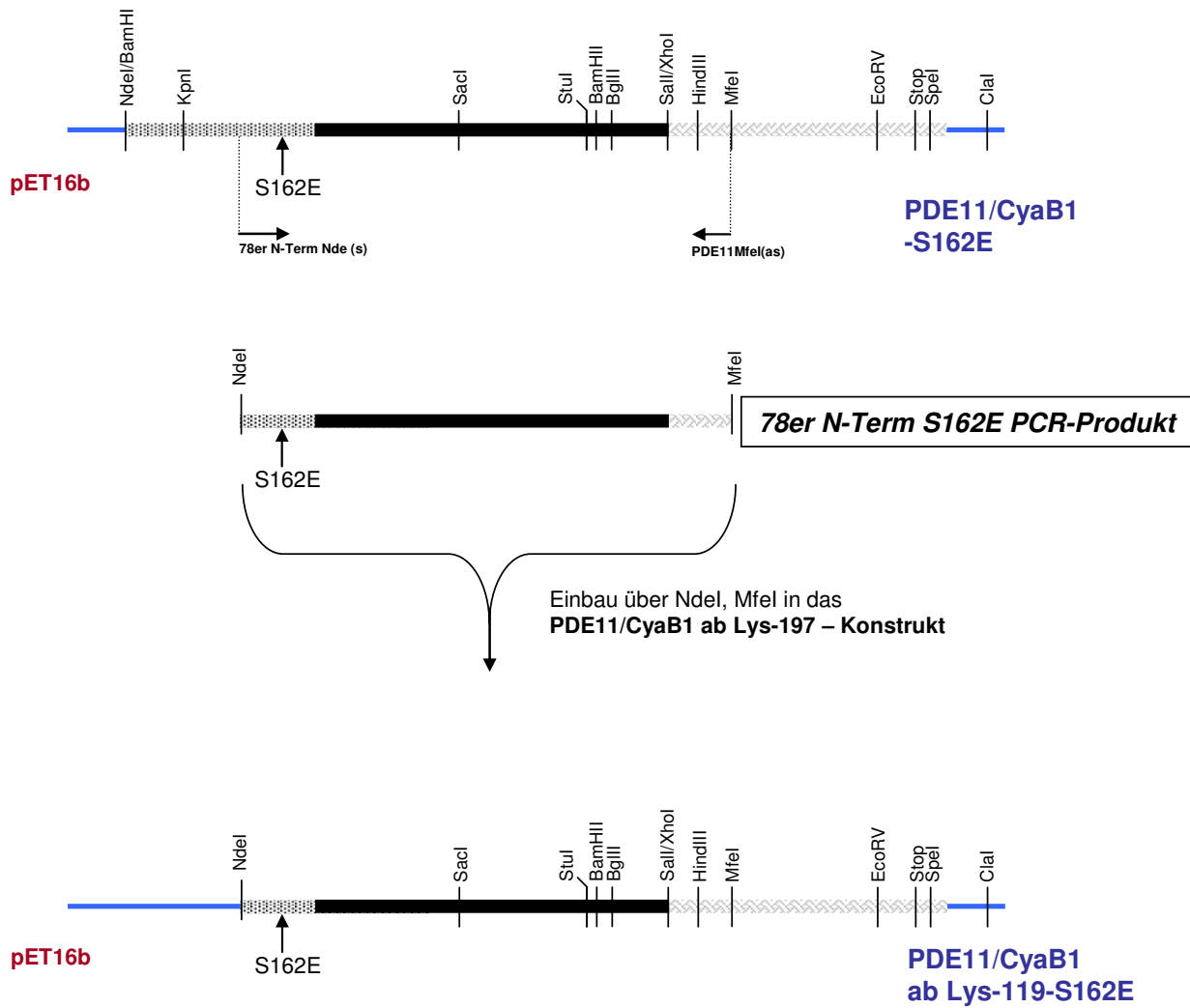
3.7.2.12 PDE11/CyaB1-S117D/S162D und -S117E/S162E



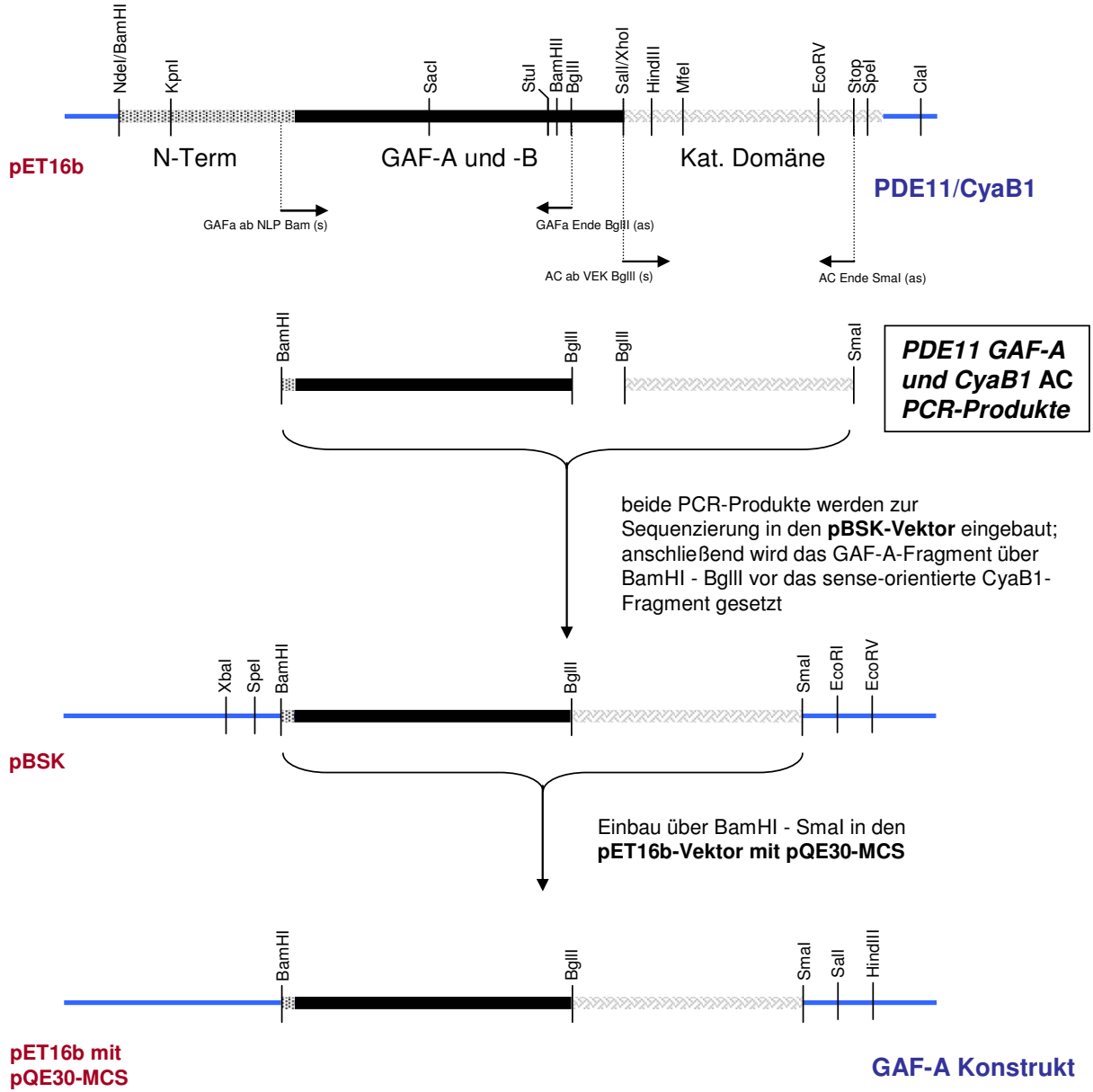
3.7.2.13 PDE11/CyaB1 ab Ser-43-S162E und -S117E/S162E



3.7.2.14 PDE11/CyaB1 ab Lys-119-S162E



3.7.2.15 GAF A-Konstrukt



3.7.3 PDE11A3/CyaB1-Chimären

3.7.3.1 PDE11/CyaB1 mit zusätzlichem PDE11A3 N-Terminus

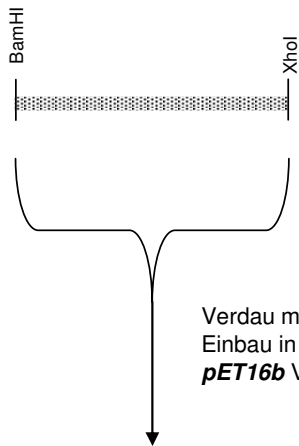
De novo Synthese des 54er N-Terminus von PDE11A3:



Primer PDE11A3 BamHI (s): enthält Informationen für die ersten 34 ASn der PDE11A3

Primer PDE11A3 Xho (as): enthält Informationen für die ASn 35-54 der PDE11A3 und die ASn 1-3 der PDE11A4;

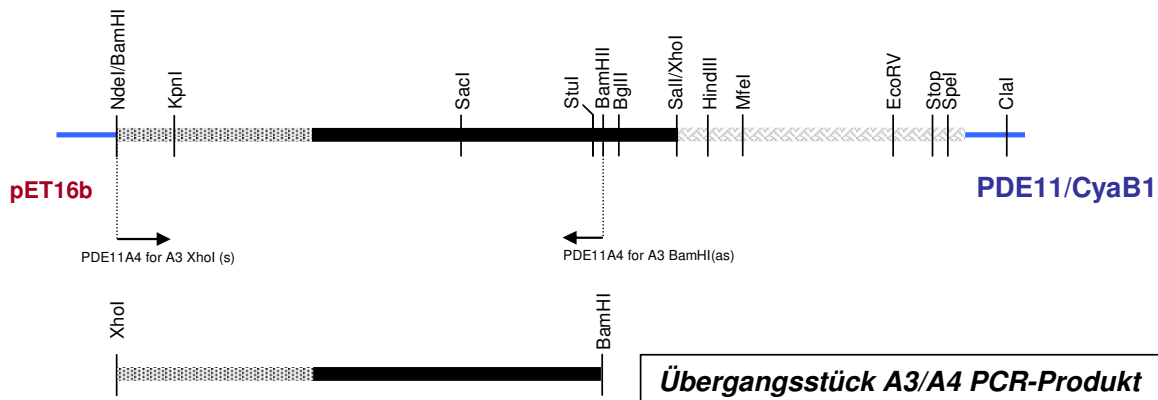
34bp Überlapp



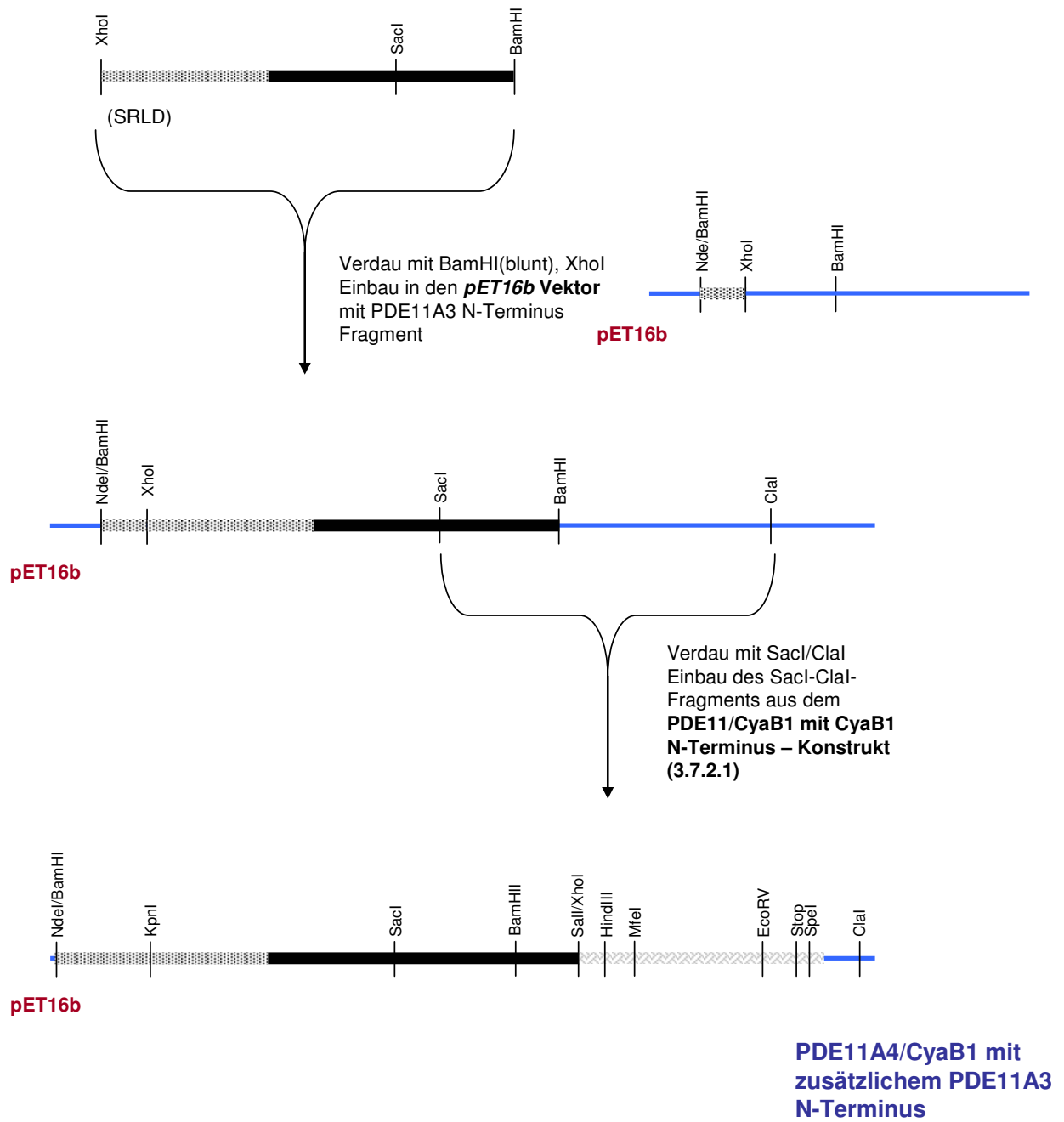
PDE11A3 N-Terminus PCR-Produkt (188bp)



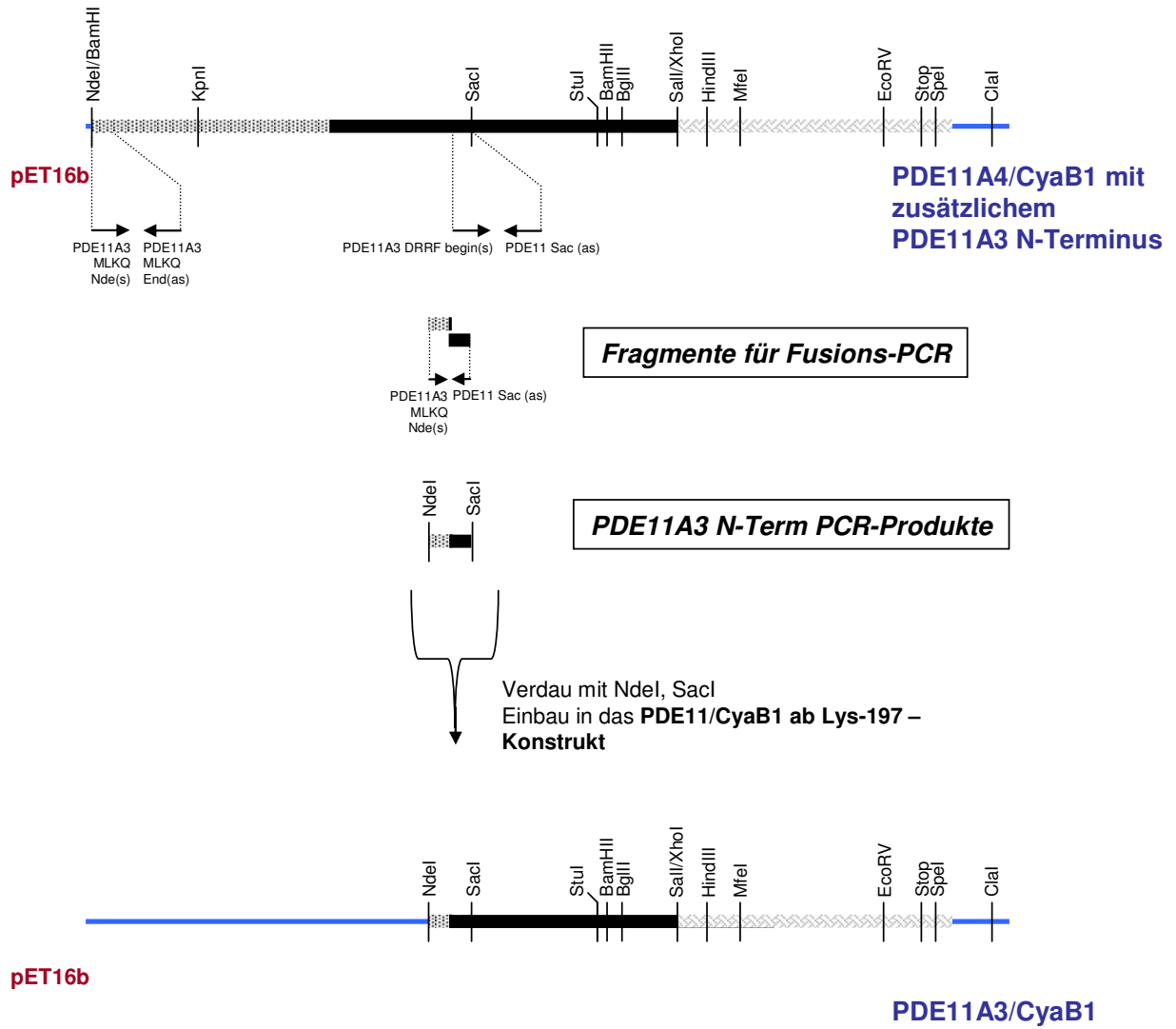
Klonierung des Übergangsstücks in PDE11A4 und Einbau der katalytischen Domäne:



Übergangsstück A3/A4 PCR-Produkt

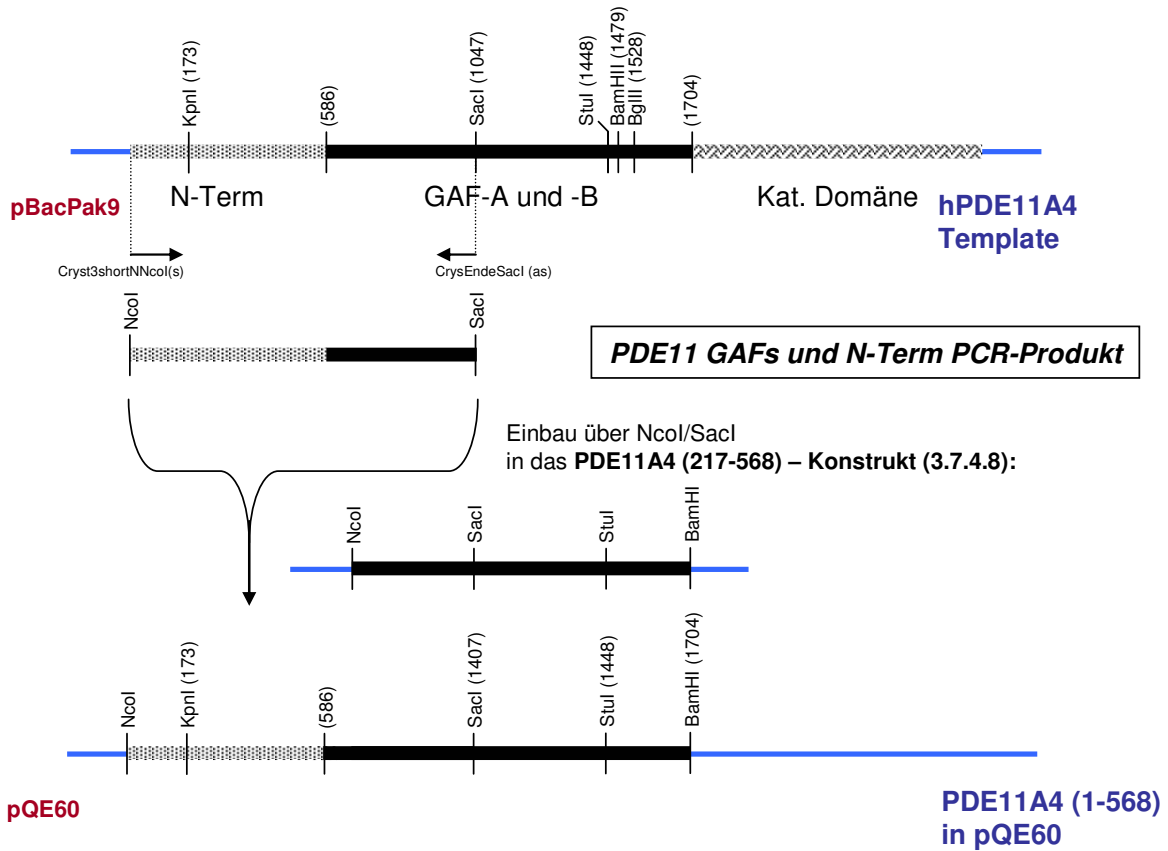


3.7.3.2 PDE11A3/CyaB1

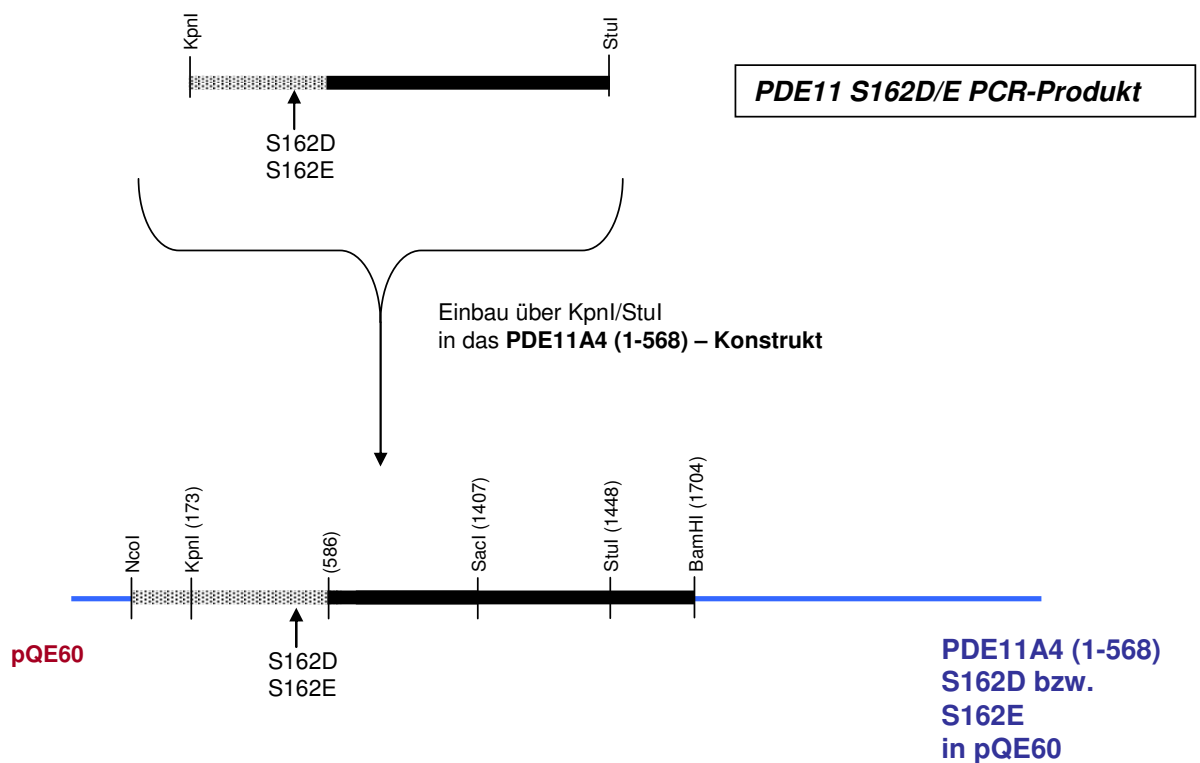


3.7.4 PDE11A4 GAF-Konstrukte für Kristallisationsversuche

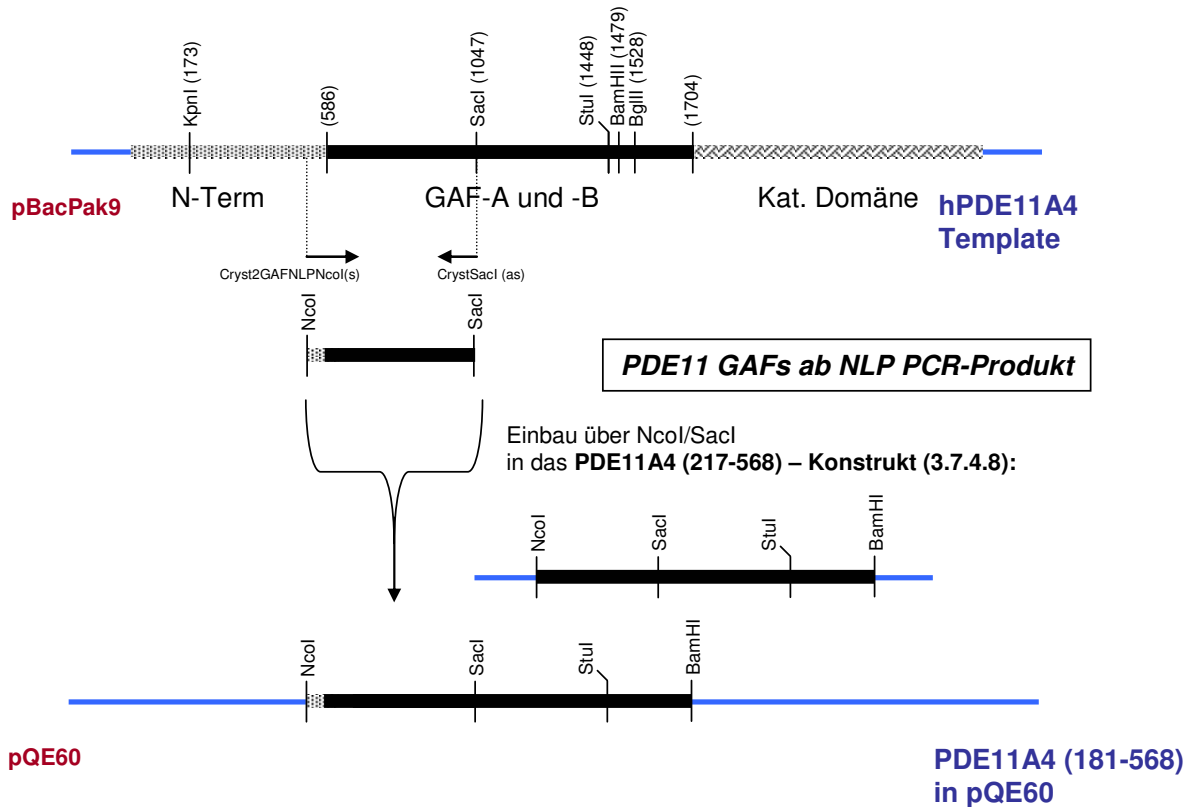
3.7.4.1 PDE11 GAF-Tandem (1-568) in pQE60



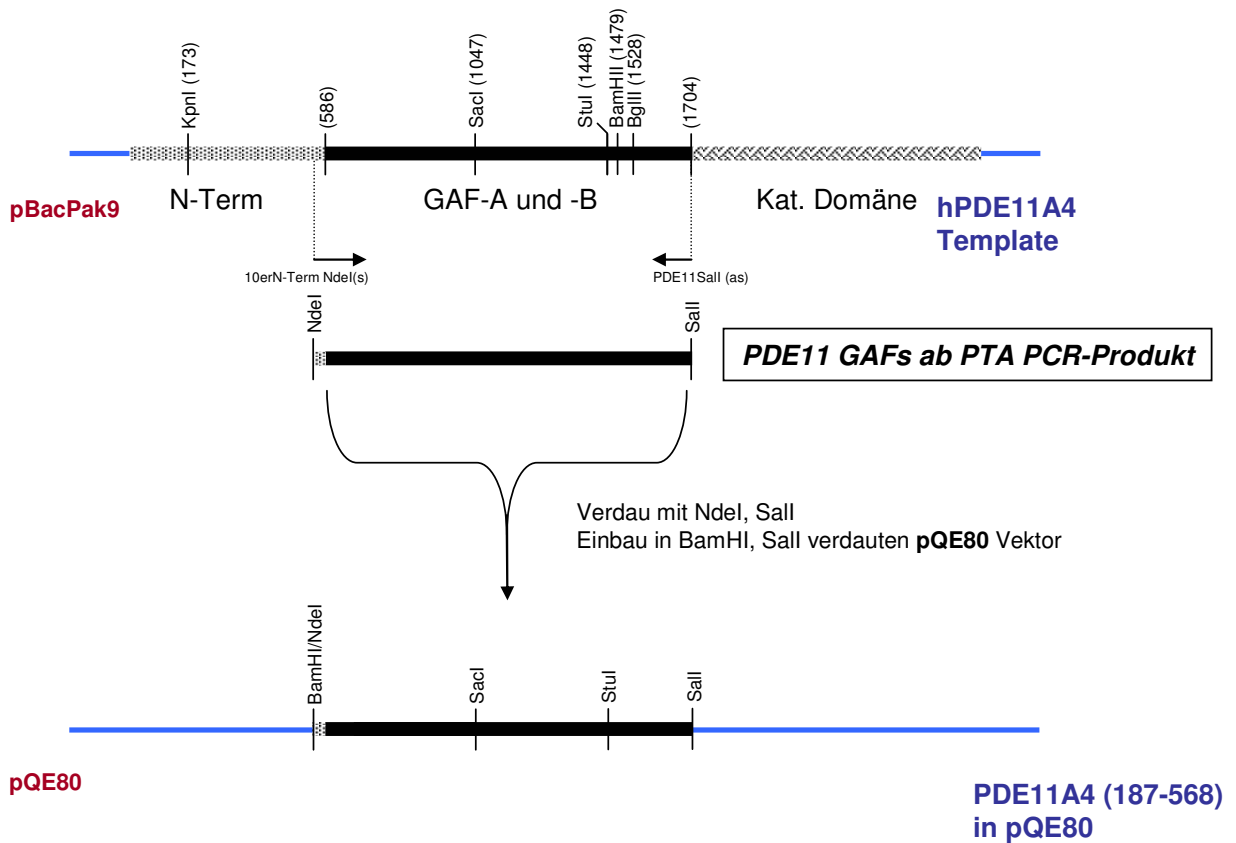
3.7.4.2 PDE11 GAF-Tandem (1-568) S162D/E in pQE60



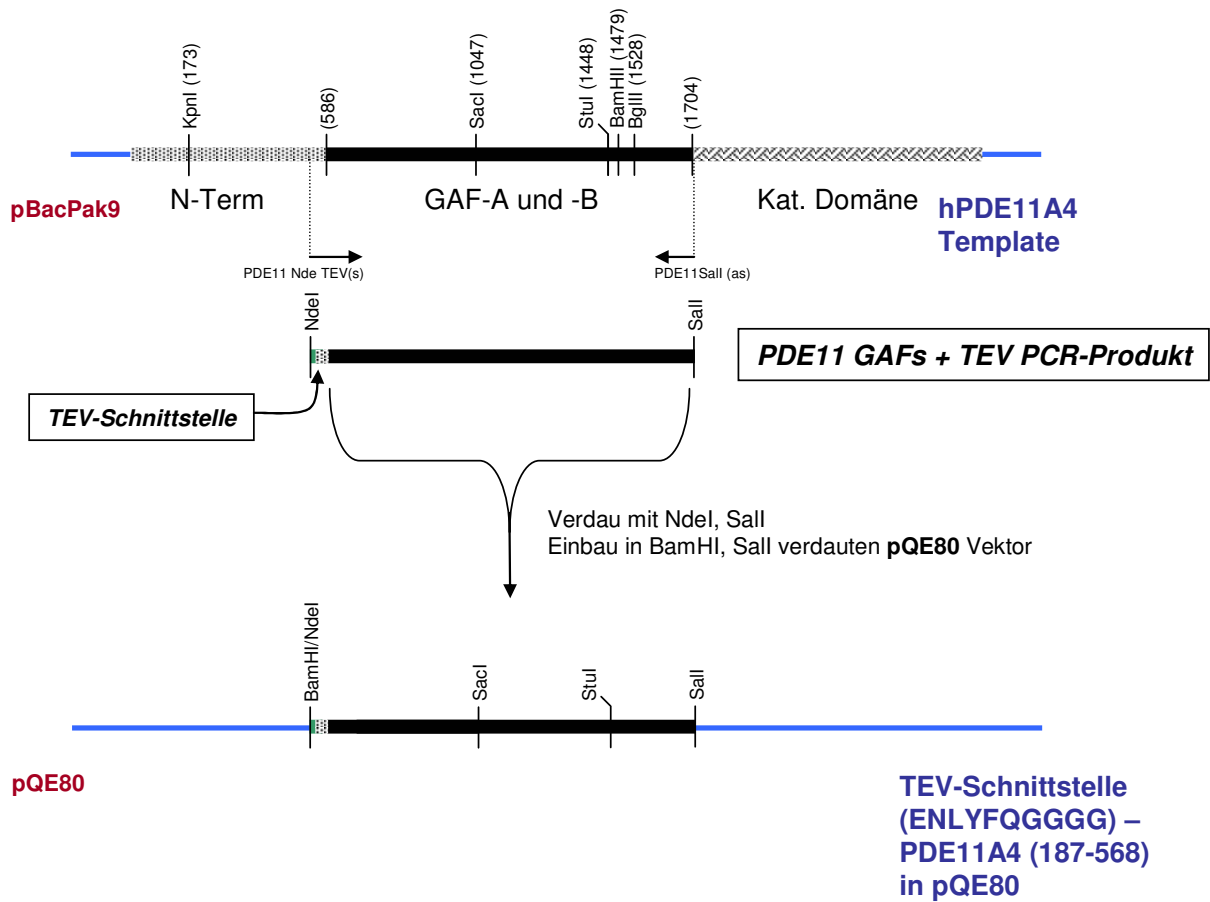
3.7.4.3 PDE11 GAF-Tandem (181-568) in pQE60



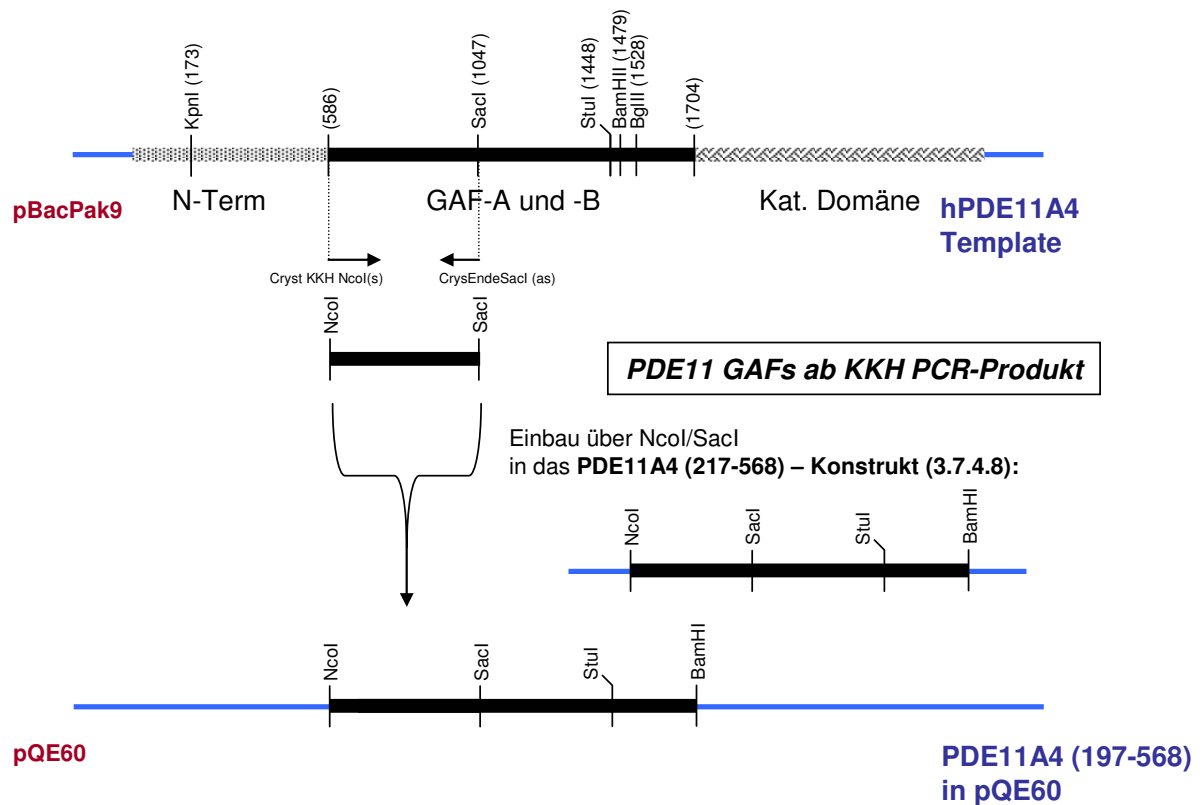
3.7.4.4 PDE11 GAF-Tandem (187-568) in pQE80



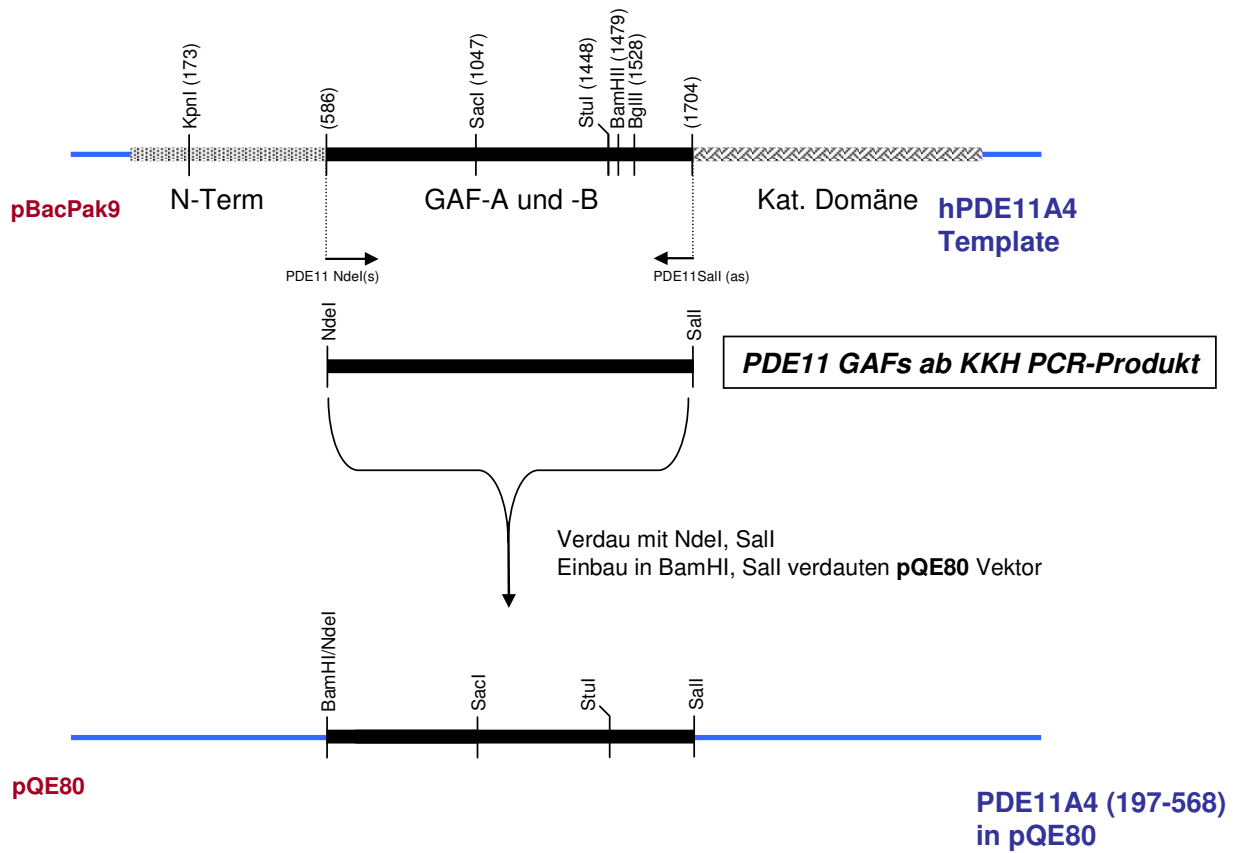
3.7.4.5 TEV-Konstrukt



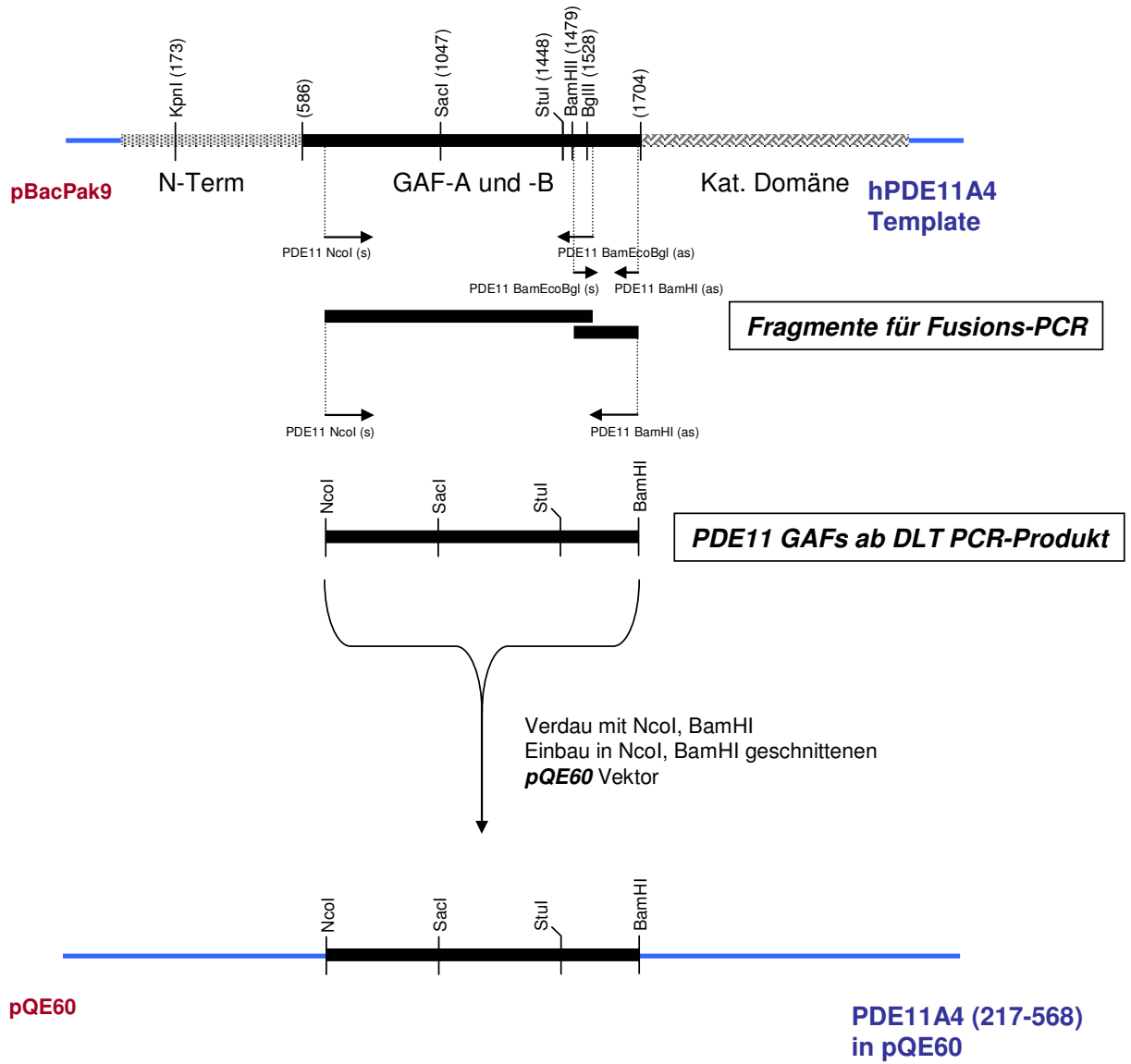
3.7.4.6 PDE11 GAF-Tandem (197-568) in pQE60



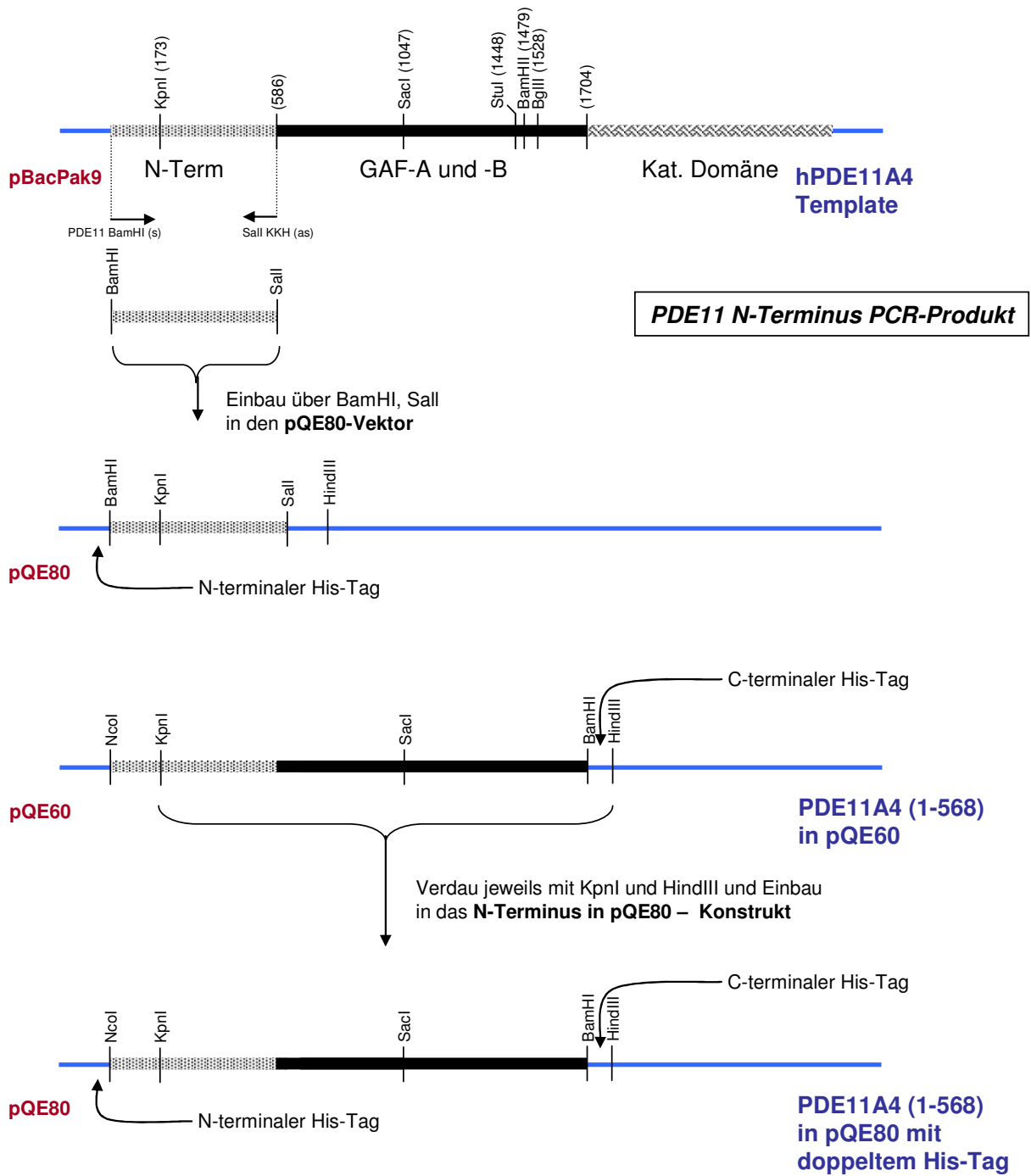
3.7.4.7 PDE11 GAF-Tandem (197-568) in pQE80



3.7.4.8 PDE11 GAF-Tandem (217-568) in pQE60



3.7.4.9 PDE11 GAF-Tandem (187-568) in pQE80 mit doppeltem N-Terminus



4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der PDE11A4/CyaB1-Chimären

4.1.1 Biochemische Charakterisierung der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus¹³

Untersuchungen von Tobias Kanacher zeigen, dass bei einem Austausch der GAF-Domänen aus der Adenylatcyclase CyaB1 von *Anabaena sp. PCC 7120* durch die Mammalia GAF-Domänen der Ratten PDE2 die Funktion der GAF-Domänen erhalten bleibt [60, 85]. Die Validität solcher Chimären wird weiter von Sandra Bruder durch die funktionelle Verknüpfung humaner PDE5 GAF-Domänen mit der CyaB1 AC bestätigt [75, 86]. Des Weiteren zeigt diese Arbeit, dass die Signalübertragung auch von GAF-A auf das katalytische Zentrum erfolgt, die lineare Entfernung der Domäne zum katalytischen Zentrum also keinen Einfluss auf die Interaktion hat.

Die Suche nach Liganden der PDE11 GAF-Domänen mit Hilfe von Bindungsstudien war bisher erfolglos [44, 45, 106]. Die Frage war, ob eine Detektion von Liganden an das PDE11 GAF-Ensemble in einer PDE11/CyaB1-Chimäre möglich ist. Daher wurde eine Chimäre aus dem N-Terminus und der katalytischen Domäne von CyaB1¹⁴, sowie den GAF-Domänen der hPDE11A4 kloniert, d.h. es wurden nur die GAF-Domänen ausgetauscht (Abb. 4-1).

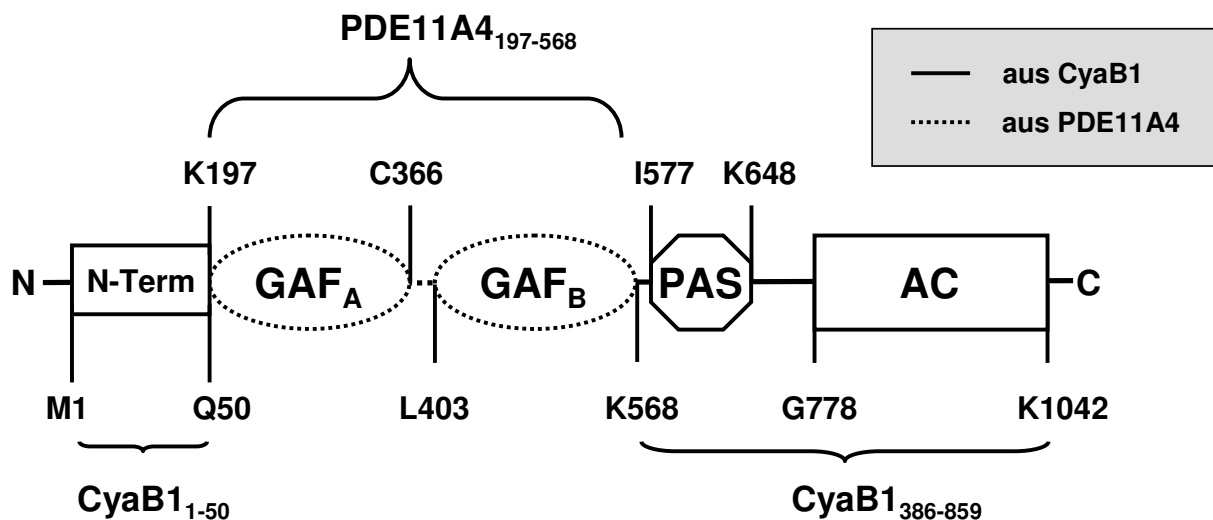


Abb. 4-1: Domänensequenz der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus (Klonierung s. 3.7.2.1)

4.1.1.1 Expression und Reinigung der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus

Zur Aufreinigung enthielt die Chimäre einen N-terminalen His₁₀-Tag. Das Molekulargewicht betrug 103,9kDa, der berechnete IEP 5,5. Nach Induktion mit 400µM IPTG wurde 5-7h exprimiert. Nach Lyse (3.2.6) wurde für 2h an Ni-NTA adsorbiert. Die Reinigung wurde mit je 2ml der Wasch-Puffer A, B und C durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 300µl Elutionspuffer A

¹³ das unter 4.1.2 beschriebene Konstrukt PDE11A4(197-568)-CyaB1 (386-859) wird nachfolgend PDE11/CyaB1 genannt, Mutationen etc. werden entsprechend angegeben

¹⁴ wenn im Folgenden von der katalytischen Domäne der CyaB1 die Rede ist, so ist immer das katalytische Zentrum gemeinsam mit der PAS-Domäne gemeint (Pos. 386-859)

mit 300mM Imidazol. Abschließend wurde zur Entfernung des Imidazol zweimal für 1h dialysiert. Die Verwendung von Proteaseinhibitoren war notwendig, um Abbau zu vermeiden. In Abb. 4-2 sieht man ein SDS-PAGE Gel und einen Western Blot des gereinigten Proteins.

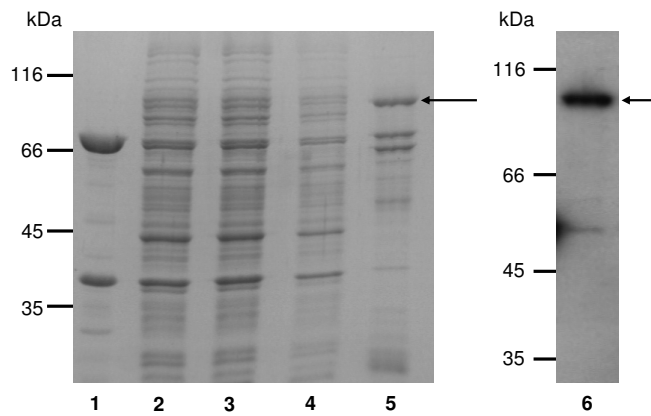


Abb. 4-2: SDS-PAGE Gel der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus
 1 Membranniederschlag; 2 Überstand nach Lyse; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 2µg Proteineluat; 6 Western Blot (1µg)

4.1.1.2 Dosis-Wirkung der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus

Bei einem AC-Test wurden cAMP und cGMP als mögliche Liganden der GAF-Domänen zugegeben. PDE11/CyaB1 mit CyaB1 N-Terminus war enzymatisch aktiv und wies eine Aktivität von $6,4 \pm 0,3 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf (Abb. 4-3)¹⁵. Allerdings kam es zu keiner Aktivierung durch Zugabe cyclischer Nukleotide (Faktor $1,38 \pm 0,12$ bei 3mM cAMP, Faktor $0,95 \pm 0,24$ bei 3mM cGMP; $n = 4$). Um auszuschließen, dass eine Stimulation während der Reinigung verloren ging, wurde zudem das Homogenat getestet (5µg Lysat pro Ansatz) mit Creatinphosphat und Creatinkinase als ATP-regenerierendem System. Auch hier zeigte sich keine Stimulation (Abb. 4-4).

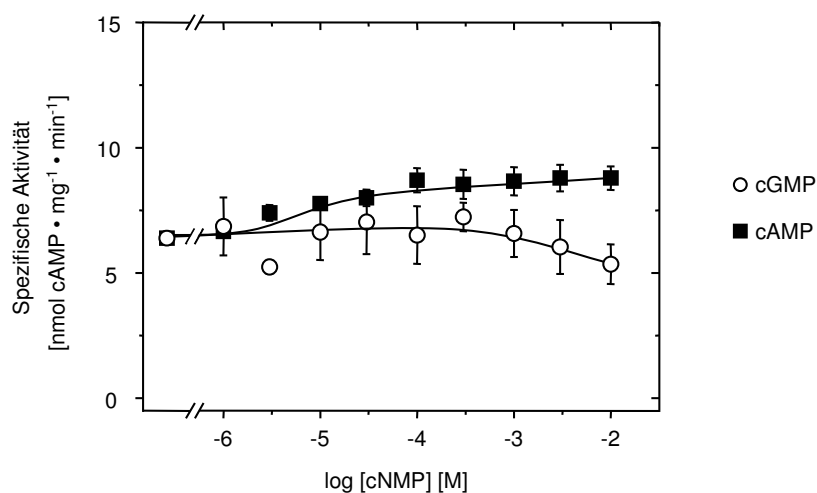


Abb. 4-3: Dosis-Wirkungs-Kurve der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; $n = 4$

¹⁵ alle in dieser Arbeit angegebenen Aktivitäten, EC₅₀-Werte, Stimulationsfaktoren etc. sind die Mittelwerte aus n Einzelwerten \pm SEM (standard error of the mean)

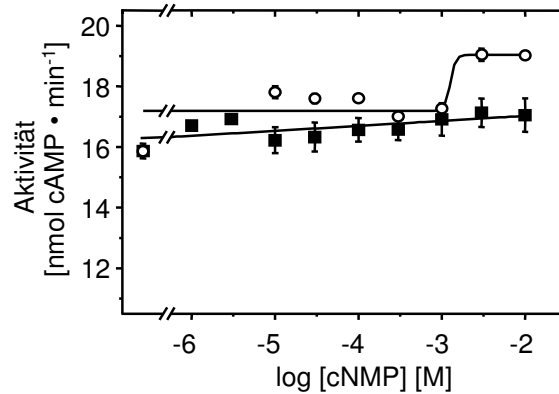


Abb. 4-4: AC-Aktivität des Lysats der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus mit cAMP (■) und cGMP (○); n = 4

4.1.1.3 Proteinabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus

Die Proteinabhängigkeitskurve von PDE11/CyaB1 mit CyaB1 N-Terminus war linear (Abb. 4-5).

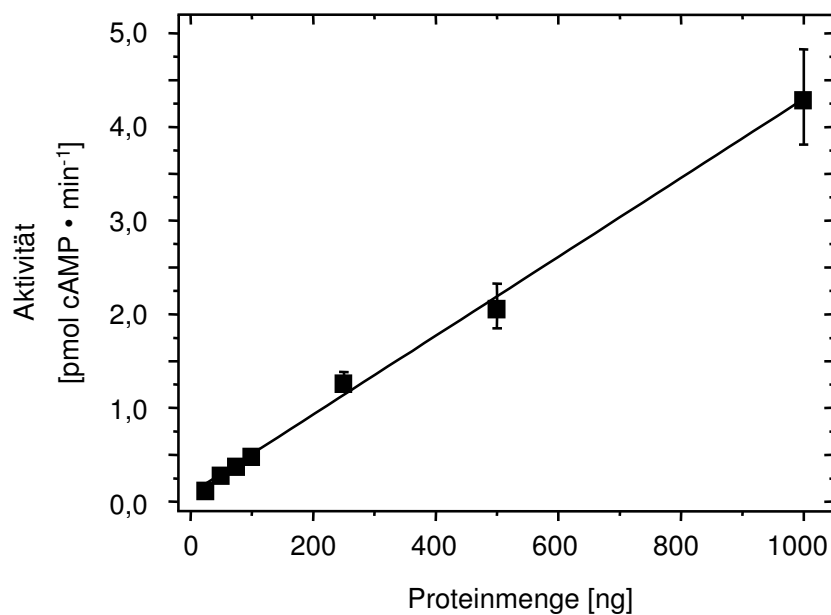


Abb. 4-5: Proteinabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4

4.1.1.4 Kinetik der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus

K_m wurde anhand des Lineweaver-Burk Plots errechnet. Er betrug $49,9 \pm 1,3 \mu\text{M}$ (n = 4), d.h. es konnte weiterhin mit 75µM ATP getestet werden. Der K_m -Wert unterschied sich nur unwesentlich von dem des CyaB1-Holoenzym (38±1µM; [85]). V_{max} betrug $10,3 \pm 0,3 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Der Hill-Koeffizient war $0,96 \pm 0,03$ (keine Kooperativität; Abb. 4-6).

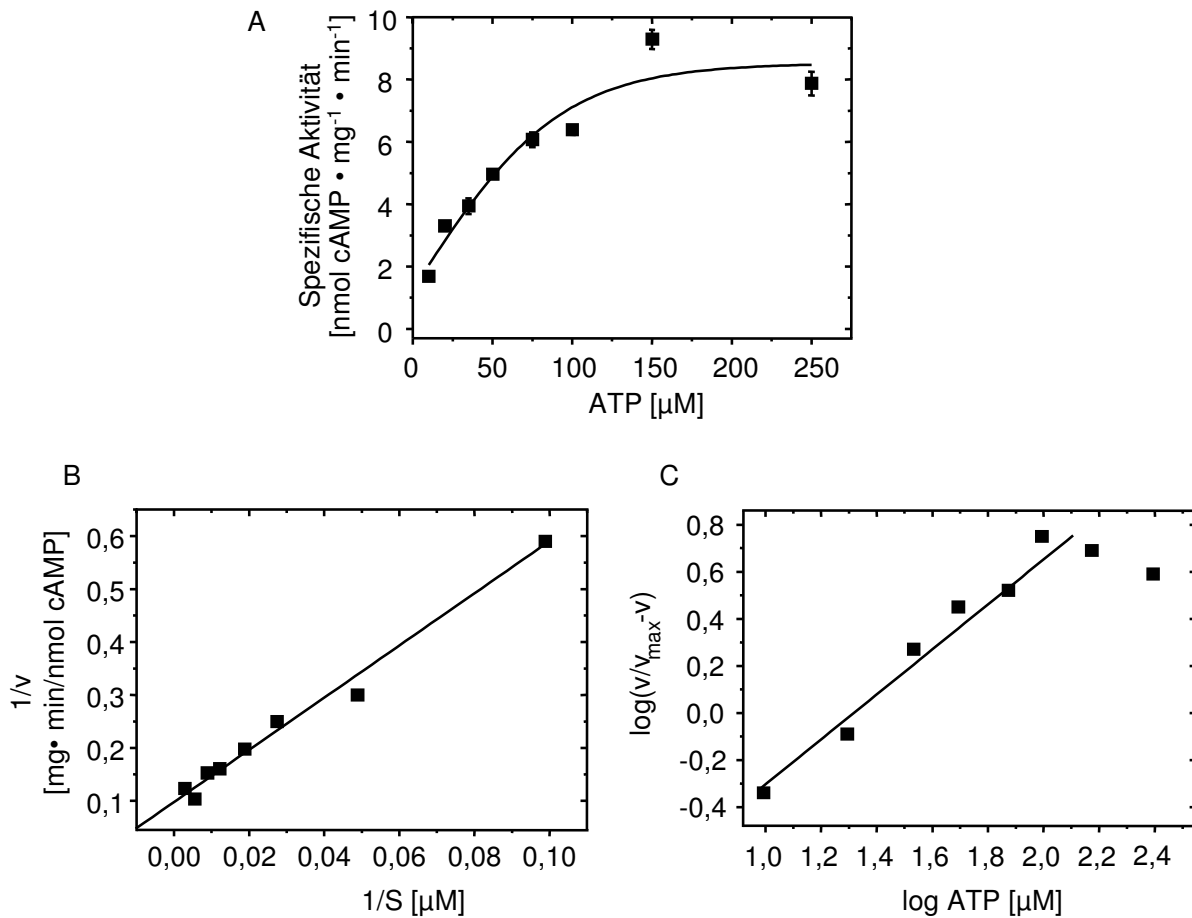


Abb. 4-6: Substratkinetik der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus; Testbedingungen: 10min, 37°C, 10 - 250 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; Auftragung nach A: Michaelis-Menten; B: Lineweaver-Burk ($R^2 = 0,986$); C: Hill ($R^2 = 0,954$)

4.1.1.5 pH-Abhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus

Das pH-Optimum lag bei zwischen pH 7 und 8 (Abb. 4-7).

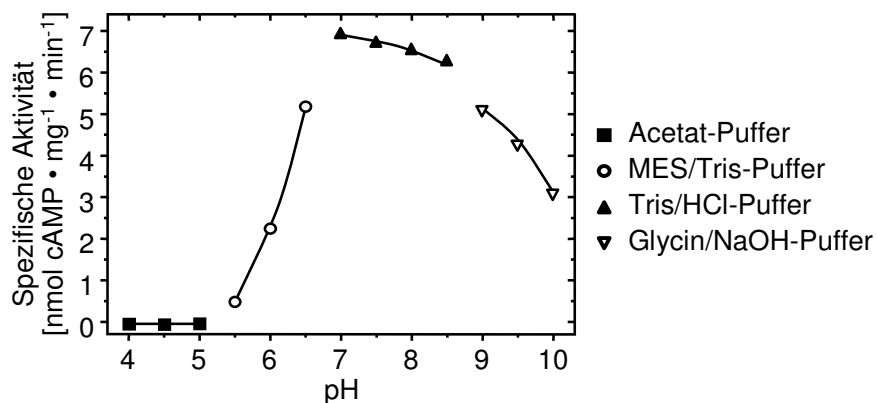


Abb. 4-7: pH-Abhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75 μM ATP; n = 2

4.1.1.6 Temperaturabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus

Das Temperaturoptimum von PDE11/CyaB1 mit CyaB1 N-Terminus lag bei etwa 42°C (Abb. 4-8A), d.h. nahe beim Optimum von CyaB1 (40°C; [85]). Um eine Vergleichbarkeit mit dem Holoenzym und mit anderen Chimären zu gewährleisten, wurde bei 37°C getestet¹⁶. Die Aktivierungsenergie betrug $44,6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ und lag somit im Bereich der Aktivierungsenergie des CyaB1-Holoenzym (65 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$; [85]; Abb. 4-8B).

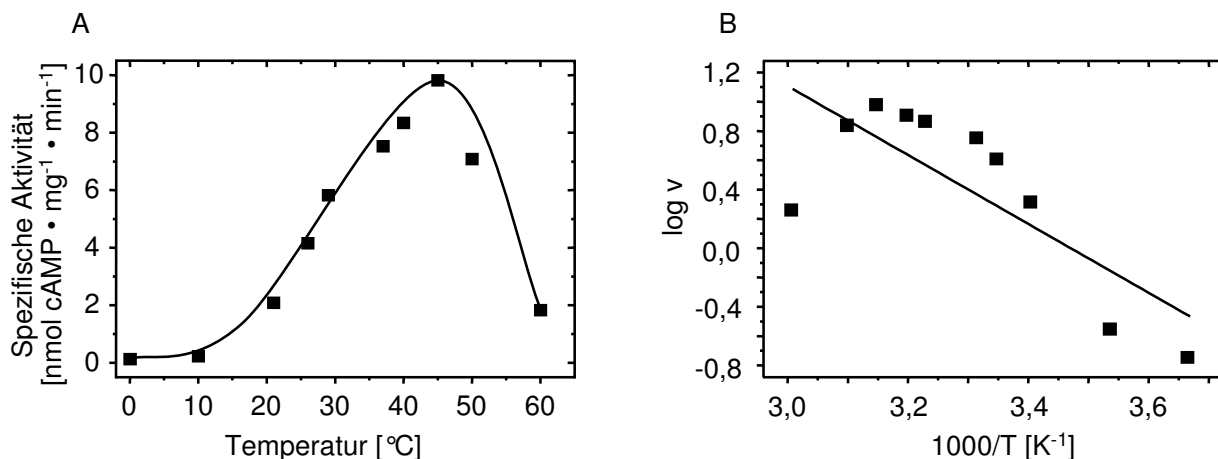


Abb. 4-8: Temperaturabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus (A) und Arrheniusplot (B); Testbedingungen: 10min, 0-60°C, 75 μM ATP; n = 4

4.1.1.7 Zeitabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus

Die Zeitabhängigkeit war linear (Abb. 4-9A; $R^2 = 0,978$). Bei Auftragung der spezifischen Aktivität (Abb. 4-9B) kann man erkennen, dass die maximale spezifische Aktivität ($7,8\pm 0,1\text{nmol cAMP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) nach knapp 6min erreicht wurde, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Proben gekühlt auf den 37°C Block gestellt wurden.

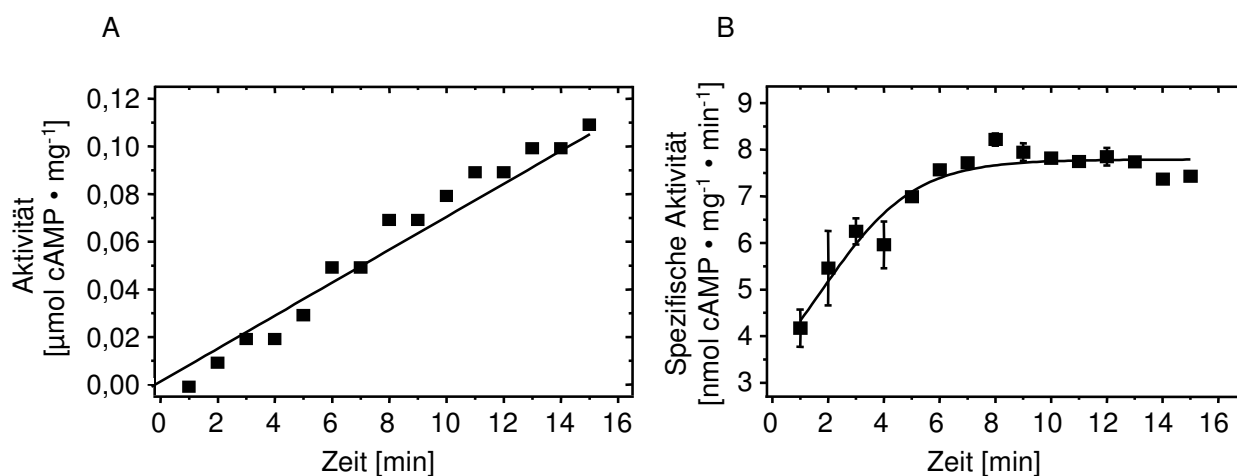


Abb. 4-9: Zeitabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus; Testbedingungen: 1-15min, 37°C, 75 μM ATP; n = 4

¹⁶ dies gilt für alle in dieser Arbeit besprochenen Proteine

4.1.2 Biochemische Charakterisierung der PDE11/CyaB1-Chimäre

Als nächstes wurde der N-terminale Bereich der CyaB1 (1-385) durch den der PDE11A4 (1-196) ersetzt (Abb. 4-10).

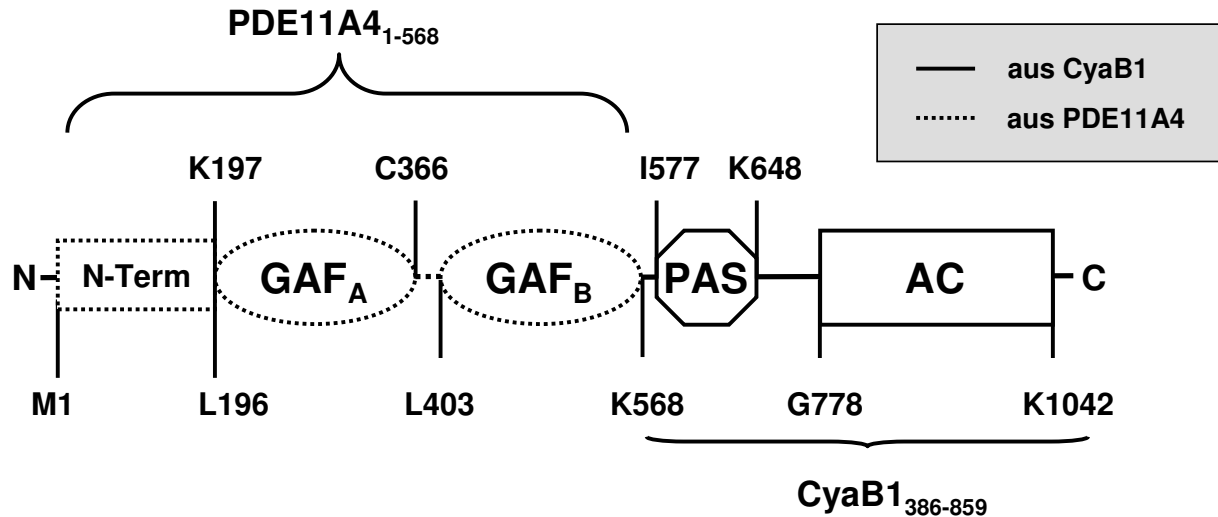


Abb. 4-10: Modularer Aufbau der PDE11/CyaB1-Chimäre

4.1.2.1 Expression und Reinigung der PDE11/CyaB1-Chimäre

Die Klonierung erfolgte wie unter 3.7.2.2 beschrieben. Die Expression und Reinigung erfolgten wie bei PDE11/CyaB1 mit CyaB1 N-Terminus beschrieben (4.1.1.1). Ein SDS-PAGE Gel des gereinigten Proteins ist in Abb. 4-11 zu sehen.

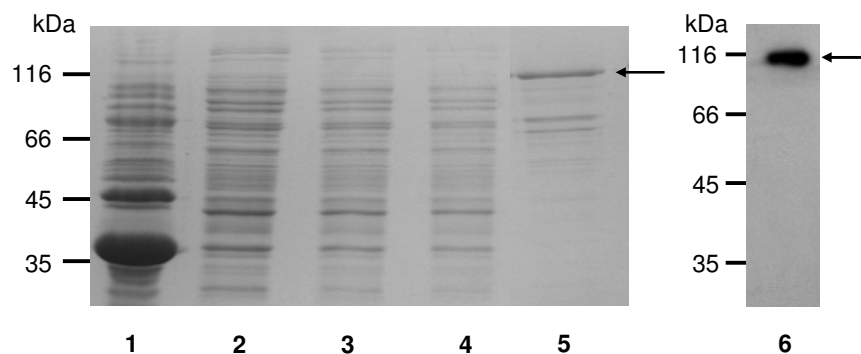


Abb. 4-11: SDS-PAGE Gel der PDE11/CyaB1-Chimäre; 1 Membranniederschlag; 2 Überstand nach Lyse; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 2 µg Protein eluat; 6 Western Blot (1 µg)

4.1.2.2 Dosis-Wirkung der PDE11/CyaB1-Chimäre

Die PDE11/CyaB1-Chimäre ist aktiv (Basalwert: $5,8 \pm 0,3 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $n = 4$; Abb. 4-12) und es kommt zu einer Aktivierung durch cGMP (Faktor $3,8 \pm 0,4$ bei 3 mM cGMP). cAMP aktiviert nicht (Faktor $1,3 \pm 0,3$ bei 3 mM cAMP). Der relativ späte und flache Anstieg der cGMP-Kurve zeigt erst bei höheren cGMP Konzentrationen eine Stimulation. Der EC_{50} -Wert beträgt $72,5 \pm 10,1 \mu\text{M cGMP}$ und ist somit weit entfernt von den in der Zelle üblichen cGMP-Konzentrationen. Der Hill-Koeffizient betrug $0,60 \pm 0,04$ (keine Kooperativität).

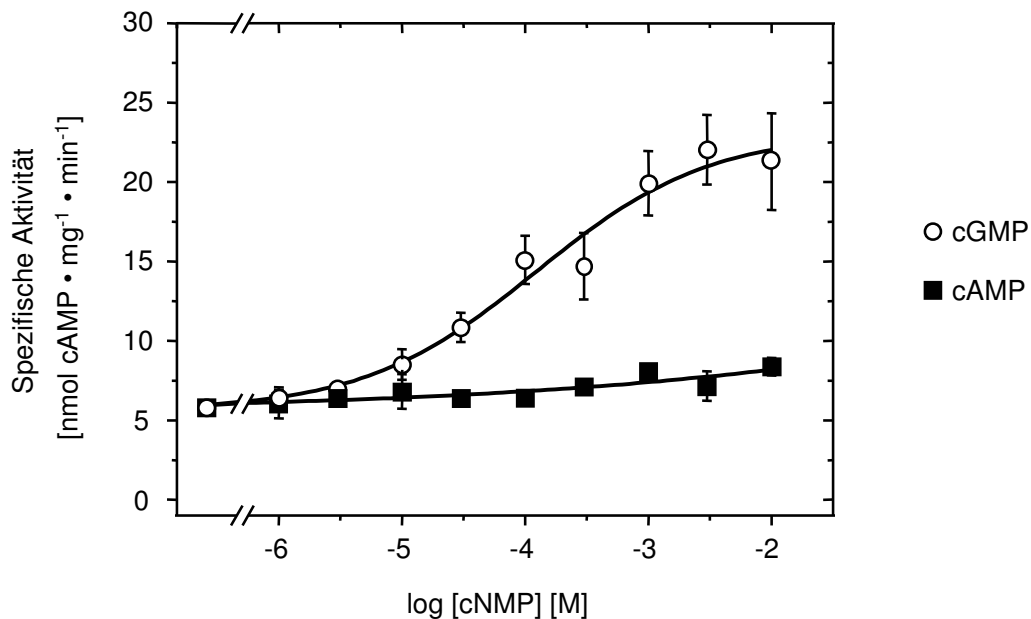


Abb. 4-12: Dosis-Wirkungs-Kurve der PDE11/CyaB1-Chimäre; Testbedingungen: 10min, 37°C , $75 \mu\text{M ATP}$, Tris/HCl pH 7,5; $n = 4$;

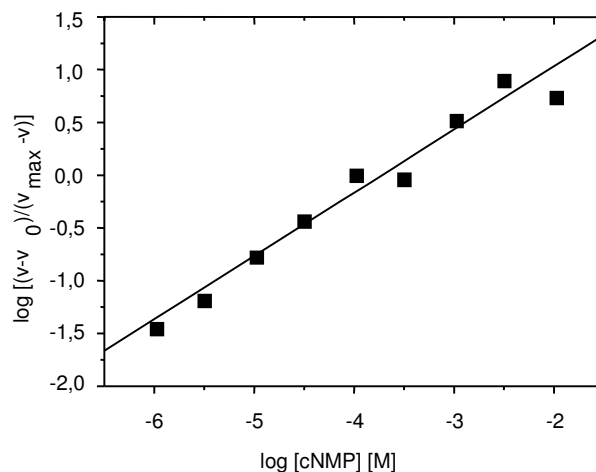


Abb. 4-13: Bestimmung des Hill-Koeffizienten der PDE11/CyaB1-Chimäre; $n = 4$; $R^2 = 0,965$

4.1.2.3 Proteinabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre

Auch bei PDE11/CyaB1 ist die Proteinabhängigkeit linear (Abb. 4-14; $R^2_{\text{unstimuliert}} = 0,997$ und $R^2_{\text{stimuliert mit 3mM cGMP}} = 0,996$). Das deutet darauf hin, dass die Dimerisierung der GAF-Domänen, die für die Stimulation notwendig ist, bereits bei niedrigen Proteinkonzentrationen erfolgte.

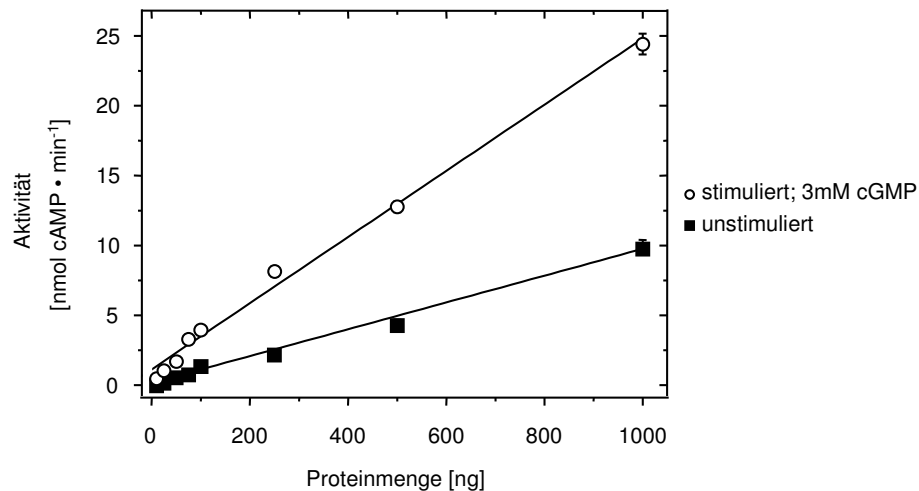


Abb. 4-14: Proteinabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4

4.1.2.4 pH-Abhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden verschiedene Puffersysteme verwendet. Im pH-neutralen Bereich ist die Aktivität in MOPS/Tris- und Tris/HCl-Puffer am höchsten (Abb. 4-16). Nachfolgend wurden alle Tests in Tris/HCl-Puffer durchgeführt.

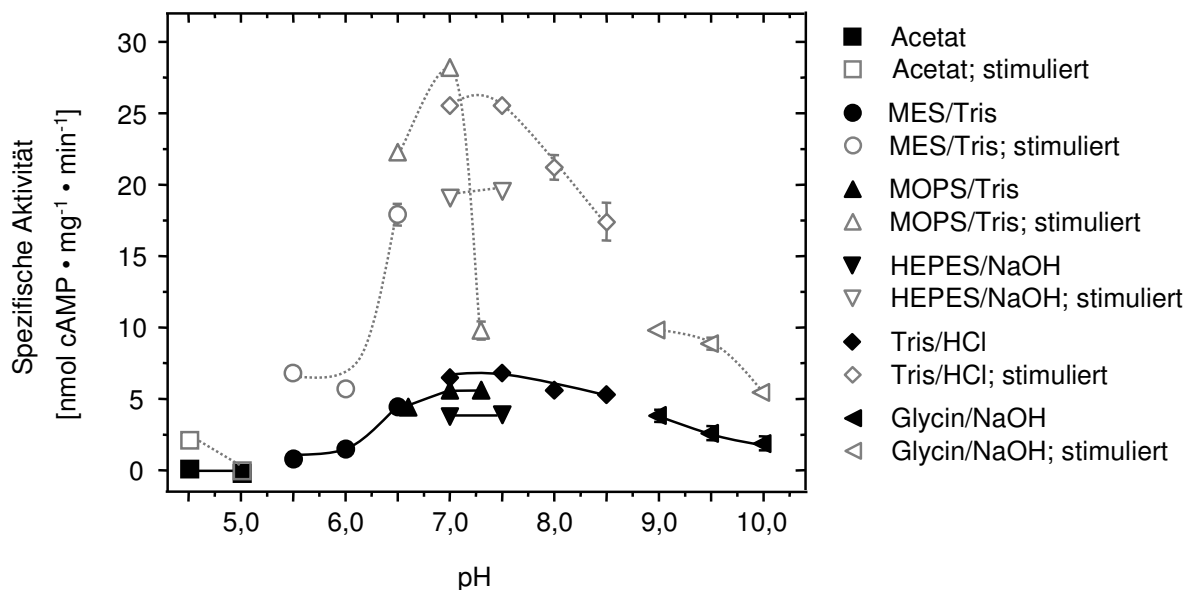


Abb. 4-16: pH-Abhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, pH 4,0 – 10,0; n = 4

4.1.2.5 Kinetik der PDE11/CyaB1-Chimäre

Die kinetischen Parameter von PDE11/CyaB1 für ATP waren vergleichbar mit denen des Konstrukts mit CyaB1 N-Terminus ($K_m = 20,9 \pm 0,9 \mu\text{M}$ und $15,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 9,8 \pm 0,3$ und $22,0 \pm 0,8 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, jeweils $\pm 3 \text{ mM cGMP}$; Abb. 4-15).

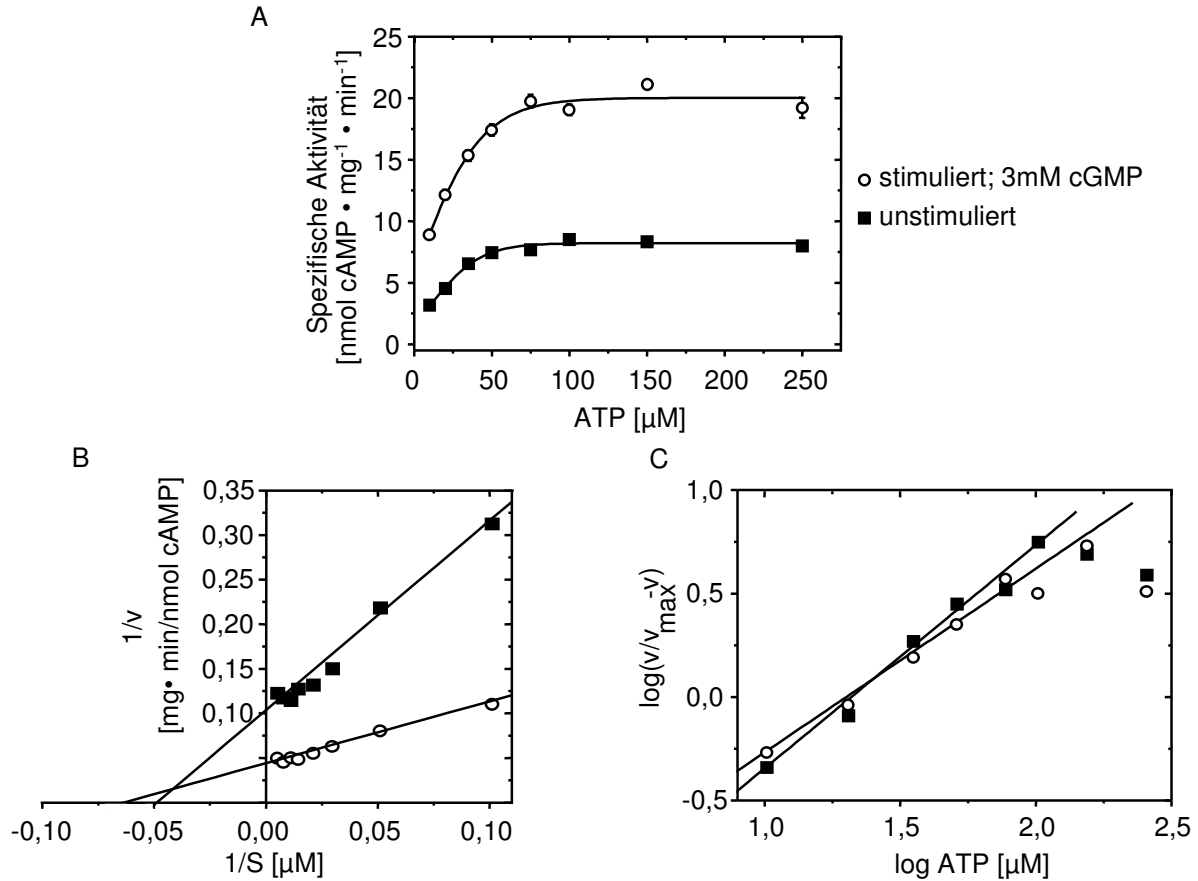


Abb. 4-15: Substratkinetik der PDE11/CyaB1-Chimäre $\pm 3 \text{ mM cGMP}$; Testbedingungen: 10min, 37°C, 10 - 250 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; Auftragung nach A: Michaelis-Menten; B: Lineweaver-Burk ($R^2 = 0,981$ bzw. 0,985); C: Hill ($R^2 = 0,983$ bzw. 0,990)

4.1.2.6 Temperaturabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre

Das Temperaturoptimum lag bei etwa 48°C, d.h. etwas höher als beim Konstrukt mit CyaB1 N-Terminus (42°C; Abb. 4-17) und beim CyaB1-Holoenzym (40°C; [85]).

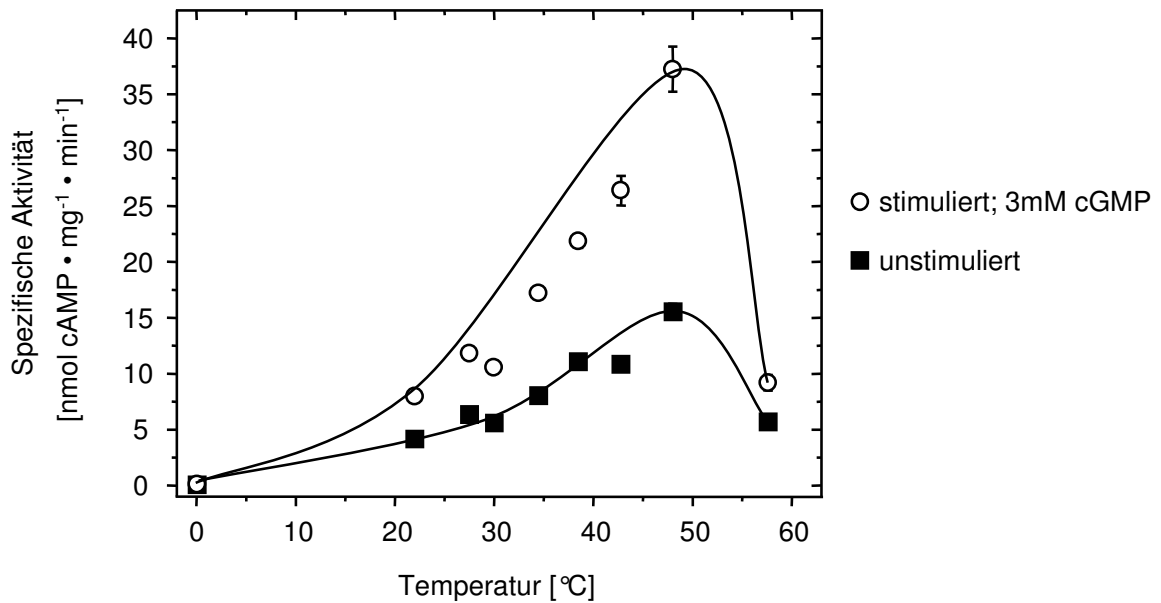


Abb. 4-17: Temperaturabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre; Testbedingungen: 10min, 0-60°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4

Die Aktivierungsenergie berechnet aus dem Arrheniusplot (Abb. 4-18) betrug 58,2 und 63,2kJ·mol⁻¹·K⁻¹ (± 3mM cGMP; Holoenzym: 65kJ·mol⁻¹·K⁻¹; [85]).

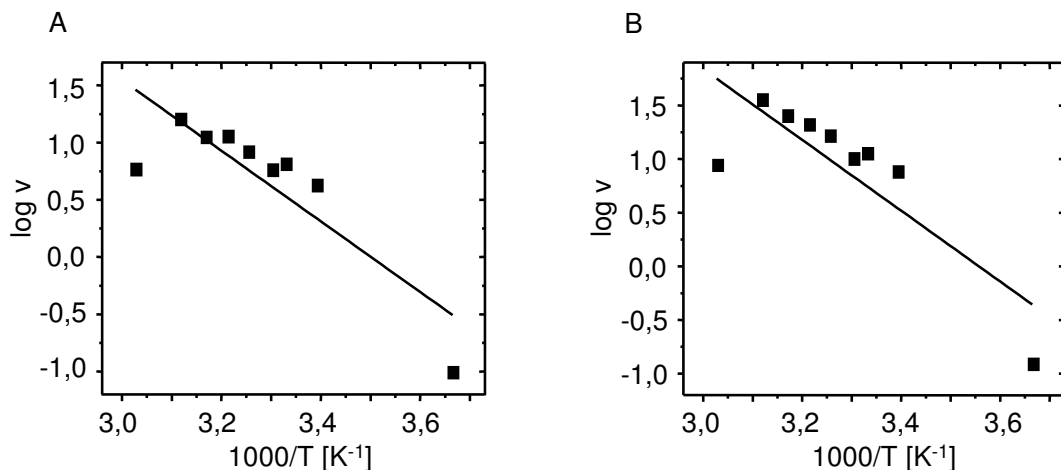


Abb. 4-18: Arrhenius Plot der PDE11/CyaB1-Chimäre, unstimuliert (A) und +3mM cGMP (B); n = 4

4.1.2.7 Zeitabhängigkeit und K_{on} -Wert der PDE11/CyaB1-Chimäre

Die Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung war linear ab der siebten Minute, was allerdings nur bei Auftragung der spezifischen Aktivität gegen die Zeit zu erkennen ist. (Abb. 4-19).

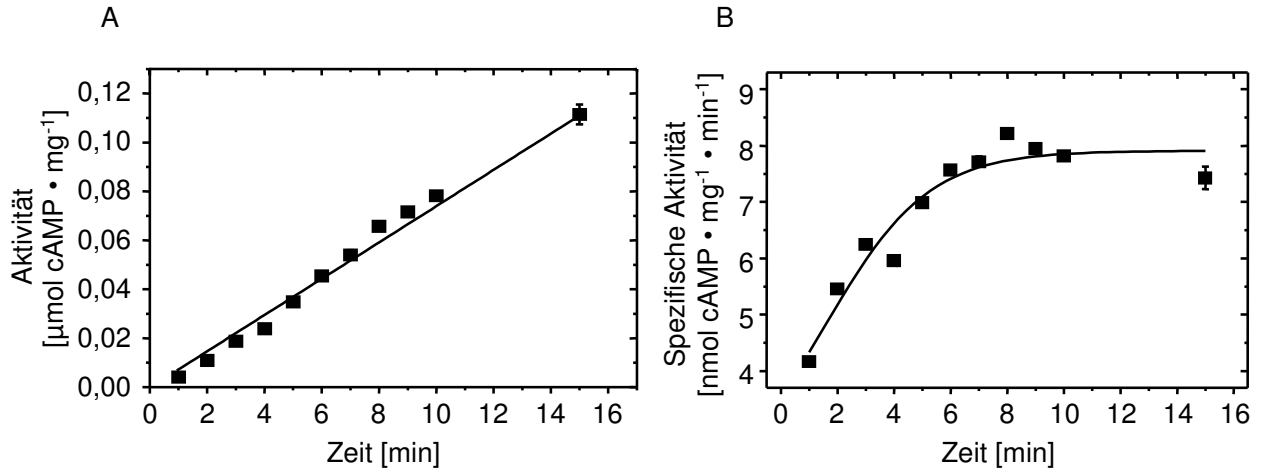


Abb. 4-19: Zeitabhängigkeit der PDE11/CyaB1-Chimäre; Testbedingungen: 1-15min, 37°C, 75 μM ATP; $R^2 = 0,944$; $n = 4$

Als Maß für die Assoziation von cGMP an die GAF-Domänen wurde der K_{on} -Wert bestimmt. Dazu wurden die Proben nicht für 10min vor dem Reaktionsstart mit cGMP vorinkubiert. Außerdem erfolgte der Start der Reaktion nicht durch Zugabe des Substrats, sondern durch Zugabe des Proteins. Wie bei der Zeitabhängigkeit wurde für 1-15min inkubiert. Der Vergleich der K_{on} -Kurve mit der stimulierten Zeitabhängigkeitskurve (Abb. 4-20) zeigt, dass es auch augenblicklich zu einer Stimulation kam. Die beiden Kurven unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (bei jedem Punkt $p > 0,05$).

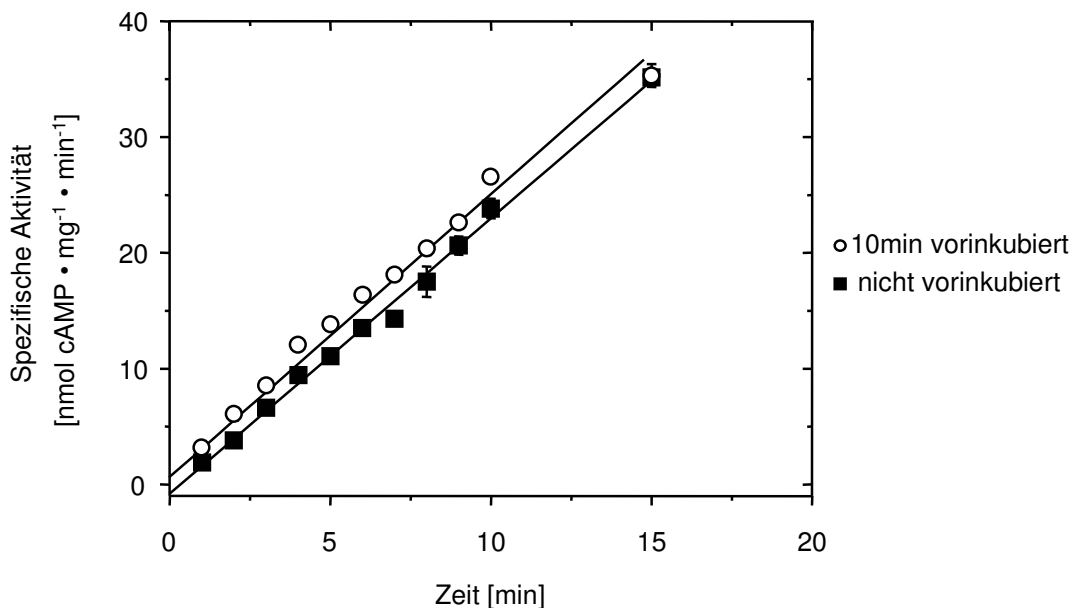


Abb. 4-20: K_{on} -Wertbestimmung der PDE11/CyaB1-Chimäre; $R^2 = 0,995$ (o) bzw. $R^2 = 0,992$ (■); $n = 4$

4.1.2.8 K_{off} -Wert der PDE11/CyaB1-Chimäre

Der K_{off} -Wert ermöglicht eine Aussage über die Geschwindigkeit der cGMP Abdissoziation von den GAF-Domänen. Das Protein wurde zunächst mit 1mM cGMP stimuliert und nach 5, 15, 45, 75 und 180min auf 5 μ M cGMP verdünnt und der Test wurde gestartet. Die Aktivität war dann bereits nach 5min wieder auf den Basalwert gesunken (Abb. 4-21). Die Durchführung des Tests weniger als fünf Minuten nach der Verdünnung war aus technischen Gründen nicht möglich.

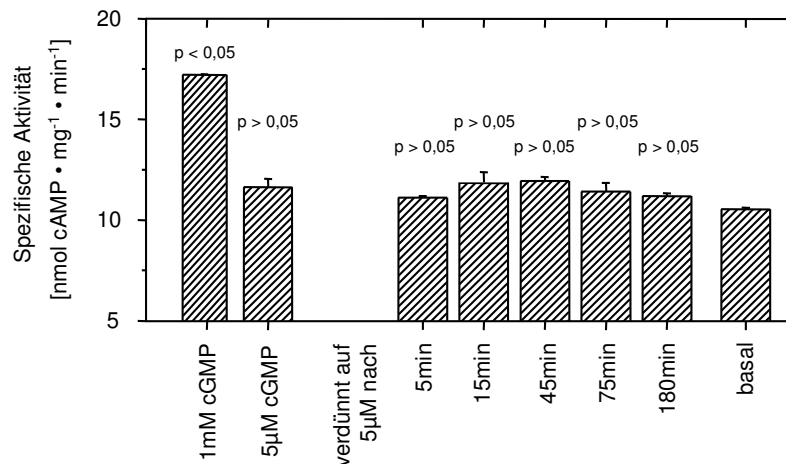


Abb. 4-21: K_{off} -Wertbestimmung der PDE11/CyaB1-Chimäre; n = 4

4.1.2.9 Einfluss anderer Nucleoside und Nucleotide auf die PDE11/CyaB1-Chimäre

Die Untersuchung des Einflusses von cGMP-Analoga sollte zum einen Hinweise auf für die Bindung an die GAF-Domänen essentielle Elemente des cGMP geben. Auch ließen sich eventuell Rückschlüsse auf an der Bindung beteiligte Asn innerhalb der GAF-Domänen ziehen. Zum anderen bestand die Möglichkeit, dass es neben cGMP noch weitere Liganden gibt, die eventuell mit höherer Affinität an die GAF-Domänen binden. Der hohe EC_{50} -Wert von 72,5 μ M ließ dies vermuten. Getestet wurden cGMP-Analoga mit 100 μ M und 3mM. Mit 100 μ M wurde dicycloGMP als bakterieller *second messenger* getestet [107, 108]. Es zeigte sich, dass Variationen an allen funktionellen Gruppen des cGMP zu einer Reduzierung der Stimulation auf 30-60% führten. Die Unterschiede zur Stimulation mit der gleichen Konzentration cGMP waren allesamt signifikant (Abb. 4-22).

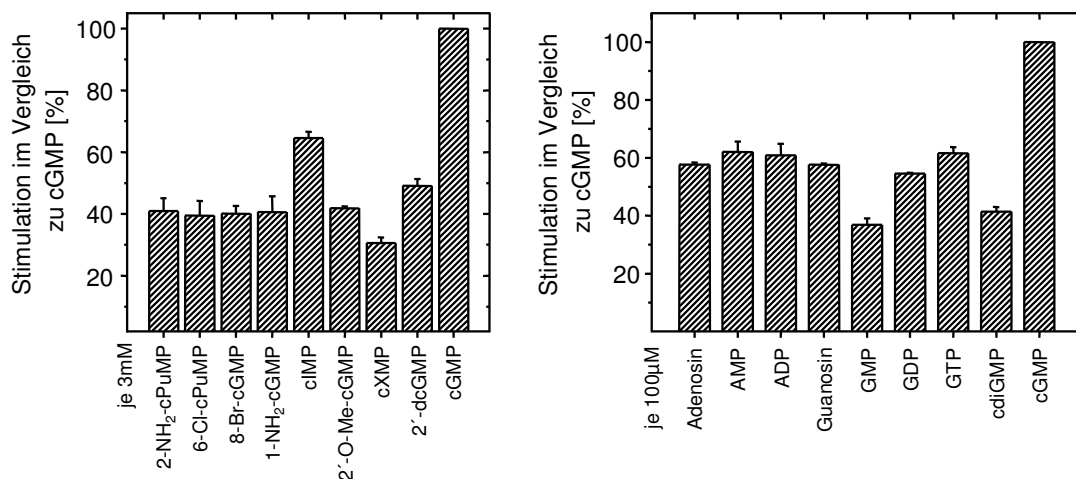


Abb. 4-22: Einfluss verschiedener Nucleoside und Nucleotide auf die PDE11/CyaB1-Chimäre; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75 μ M ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4

4.1.3 Untersuchungen zur Nukleotidbindung und –spezifität

Wie einleitend erwähnt, wird einem NKFDE-Motiv, das in 12 der 14 GAF-Domänen¹⁷ in Säuger-PDEn auftaucht, eine Bedeutung bei der Bindung des Liganden [71, 72] oder bei der Stabilisierung der Bindetasche [73, 74] zugeordnet. Daher wurden sowohl innerhalb des NKFDE-Motivs in der GAF-A, als auch innerhalb des NRFDQ-Motivs in der GAF-B Punktmutationen vorgenommen, um Hinweise auf die Bindung des cGMP an die PDE11A4 GAF-Domänen zu bekommen.

4.1.3.1 PDE11/CyaB1-D355A

Zunächst wurde der Asp-355 Rest des NKFDE-Motivs in GAF-A zu Alanin mutiert. Die Expression und Reinigung erfolgte wie bei der PDE11/CyaB1-Chimäre mit CyaB1 N-Terminus (Klonierung s. 3.7.2.5). Der AC-Test zeigte eine Mutante mit geringerer Basalaktivität ($2,2 \pm 0,2 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), Stimulation (Faktor $2,6 \pm 0,3$ bei 3 mM cGMP) und cGMP Affinität ($EC_{50} = 162,5 \pm 12,8 \mu\text{M}$ cGMP; $n = 4$) im Vergleich zur PDE11/CyaB1-Chimäre (Abb. 4-23).

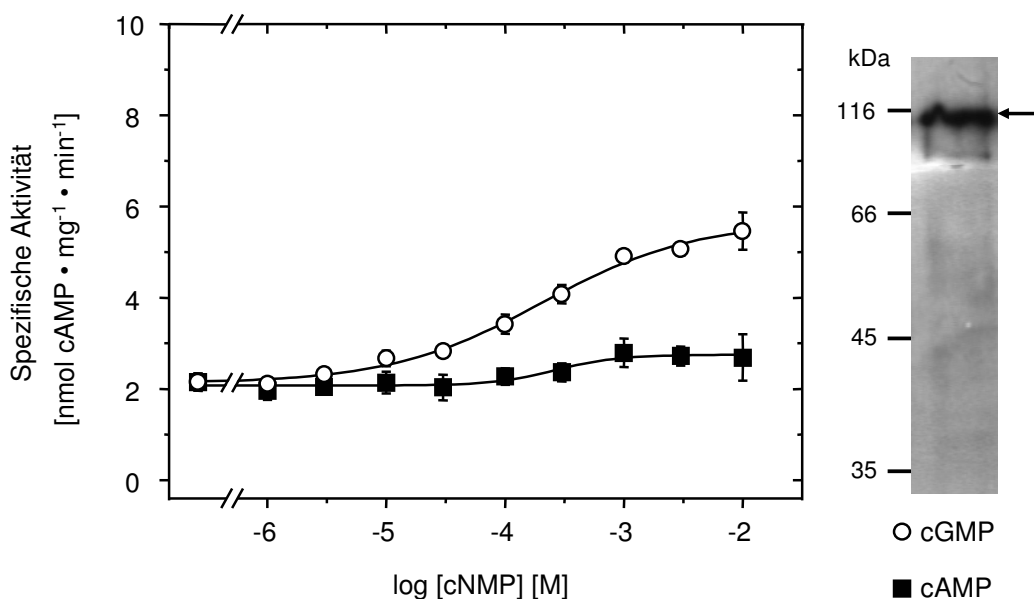


Abb. 4-23: Dosis-Wirkungs-Kurve von PDE11/CyaB1-D355A; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; $n = 4$; rechts: Western Blot mit 1µg Protein

Es ist wahrscheinlich, dass das NKFDE Motiv der GAF-A zumindest teilweise an der cGMP-Bindung beteiligt ist. Um auszuschließen, dass das veränderte Verhalten der Mutante im Vergleich zur PDE11/CyaB1-Chimäre auf Veränderungen des katalytischen Zentrums beruht, wurden zudem die kinetischen Parameter der D355A-Mutante bestimmt.

Diese hatten sich nur leicht geändert ($K_m = 26,2 \pm 3,0 \mu\text{M}$; $V_{\max} = 7,2 \pm 0,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; Hill-Koeffizient: $0,444 \pm 0,046$; $n = 4$; Abb. 4-24) und liefern somit keine Erklärung für die veränderten Bindungseigenschaften.

¹⁷ vgl. Fußnote 4 und Abb. 1-3

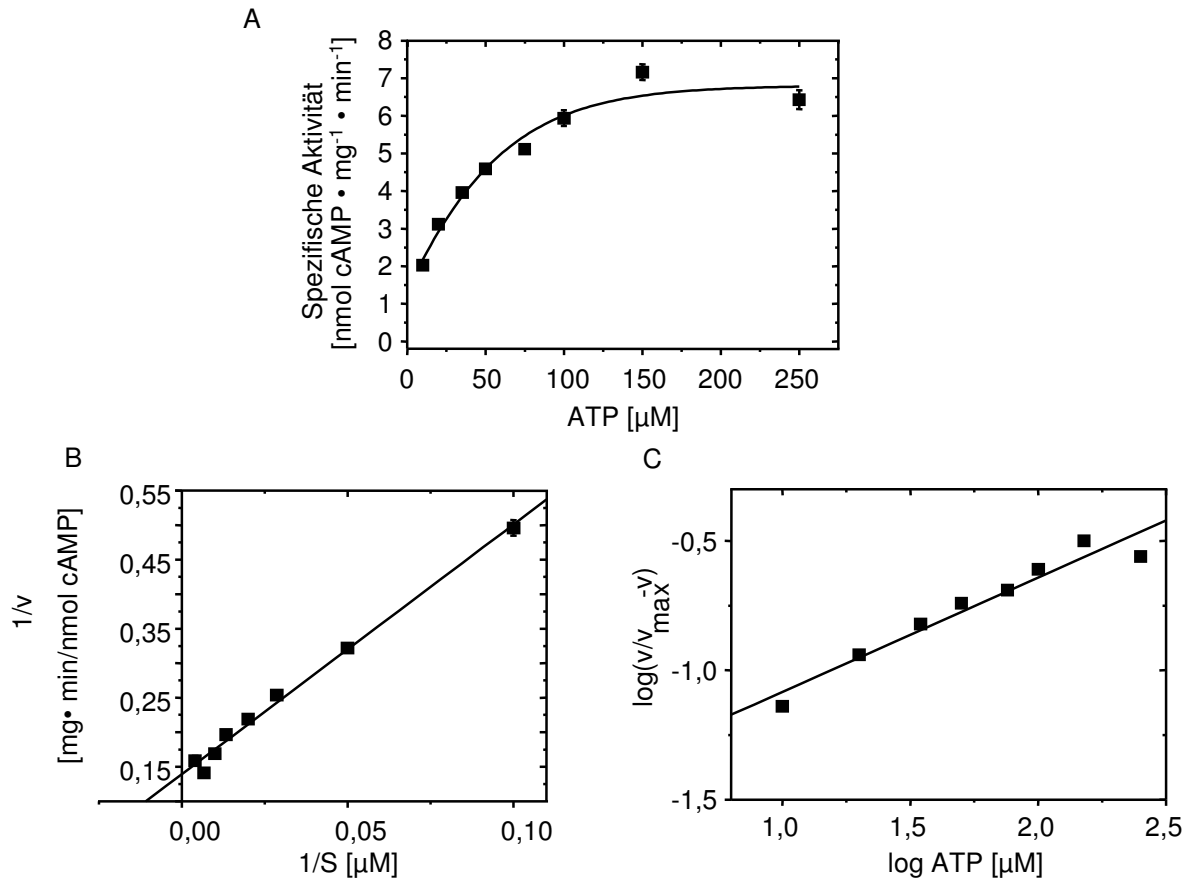


Abb. 4-24: Substratkinetik von PDE11/CyaB1-D355A; Testbedingungen: 10min, 37°C, 10 - 250μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; Auftragung nach A: Michaelis-Menten; B: Lineweaver-Burk ($R^2 = 0,991$); C: Hill ($R^2 = 0,940$)

4.1.3.2 PDE11/CyaB1-Q535E und -D355A/Q535E

Um herauszufinden, ob ein vollständiges NKFDE-Motiv in GAF-B zur Stimulation der katalytischen Domäne beitragen würde, oder eventuell die Affinität des GAF-Ensembles für cGMP oder auch cAMP erhöht, wurde das NRFDQ-Motiv nach NRFDE im Wildtyp und in PDE11/CyaB1-D355A mutiert. Nach der Klonierung (3.7.2.6) wurden die Plasmide in BL-21-Zellen transformiert und wie bisher exprimiert und gereinigt.

AC-Tests zeigten, dass die Proteine etwa zwei- bis dreimal so aktiv waren wie die Ausgangsproteine (Abb. 4-25). Allerdings waren die EC_{50} -Werte (Q/E: $87,8 \pm 45,8 \mu\text{M}$; D/A-Q/E: $129,5 \pm 2,4 \mu\text{M}$) und die Stimulationen (Q/E: Faktor $3,5 \pm 0,6$ bei 3mM cGMP; Faktor $1,5 \pm 0,2$ bei 1mM cAMP; D/A-Q/E: Faktor $3,1 \pm 0,5$ bei 3mM cGMP; Faktor $1,1 \pm 0,1$ bei 10mM cAMP) nur unwesentlich verändert. Von einer verstärkten Nukleotidbindung im NRFDE Motiv in GAF-B kann also nicht gesprochen werden.

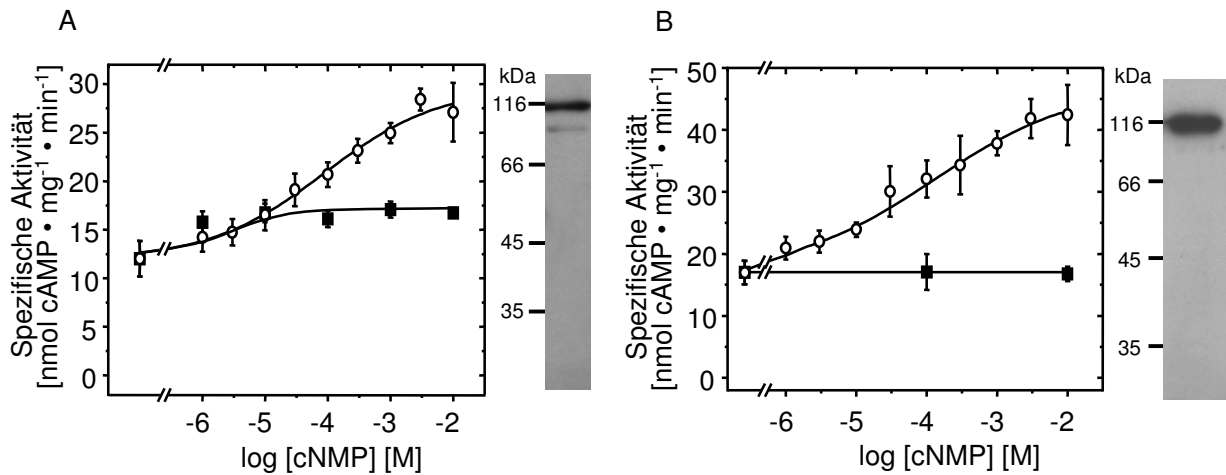


Abb. 4-25: Dosis-Wirkungs-Kurven von PDE11/CyaB1-Q535E (A) und -D355A/Q535E (B) mit cAMP (■) und cGMP (○); Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 6; jeweils rechts: Western Blots mit je 1µg Protein

4.1.3.3 PDE11/CyaB1-D534A

Die Affinität und Stimulation ließen sich durch eine Mutation des NRFDQ-Motivs zwar nicht erhöhen, eine Nukleotidbindung in GAF-B konnte aber nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde in der GAF-B der Aspartatrest des NRFDQ-Motivs nach Alanin mutiert. Der AC-Test von PDE11/CyaB1-D534A ergab, dass sich die Eigenschaften im Vergleich zum Chimären-Wildtyp kaum änderten (Abb. 4-26). Der cGMP EC₅₀-Wert hatte sich verdoppelt (156,3±7,8µM), die Stimulation durch cGMP und cAMP war etwa gleich geblieben (Faktor 3,3±0,3 bei 3mM cGMP; Faktor 1,2±0,1 bei 10mM cAMP). Von einer cGMP-Bindung an GAF-B ist somit nicht auszugehen.

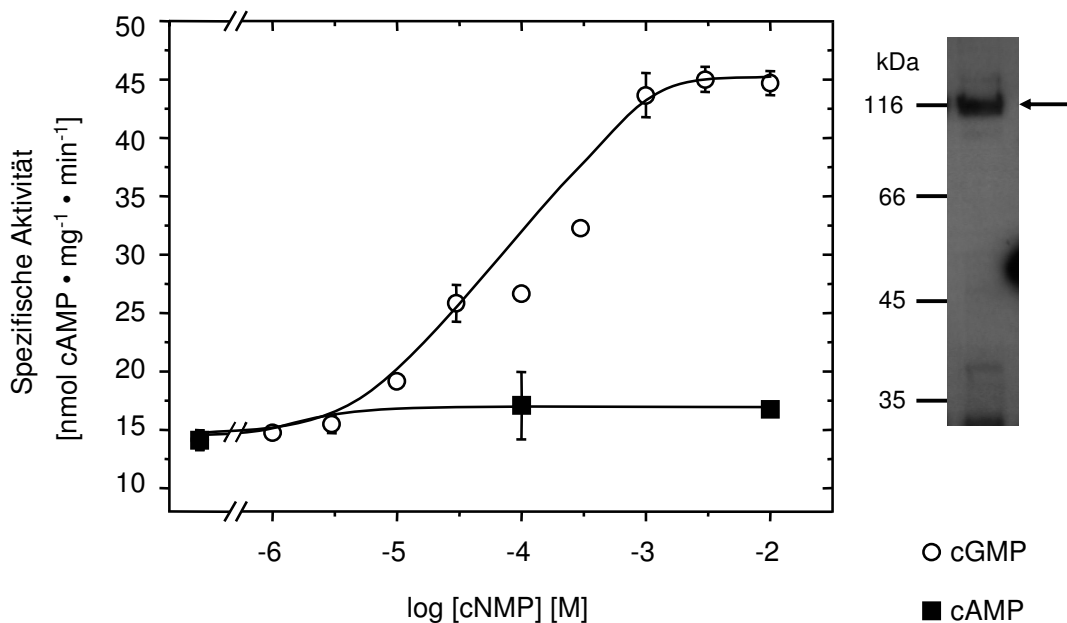


Abb. 4-26: Dosis-Wirkungs-Kurve von PDE11/CyaB1-D534A; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; rechts: Western Blot mit 1µg Protein

4.1.3.4 GAF-A Konstrukt

Möglicherweise ist GAF-B an der Dimerisierung beteiligt, da alle bisher beschriebenen GAF-Domänen in Mammalia-PDEn nur als Dimer funktionstüchtig sind. Um zu zeigen, dass die Anwesenheit der GAF-B für die Signalweiterleitung zum katalytischen Zentrum notwendig ist, wurde ein Konstrukt kloniert, der nur aus der GAF-A der PDE11A4 und der katalytischen Domäne der Cyb1 besteht (3.7.2.15).

Wie erwartet kam es zu keiner Stimulation (Abb. 4-27). Dies zeigte, dass die GAF-B für eine Signalweiterleitung essentiell ist, wahrscheinlich durch eine Beteiligung an der Dimerisierung.

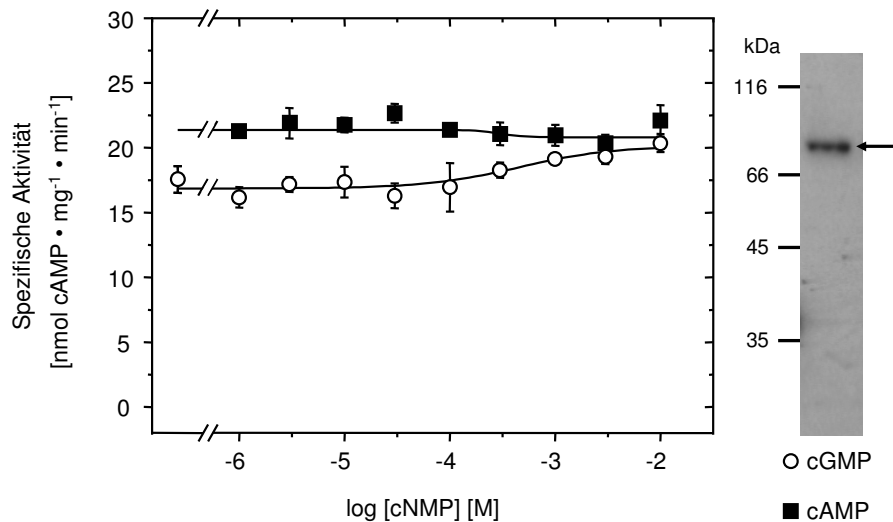


Abb. 4-27: Dosis-Wirkungs-Kurve des GAF-A Konstrukts; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; rechts: Western Blot mit 0,2 μg Protein

Die kinetischen Parameter haben sich im Vergleich zum Chimären-Wildtyp kaum geändert, der K_m -Wert betrug $18,0 \pm 2,1 \mu\text{M}$, der V_{\max} -Wert $18,1 \pm 1,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Der Hill-Koeffizient war $0,380 \pm 0,050$ (Abb. 4-28).

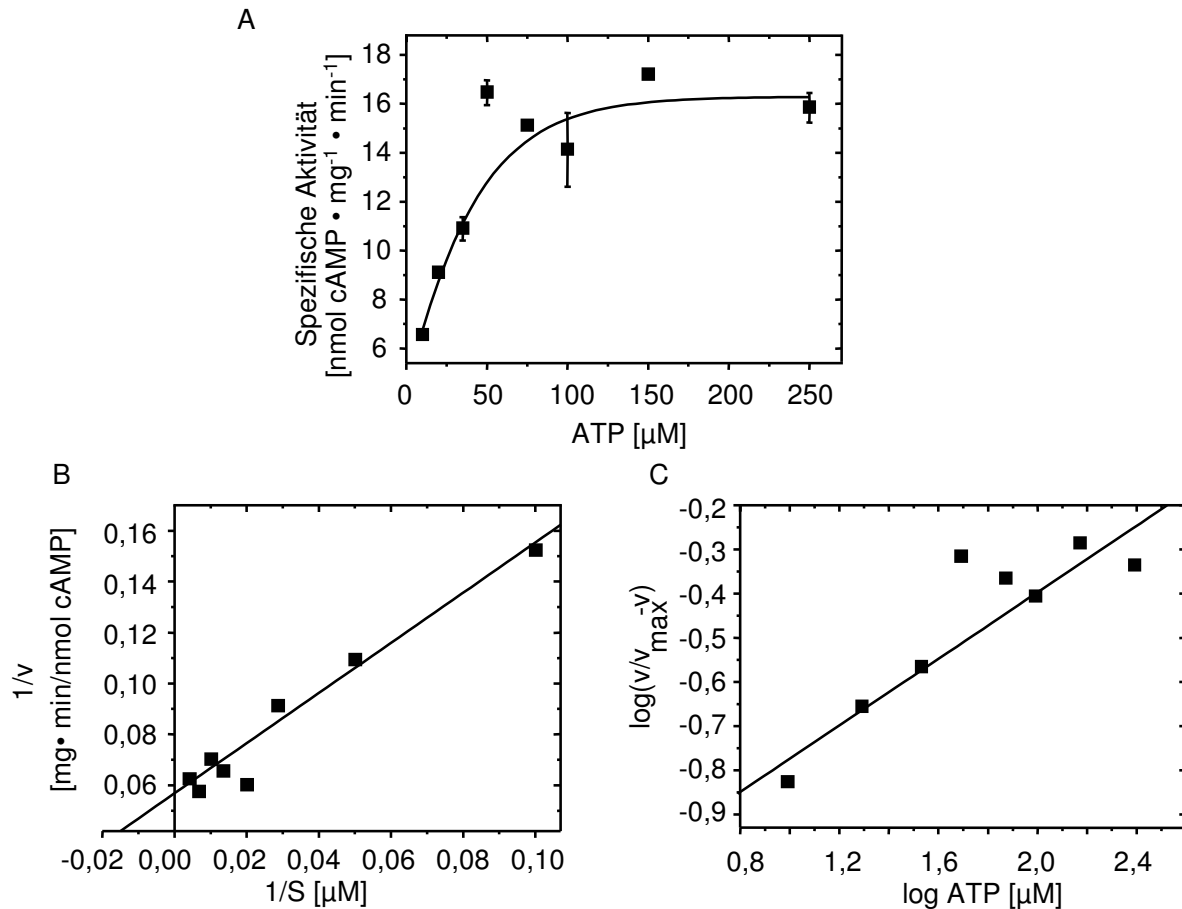


Abb. 4-28: Substratkinetik des GAF-A Konstrukts; Testbedingungen: 10min, 37°C, 10 - 250 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; Auftragung nach A: Michaelis-Menten; B: Lineweaver-Burk ($R^2 = 0,952$); C: Hill ($R^2 = 0,921$)

4.1.3.5 PDE11/CyaB1-F258A

In der Kristallstruktur [73] und in Mutagenesestudien der mPDE2 GAF-Domänen [74] wurden drei ASn identifiziert, die für die Diskriminierung zwischen cGMP und cAMP zuständig sind: Phe-438, Asp-439 und Thr-488. Durch Einzel-, Doppel- und Tripelmutationen nach Alanin wurde der IC_{50} -Wert für cAMP erniedrigt und der IC_{50} -Wert für cGMP erhöht, so dass sich das Verhältnis der IC_{50} -Werte um den Faktor 16 änderte. In der GAF-A der PDE11 sind die korrespondierenden ASn Phe-258, Asp-259 und Thr-319 (Abb. 1-3). Durch die Klonierung von Einzelmutanten sollte überprüft werden, ob durch die Mutation die PDE11/CyaB1-Chimäre durch cAMP stimuliert werden kann. Auf die Klonierung von Doppel- und Dreifachmutanten wurde verzichtet, da diese bei den PDE2 Mutagenesestudien keinen zusätzlichen Effekt im Vergleich zu den Einzelmutanten brachten.

Wie man in Abb. 4-29 sehen kann, wurde PDE11/CyaB1-F258A weder durch 3mM cAMP (Faktor $1,4 \pm 0,2$), noch durch 3mM cGMP stimuliert (Faktor $1,3 \pm 0,1$; n = 4). Es kam hier also nicht zu einer Umkehr der Affinität für die cyclischen Nukleotide, sondern zu einem vollständigen Verlust der Stimulation.

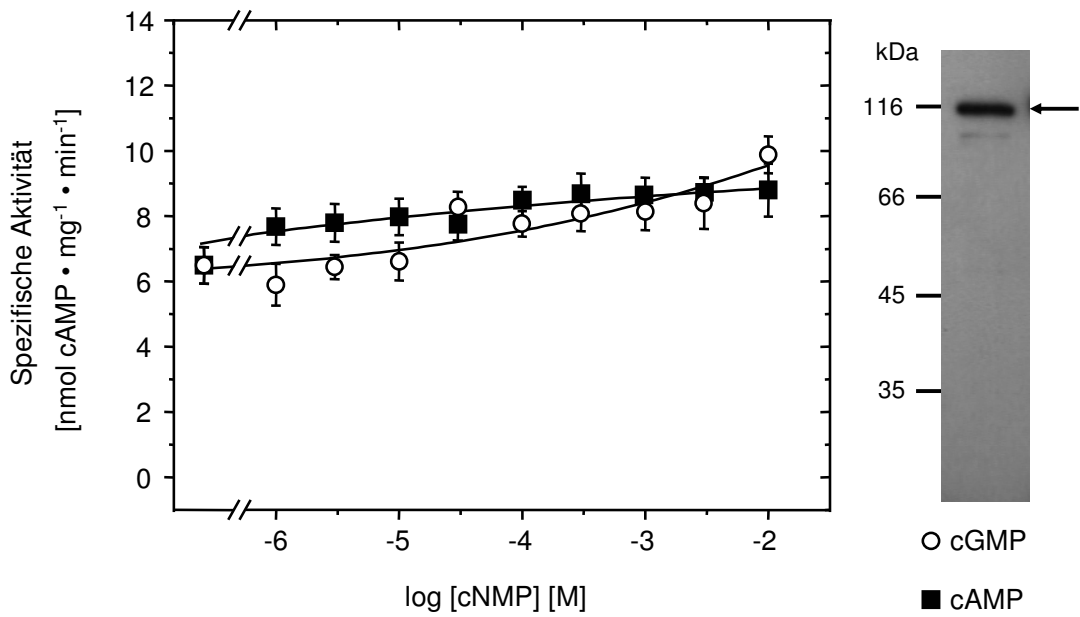


Abb. 4-29: Dosis-Wirkungs-Kurve von PDE11/CyaB1-F258A; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; rechts: Western Blot mit 1µg Protein

4.1.3.6 PDE11/CyaB1-D259A

Die Mutation von Asp-259 nach Alanin hatte nahezu den gleichen Effekt wie der Austausch von Phe-258 nach Alanin. Durch keines der cyclischen Nukleotide wurde das katalytische Zentrum der Chimäre stimuliert. Auffällig ist aber der Basalwert, der etwa dreimal so hoch ist, wie der des Wildtyps und der F258A- und T319A-Mutante.

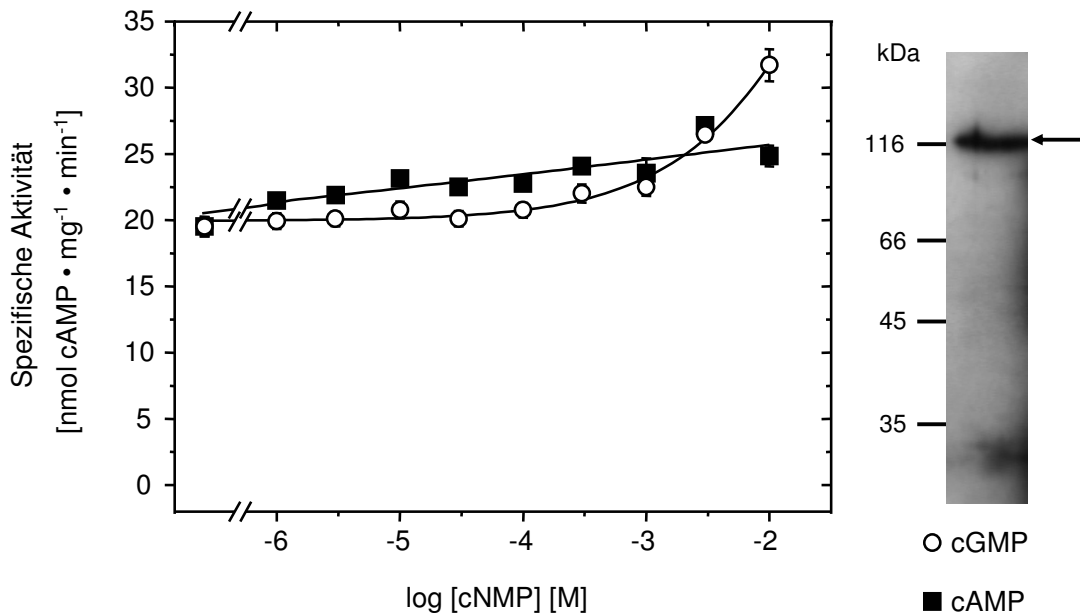


Abb. 4-30: Dosis-Wirkungs-Kurve von PDE11/CyaB1-D259A; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 6; rechts: Western Blot mit 1µg Protein

4.1.3.7 PDE11/CyaB1-T319A

Durch die Mutation von Thr-318 nach Alanin wurde die Spezifität bei hohen Nukleotidkonzentrationen umgedreht. Durch cGMP wurde das katalytische Zentrum nicht aktiviert, dagegen wurde durch cAMP die spezifische Aktivität verdoppelt (Abb. 4-31).

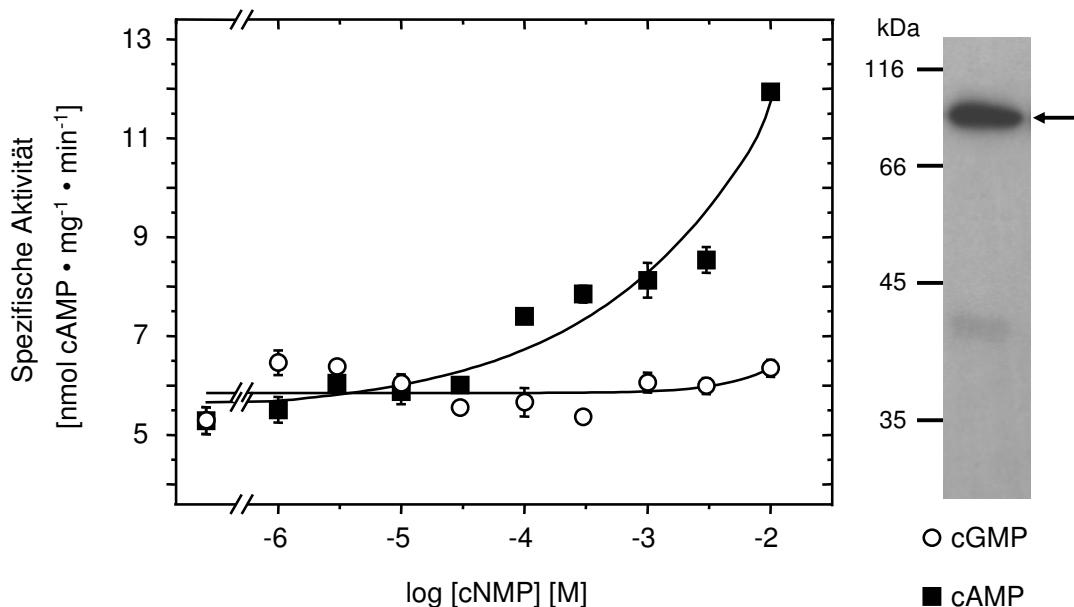


Abb. 4-31: Dosis-Wirkungs-Kurve von PDE11/CyaB1-T319A; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; rechts: Western Blot mit 1µg Protein

4.1.4 Einfluss der Phosphorylierung an Ser-117 und Ser-162

Die geringe Affinität der GAF-Domänen für cGMP legte den Verdacht nahe, dass die Funktion der GAF-Domänen reguliert werden könnte. Zum Beispiel könnte es durch posttranslationale Modifikationen zu einer Erhöhung der Affinität kommen, schließlich wurde eine veränderte Wechselwirkung mit Liganden oder anderen Proteinen durch posttranslationale Modifikationen schon bei verschiedenen PDEn nachgewiesen [37, 39, 109].

Zu den am häufigsten vorkommenden Modifikationen gehören Phosphorylierung und proteolytischer Abbau. Mögliche Effekte dieser beiden Modifikationen lassen sich gut mit Hilfe des hier verwendeten Readout-Systems untersuchen.

Der PDE11A4 N-Terminus enthält zwei Phosphorylierungsstellen an den Positionen Ser-117 (RRA¹¹⁷S) und Ser-162 (RKA¹⁶²S). Eine *in vitro* Phosphorylierung für beide Phosphorylierungsstellen wurde nachgewiesen [45]. Zunächst wurde eine *in vitro* Phosphorylierung mit der katalytischen Einheit einer murinen cAMP-abhängigen Proteinkinase durchgeführt (Erkennungssequenz: R-(R/K)-X-S/T; 4.1.4.1). Des Weiteren wurden die Serinreste nach Aspartat und Glutamat mutiert, um eine Phosphorylierung durch die negative Ladung der neuen Reste vorzutauschen (4.1.4.2). Für beide Mutationen wurde bereits gezeigt, dass sie eine Phosphorylierung imitieren [75, 110].

4.1.4.1 Phosphorylierung von Ser-117 und Ser-162 mittels PKA

Die Phosphorylierungsreaktion wurde mit der katalytischen Untereinheit der PKA durchgeführt (3.8). Durch Zusatz von BSA wurde das Enzym während der zweistündigen Inkubation bei 30°C stabilisiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zusatz der PKA.

Man erkennt, dass sich der Stimulationsfaktor des Kontrollansatzes durch die Vorbehandlung auf den Faktor 2,3 reduziert hat, der EC_{50} -Wert blieb gleich ($77,0 \pm 1,7 \mu\text{M}$; Abb. 4-32). Die Affinität des phosphorylierten Proteins stieg auf $23,0 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (Stimulation: Faktor 2,0). Auf die Erstellung eines Autoradiogramms wurde verzichtet.

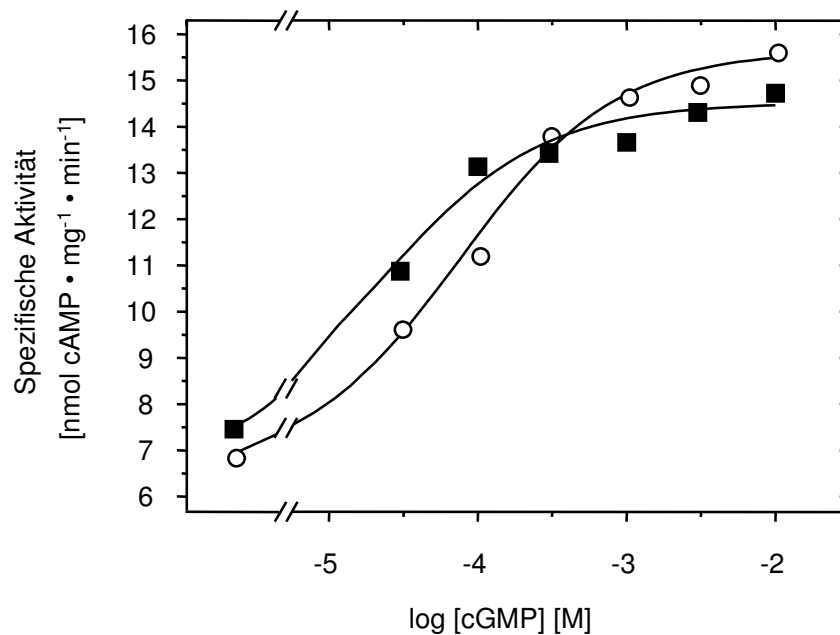


Abb. 4-32: Dosis-Wirkungs-Kurven der PDE11/CyaB1-Chimäre phosphoryliert (■) und unphosphoryliert (○); Testbedingungen: 10min, 37°C, 75μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 2; die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant voneinander

4.1.4.2 Untersuchung von PDE11/CyaB1-S117D, -S117E, -S162D, -S162E, -S117D/S162D und -S117E/S162E

Die Einzel- und Doppelmутanten Serin nach Aspartat (S117D, S162D, S117D/S162D) bzw. Serin nach Glutamat (S117E, S162E, S117E/S162E) wurden wie unter 3.7.2.10 - 3.7.2.13 beschrieben kloniert. Die Expression und Reinigung erfolgte wie bei den anderen Chimären.

Die AC-Tests zeigten eine Erhöhung der Affinität für cGMP bei Mutanten, die eine Phosphorylierung von Ser-162 vortäuschen. Die Affinität wurde je nach Mutante um den Faktor 1,2-4,4 erhöht. Bei der S117D- und der S117E-Mutante sind die EC_{50} -Werte vergleichbar mit dem Chimären-Wildtyp. Die Aktivität hat sich nur bei der S162D-Mutante (Faktor 3) und bei der S117E-Mutante (Faktor 1/3) deutlich geändert. Ein unterschiedlicher Einfluss durch Mutation nach Aspartat oder Glutamat war nicht zu beobachten. Die Mutationen beeinflussten die Eigenschaften der katalytischen Domäne nicht, da kinetischen Parameter nur unwesentlich beeinträchtigt wurden. Eine Übersicht aller bestimmten Parameter gibt Tab. 4-1.

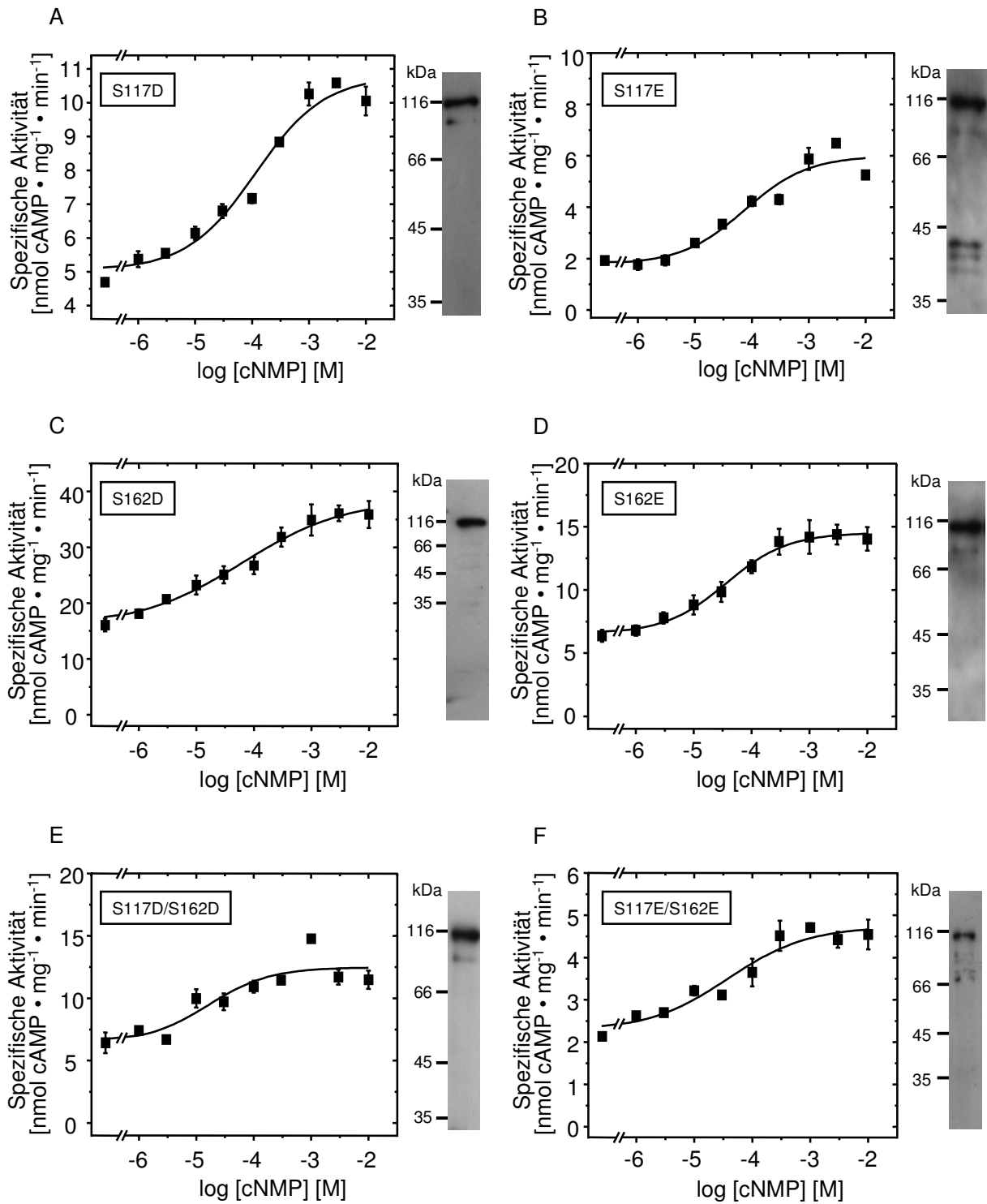


Abb. 4-33: Dosis-Wirkungs-Kurven von PDE11/CyaB1-S117D (A), -S117E (B), -S162D (C), -S162E (D), -S117D/S162D (E) und -S117E/S162E (F) mit cGMP; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75 μ M ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4-8; jeweils am rechten Rand: Western Blots mit je 1 μ g Protein

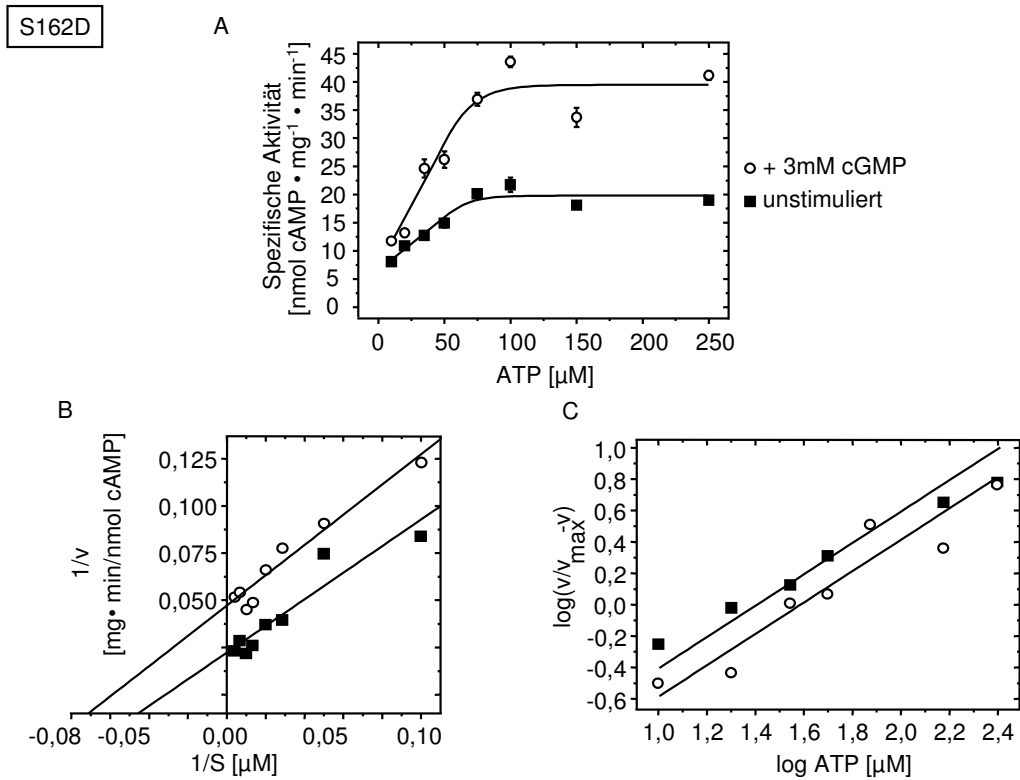


Abb. 4-34: Substratkinetik von PDE11/CyaB1-S162D; Testbedingungen: 10min, 37°C, 10 - 250μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; Auftragung nach A: Michaelis-Menten; B: Lineweaver-Burk ($R^2_{\text{unstimuliert}} = 0,885$, $R^2_{\text{stimuliert}} = 0,944$); C: Hill ($R^2_{\text{unstimuliert}} = 0,996$, $R^2_{\text{stimuliert}} = 0,904$)

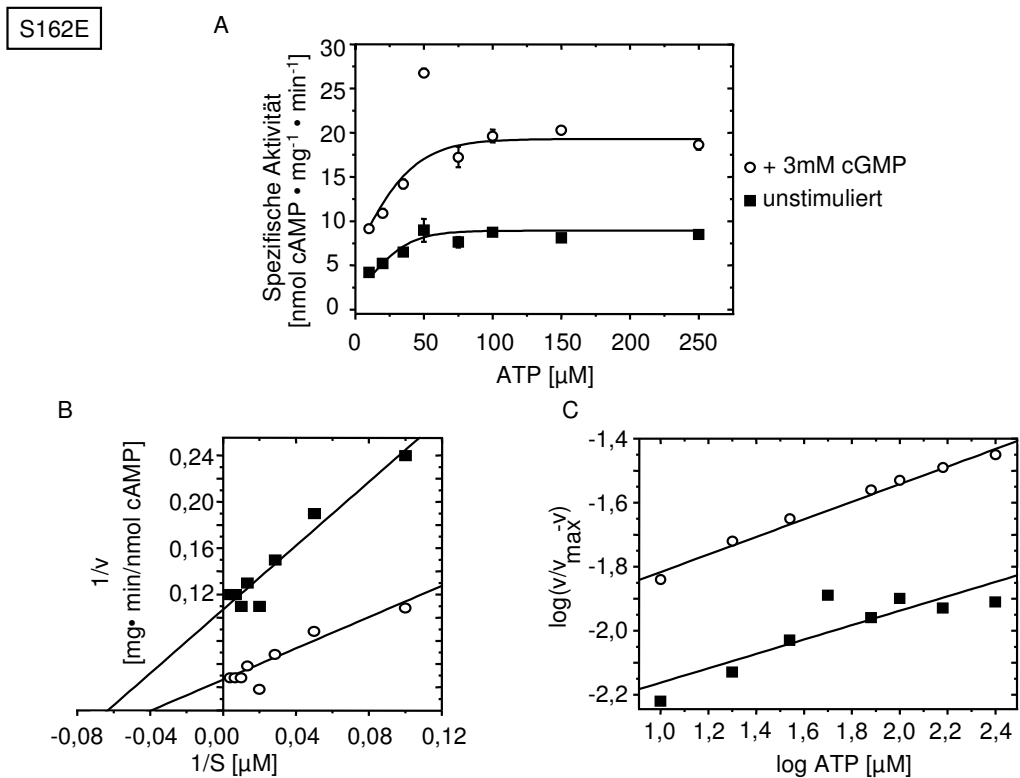


Abb. 4-35: Substratkinetik von PDE11/CyaB1-S162E; Testbedingungen: 10min, 37°C, 10 - 250μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; Auftragung nach A: Michaelis-Menten; B: Lineweaver-Burk ($R^2_{\text{unstimuliert}} = 0,931$, $R^2_{\text{stimuliert}} = 0,863$); C: Hill ($R^2_{\text{unstimuliert}} = 0,764$, $R^2_{\text{stimuliert}} = 0,985$)

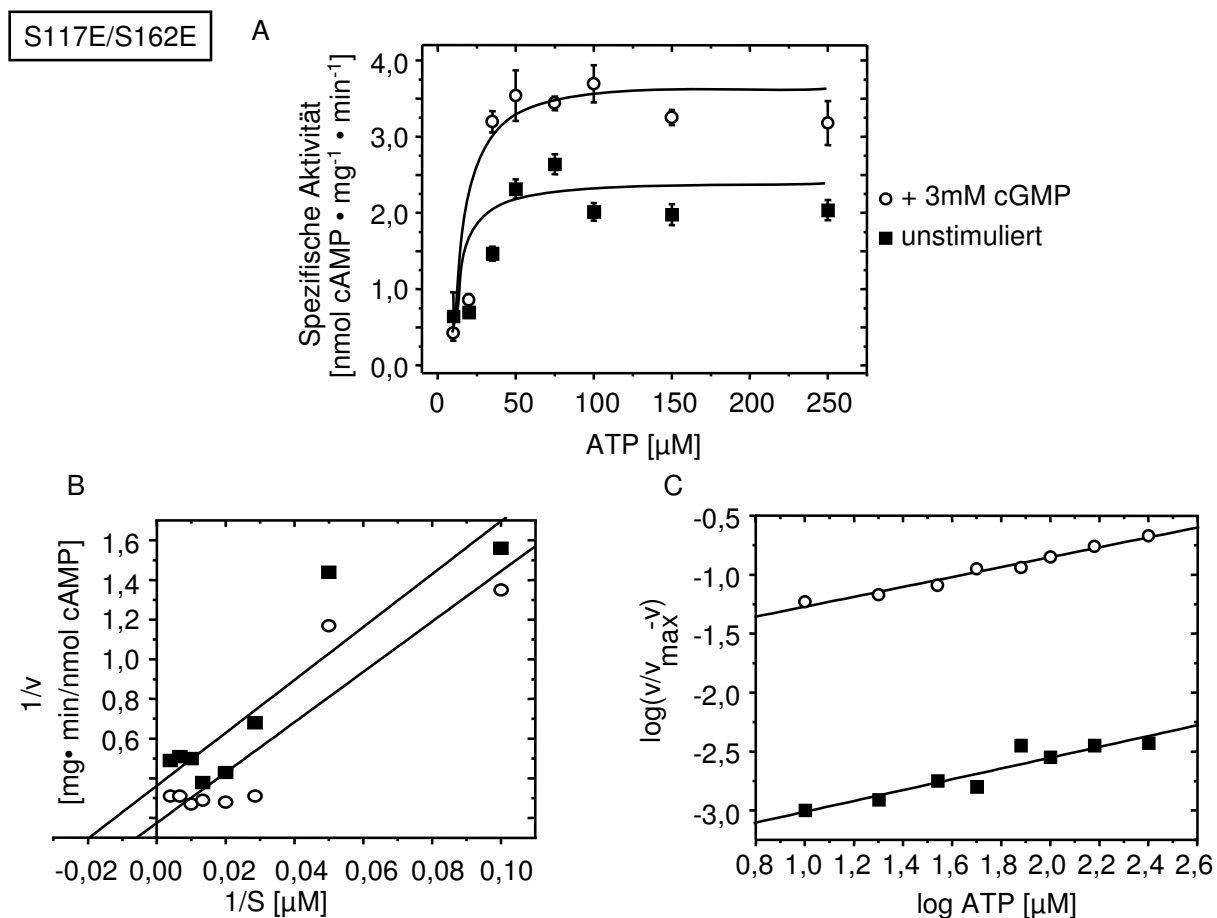


Abb. 4-36: Substratkinetik von PDE11/CyaB1-S117E/S162E; Testbedingungen: 10min, 37°C, 10 - 250µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; Auftragung nach A: Michaelis-Menten; B: Lineweaver-Burk ($R^2_{\text{unstimuliert}} = 0,830$, $R^2_{\text{stimuliert}} = 0,840$); C: Hill ($R^2_{\text{unstimuliert}} = 0,881$, $R^2_{\text{stimuliert}} = 0,974$)

Konstrukt	EC ₅₀ -Wert für cGMP [µM]	Hill-Koeffizient	Max. Stimulation durch cGMP	K _m [µM]	V _{max} [nmol cAMP · mg ⁻¹ · min ⁻¹]	Signifikanter Unterschied zum WT? (p<0,05)
PDE11/CyaB1-Chimäre	72,5±10,1	0,60±0,02 R ² = 0,965	3,8±0,4	20,9±0,9 15,2±0,8	9,8±0,3 22,0±0,6	-
-S117D	115,5±26,1	0,42±0,01 R ² = 0,981	2,3±0,1			ab 30µM cGMP
-S162D	62,9±14,6	0,47±0,02 R ² = 0,969	2,5±0,5	17,0±1,1 31,3±2,7	21,1±0,6 44,2±1,6	ab 3mM cGMP
-S117D/S162D	16,3±5,6	0,19±0,03 R ² = 0,662	1,8±0,1			ab 30µM cGMP
-S117E	74,2±2,3	0,74±0,17 R ² = 0,706	3,6±0,4			-
-S162E	36,4±3,2	0,60±0,03 R ² = 0,920	2,4±0,2	12,5±2,1 14,9±1,6	9,3±0,6 20,7±2,7	ab 30µM cGMP
-S117E/S162E	38,1±1,2	0,23±0,02 R ² = 0,885	2,6±0,1	23,3±5,0 44,9±2,9	2,8±0,5 3,5±1,4	ab 30µM cGMP

Tab. 4-1: Übersicht über die Eigenschaften der SD- und SE-Mutanten von PDE11/CyaB1

4.1.5 Untersuchungen zum Einfluss des N-Terminus

Nachdem gezeigt wurde, dass die Phosphorylierungen der PDE11A/CyaB1-Chimäre im N-Terminus nur einen beschränkten Einfluss auf die cGMP-Affinität der GAF-Domänen haben, wurde als nächstes die Auswirkung einer proteolytischen Verkürzung im Bereich des N-Terminus untersucht. Die Proteolyse wurde zunächst imitiert durch die Klonierung verkürzter Chimären. Eine schematische Darstellung der Startpunkte der einzelnen Verkürzungen ist in Abb. 4-37 zu sehen.

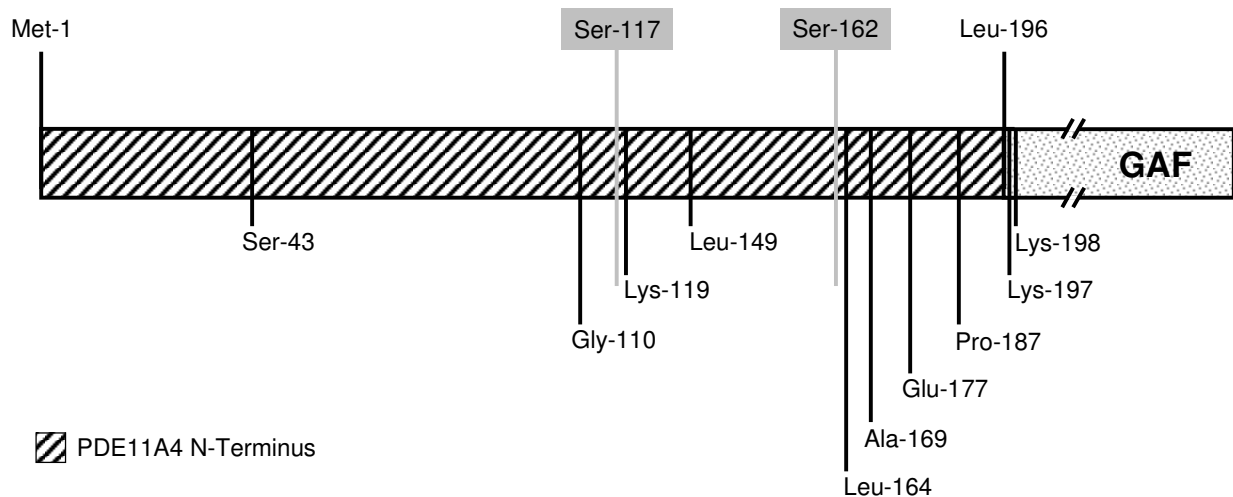


Abb. 4-37: Schematische Darstellung der N-Terminus Verkürzungen; neben den Startpunkten der einzelnen Konstrukte sind auch die beiden Phosphorylierungsstellen Ser-117 und Ser-162 angegeben (grau unterlegt)

4.1.5.1 Biochemische Charakterisierung der PDE11/CyaB1-Chimäre ab Lys-197

Als erstes wurde der N-Terminus vollständig entfernt (Δ 1-196; 3.7.2.3). Das Protein beginnt mit Lys-197, der ersten AS der GAF-A. Entsprechend Abb. 4-63 wird in diesem Konstrukt, bei Verlässlichkeit des Alignments, keine geordnete Struktur zerstört. Die Expression und Reinigung erfolgte wie bei den anderen PDE11A4/CyaB1-Chimären und führte zu einer leicht besseren Ausbeute. Das SDS-PAGE Gel des gereinigten Proteins ist in Abb. 4-38 zu sehen.

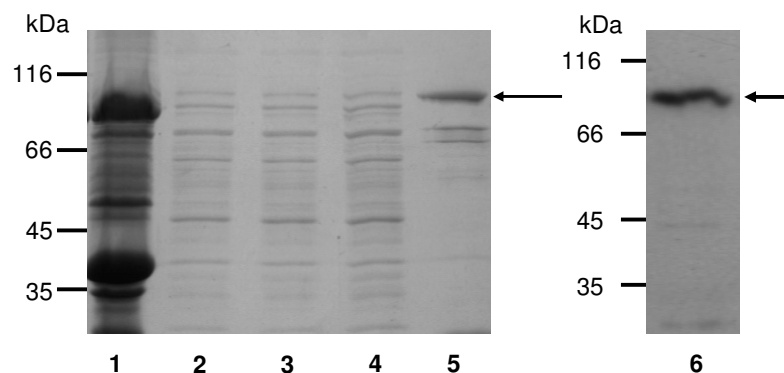


Abb. 4-38: SDS-PAGE Gel der PDE11/CyaB1-Chimäre ab Lys-197; 1 Membranniederschlag; 2 Überstand nach Lyse; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 2 μ g Proteinelaat; 6 Western Blot (0,3 μ g)

Mit dem gereinigten Protein wurde auf cNMP-Aktivierbarkeit getestet. Die Aktivitätskurve zeigt deutliche Unterschiede im Vergleich zur PDE11/CyaB1-Chimäre (Abb. 4-39). Das Enzym war deutlich aktiver, der Basalwert lag bei $61,6 \pm 5,1 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ im Vergleich zu $5,8 \pm 0,3 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Des Weiteren war die cGMP-Affinität drastisch erhöht. Der EC_{50} -Wert des Konstrukts ab Lys-197 betrug $7,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ gegenüber $72,5 \pm 10,1 \mu\text{M}$, d.h. die cGMP-Affinität der GAF-Domänen war dementsprechend zehnmal höher. Schließlich war bei hohen cNMP-Konzentrationen die Diskriminierung zwischen cGMP und cAMP weniger ausgeprägt als beim Chimären-Wildtyp (Tab. 4-2).

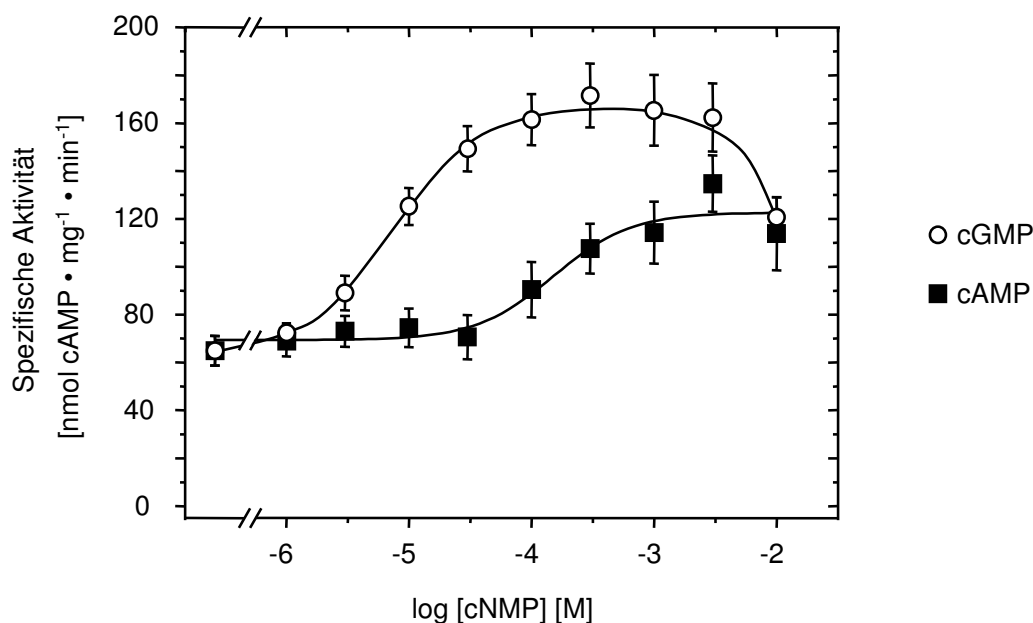


Abb. 4-39: Dosis-Wirkungs-Kurve von PDE11/CyaB1 ab Lys-197; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 10; rechts: Western Blot mit 0,3 μg Protein

	PDE11/CyaB1- Chimäre -fache Stimulation	PDE11/CyaB1- Chimäre ab Lys-197 -fache Stimulation
1mM cGMP	$3,42 \pm 0,21$	$3,32 \pm 0,29$
1mM cAMP	$1,40 \pm 0,07$	$1,84 \pm 0,08$
(cGMP/cAMP)	$2,46 \pm 0,09$	$1,74 \pm 0,09$
3mM cGMP	$3,81 \pm 0,44$	$3,42 \pm 0,28$
3mM cAMP	$1,25 \pm 0,27$	$2,41 \pm 0,16$
(cGMP/cAMP)	$3,33 \pm 0,32$	$1,52 \pm 0,09$

Tab. 4-2: Vergleich der Diskriminierung zwischen cAMP und cGMP bei PDE11/CyaB1 (n = 4) und PDE11/CyaB1 ab Lys-197 (n = 10) durch Vergleich der Stimulation bei verschiedenen cNMP-Konzentrationen; bei Zugabe von 3mM cNMP zur PDE11/CyaB1-Chimäre ab Lys-197 unterscheiden sich die Stimulationen nicht signifikant voneinander, ansonsten sind die Unterschiede signifikant

4.1.5.2 Punktmutationen in der PDE11/CyaB1-Chimäre ab Lys-197

Da sich die PDE11/CyaB1-Chimäre ab Lys-197 in Bezug auf Eigenschaften wie Aktivität und Affinität deutlich vom Chimären-Wildtyp unterschied, wurden zum Vergleich Punktmutationen auch in die PDE11/CyaB1-Chimäre ab Lys-197 eingefügt.

Diese Mutanten unterschieden sich nur unwesentlich von den PDE11/CyaB1-Mutanten (Abb. 4-40, Tab. 4-3). Der einzige Unterschied war das Verschwinden einer Stimulation bei D355A- in PDE11/CyaB1-Chimäre ab Lys-197. Ansonsten waren die Basalwerte der Mutanten von PDE11/CyaB1 ab Lys-197 jeweils etwa zehnmal so aktiv wie die entsprechenden PDE11/CyaB1-Mutanten. Alle Mutanten wiesen nur geringfügige Stimulation auf. Der Unterschied in der Diskriminierung zwischen cAMP und cGMP der beiden Wildtypen PDE11/CyaB1 und PDE11/CyaB1 ab Lys-197 spiegelte sich nicht in den Eigenschaften der hier untersuchten Mutanten wider.

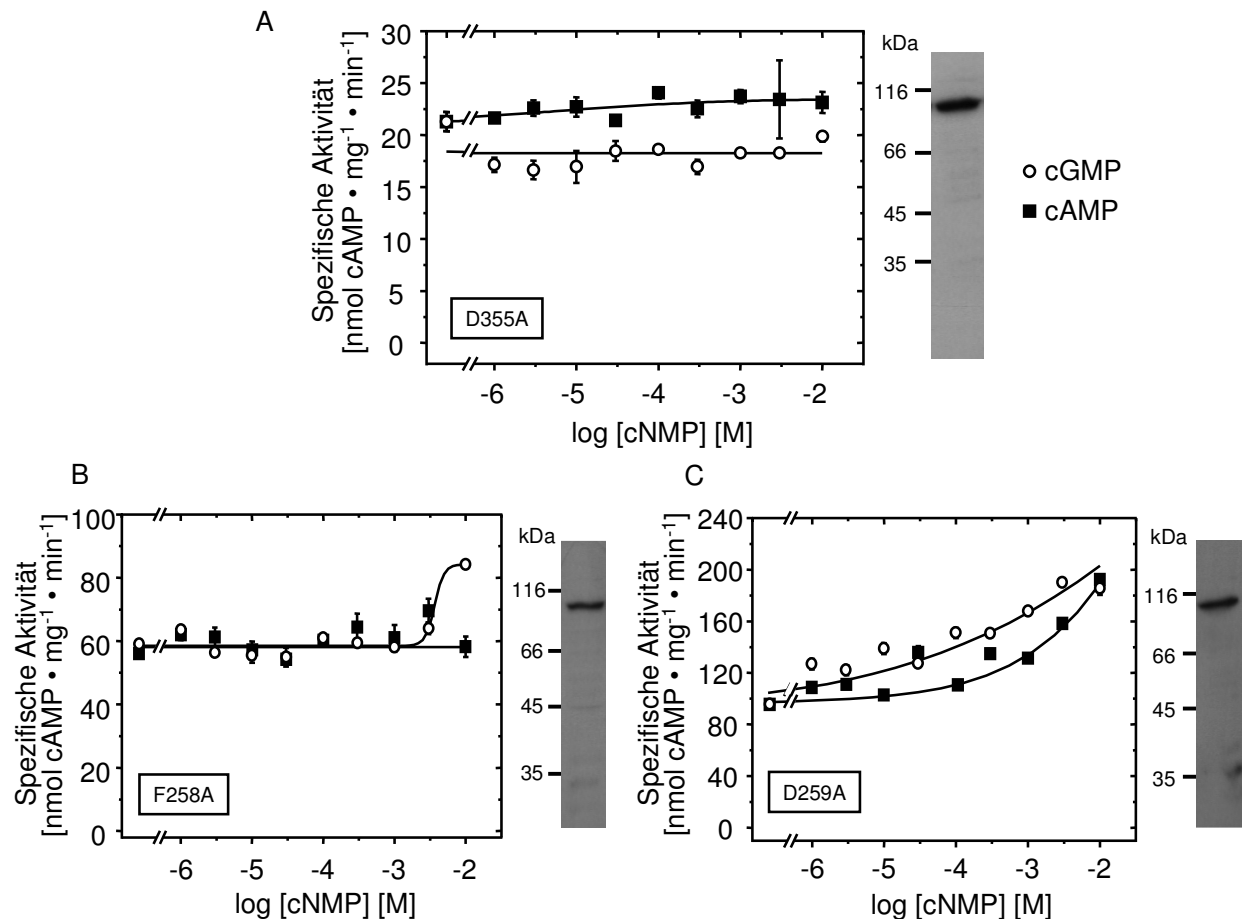


Abb. 4-40: Dosis-Wirkungs-Kurven von PDE11A/CyaB1 ab Lys-197-D355A (A), -F258A (B) und -D259A (C); Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4-6; jeweils rechts neben der Kurve: Western Blot mit je 0,5µg Protein

Konstrukt	Basalaktivität [nmol cAMP • mg ⁻¹ • min ⁻¹]	Max. Stimulation durch cGMP	Max. Stimulation durch cAMP	Verhältnis cGMP/cAMP Stimulation
PDE11/CyaB1	5,8±0,3	3,8±0,4 (n = 4)	1,4±0,1	3,3±0,3
PDE11/CyaB1-D355A	2,2±0,2	2,6±0,3 (n = 4)	1,4±0,1	1,9±0,1
PDE11/CyaB1-F258A	6,5±0,6	1,3±0,1 (n = 4)	1,4±0,2	1,0±0,0
PDE11/CyaB1-D259A	19,5±0,7	1,4±0,1 (n = 6)	1,4±0,1	1,0±0,0
PDE11/CyaB1 ab Lys-197	61,6±5,1	3,4±0,3 (n = 10)	2,4±0,2	1,5±0,1
PDE11/CyaB1 ab Lys-197-D355A	21,3±0,9	0,9±0,0 (n = 6)	1,1±0,0	0,8±0,0
PDE11/CyaB1 ab Lys-197-F258A	59,2±0,2	1,4±0,1 (n = 4)	1,7±0,3	0,9±0,1
PDE11/CyaB1 ab Lys-197-D259A	95,6±0,4	1,4±0,1 (n = 4)	1,7±0,3	1,2±0,1

Tab. 4-3: Vergleich der Diskriminierung zwischen cAMP und cGMP einzelner Mutanten von PDE11/CyaB1 und PDE11/CyaB1 ab Lys-197

4.1.5.3 Untersuchung weiterer N-terminaler Verkürzungen

Die Beobachtung einer erhöhten cGMP-Affinität und eines erhöhten Basalwertes ergibt die Frage, ob bei stufenweiser Verkürzung des N-Terminus eine schrittweise Zunahme dieser beiden Werte erfolgt, oder ob es bei einer bestimmten Länge des N-Terminus sprunghaft zu einer Zunahme von Affinität und cGMP-Aktivität kommt.

Deshalb wurden verschiedene N-terminal verkürzte Konstrukte hergestellt (3.7.2.4). Bei der Planung wurde eine Sekundärstrukturvorhersage des PDE11A N-Terminus mit mehreren Programmen (psipred, jnet, sspro¹⁸ und Protean¹⁹), die unterschiedliche Algorithmen verwenden, durchgeführt. Als Beginn der Konstrukte wurden ungeordnete Bereiche gewählt, so dass α -Helices oder β -Faltblätter nicht berührt wurden. Außerdem wurde vor und hinter den beiden Phosphorylierungsstellen geschnitten.

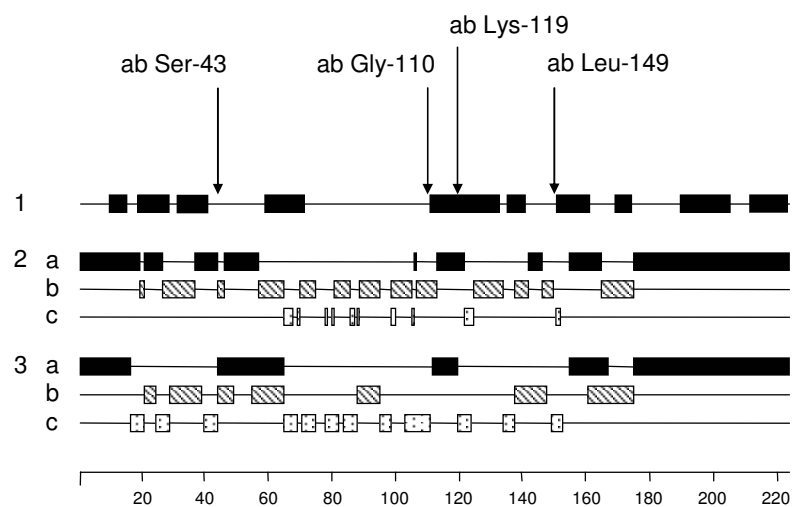


Abb. 4-41: Vorhersage der Sekundärstruktur des PDE11A4 N-Terminus.

1: Consensusstruktur der Vorhersagen für α -Helices von psipred, jnet und sspro.

2: Strukturvorhersage von Protean mit Garnier-Robson Algorithmus. a (schwarz): α -Helices; b (schraffiert): β -Faltblätter; c (gepunktet): turns.

3: Strukturvorhersage von Protean mit Chou-Fasman Algorithmus. a (schwarz): α -Helices; b (schraffiert): β -Faltblätter; c (gepunktet): turns.

Entsprechend wurden folgende Konstrukte kloniert:

- PDE11/CyaB1 ab Ser-43; hier wurde die ersten drei vorhergesagten α -Helices entfernt
- PDE11/CyaB1 ab Gly-110; es erfolgte ein Schnitt vor der nächsten längeren α -Helix und zudem unmittelbar vor Ser-117, der ersten Phosphorylierungsstelle
- PDE11/CyaB1 ab Lys-119; die Phosphorylierungsstelle Ser-117 wird entfernt
- PDE11/CyaB1 ab Leu-149; vor einer α -Helix; die Phosphorylierungsstelle Ser-162 bleibt erhalten

Die Eigenschaften der Chimären waren durch die Verkürzung des N-Terminus verändert (Abb. 4-42 und Tab. 4-2). Die Basalaktivitäten waren im Gegensatz zum Ausgangskonstrukt 3-7-fach erhöht, allerdings nicht korrelierend mit der abnehmenden Länge des N-Terminus. Die cGMP EC₅₀-Werte der vier Enzyme waren deutlich erhöht bzw. nicht bestimmbar, da die Kurvenverläufe nicht in eine Sättigung übergingen. Die Stimulationsfaktoren waren vergleichbar mit denen des Basiskonstrukts und von PDE11/CyaB1 ab Lys-197.

¹⁸ gemeinsam auf <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre>

¹⁹ aus dem DNASTAR Softwarepaket von DNASTAR, Inc.

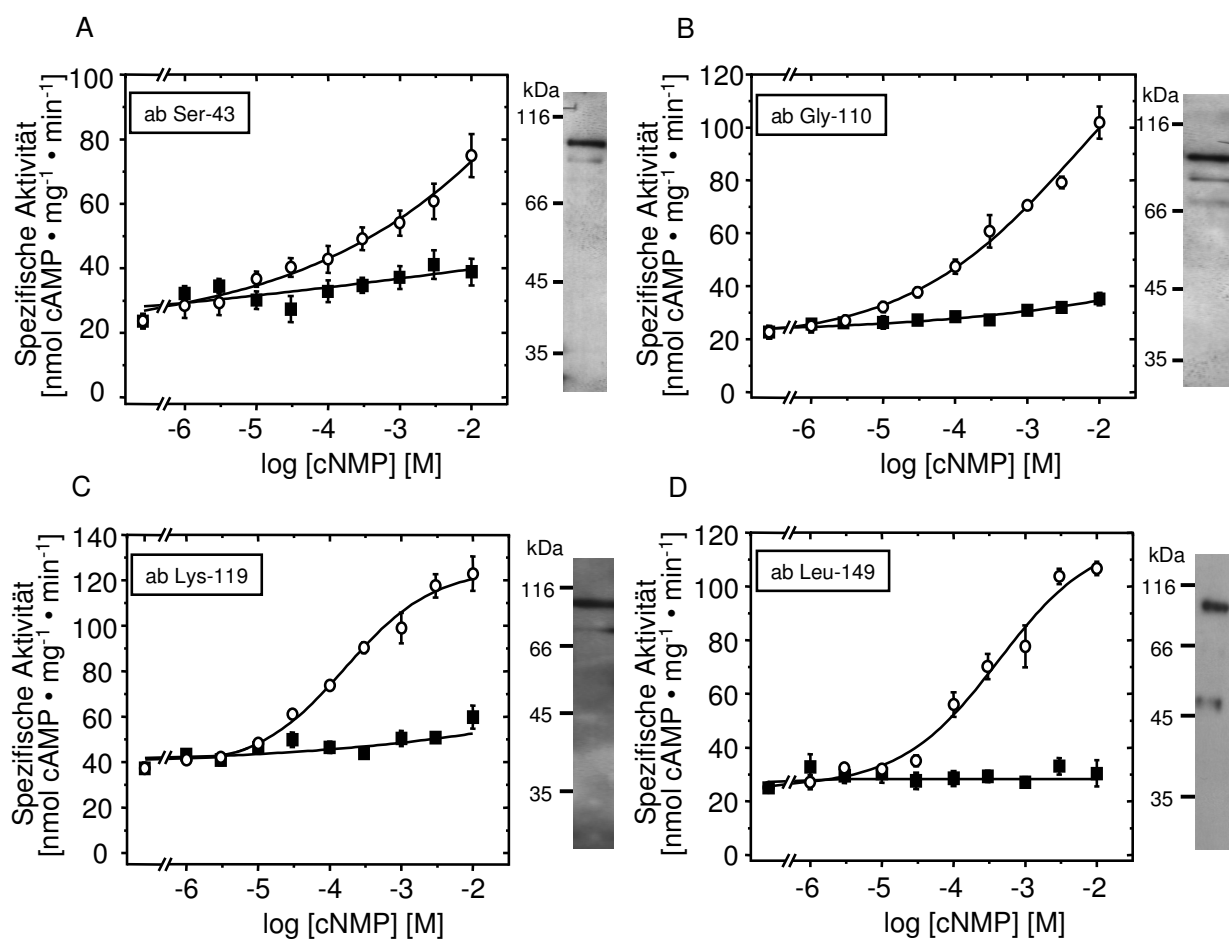


Abb. 4-42: Dosis-Wirkungs-Kurven von PDE11/CyaB1 ab Ser-43 (A), ab Gly-110 (B), ab Lys-119 (C) und ab Leu-149 (D) mit cAMP (■) und cGMP (o); Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; jeweils rechts neben der Kurve: Western Blot mit 1µg Protein

Konstrukt	Basalaktivität [nmol cAMP • mg ⁻¹ • min ⁻¹]	EC ₅₀ -Wert für cGMP [µM]	Max. Stimulation durch cGMP	Hill- Koeffizient
PDE11/CyaB1	5,8±0,3	72,5±10,1	3,8±0,4 (n = 4)	0,60±0,02 (R ² = 0,965)
PDE11/CyaB1 ab Ser-43	23,6±2,2	n. d.	2,7±0,5 (n = 4)	0,26±0,02 (R ² = 0,966)
PDE11/CyaB1 ab Gly-110	23,5±2,4	n. d.	3,3±0,4 (n = 4)	0,52±0,04 (R ² = 0,960)
PDE11/CyaB1 ab Lys-119	37,4±2,2	164,0±31,0	4,2±0,5 (n = 4)	0,43±0,01 (R ² = 0,997)
PDE11/CyaB1 ab Leu-149	25,1±0,5	n. d.	4,1±0,2 (n = 4)	0,62±0,04 (R ² = 0,969)
PDE11/CyaB1 ab Lys-197	61,6±5,1	7,6±0,9	3,4±0,3 (n = 10)	0,90±0,07 (R ² = 0,978)

Tab. 4-4: Übersicht über Basalwert, EC₅₀-Wert, Hill-Koeffizient und max. Stimulation der PDE11/CyaB1-Chimären ab Met-1, Ser-43, Gly-110, Lys-119, Leu-149 und Lys-197

Da das Entfernen der ASn vor der zweiten Phosphorylierungsstelle (Ser-162) lediglich zu einer Zunahme der Basalwerte, aber nicht zu einer Erhöhung der cGMP-Affinität geführt hatte, wurden vier weitere Konstrukte kloniert, bei denen hinter Ser-162 geschnitten wurde (Start mit Leu-164, Ala-169, Glu-177 und Pro-187).

Die beiden längeren Konstrukte haben nur eine leicht erhöhte Basalaktivität im Vergleich zum Basiskonstrukt. Die cGMP-Affinität war jedoch zwei- bis dreimal höher (Tab. 4-5). Eine deutlich erhöhte Basalaktivität und drastisch erhöhte cGMP-Affinität ließ sich bei den beiden kürzeren Chimären, d. h. ab Glu-177 bzw. Pro-187, beobachten. Die Basalaktivitäten sind zwar sechs- bis zehnmal größer als beim Chimären-Wildtyp, die cGMP-Affinität hat jedoch bis 20-fach zugenommen. Allerdings ist die maximale Stimulation durch cGMP nur noch anderthalbfach (Abb. 4-43 und Tab. 4-5).

Die vorliegenden Daten deuten also daraufhin, dass es für die cGMP-Affinität der GAF-Domänen eine spezifische Stelle zwischen Ala-169 und Glu-177 gibt, bei der diese sprunghaft zunimmt. Ähnliches trifft auch auf die Basalaktivität zu, wie die Abb. 4-44 und 4-45 nochmals verdeutlichen.

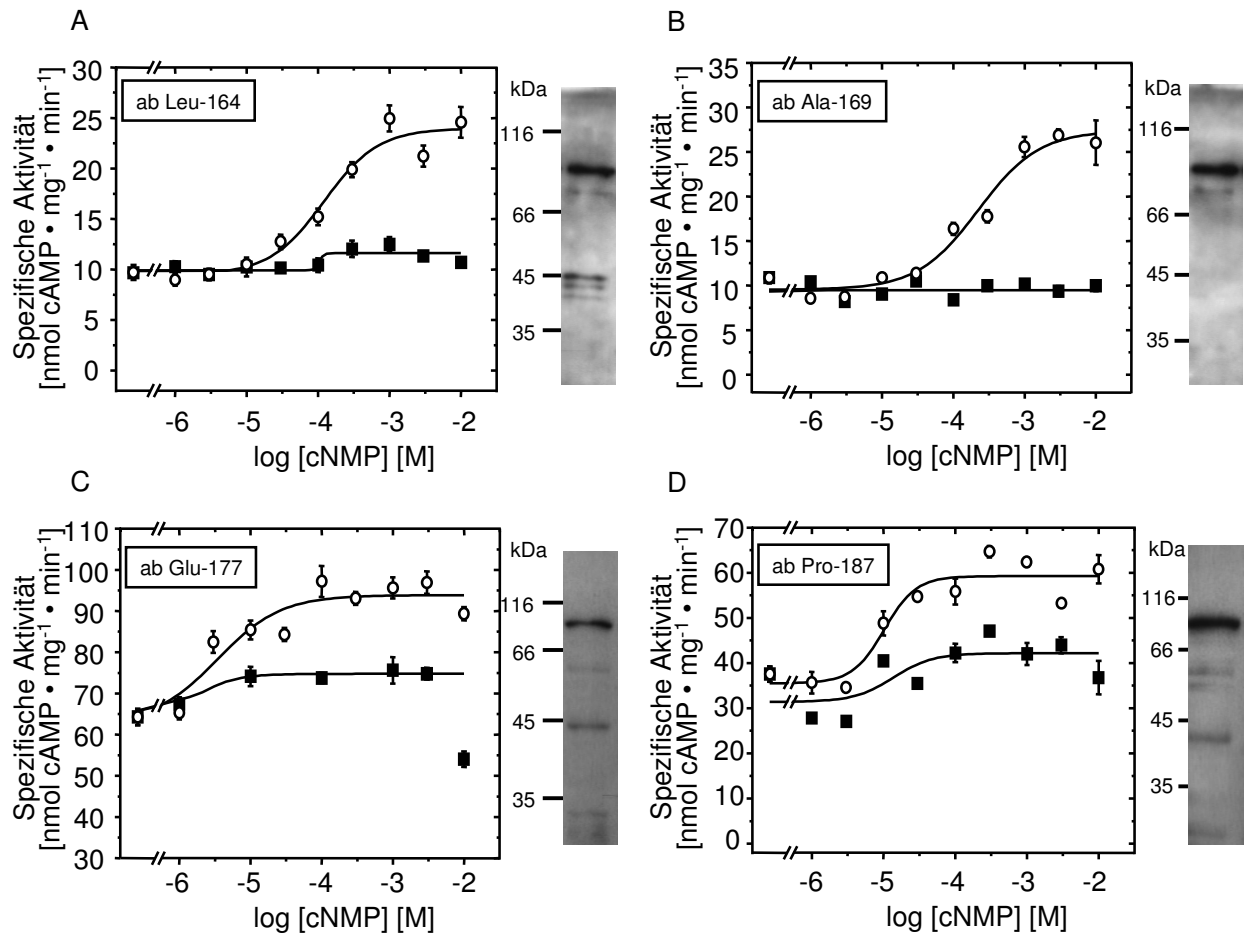


Abb. 4-43: Dosis-Wirkungs-Kurven von PDE11/CyaB1 ab Leu-164 (A), ab Ala-169 (B), ab Glu-177 (C) und ab Pro-187 (D) mit cAMP (■) und cGMP (○); Testbedingungen: 10min, 37°C, 75μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4-6; jeweils rechts neben der Kurve: Western Blot mit 1μg Protein

Konstrukt	Basalaktivität [nmol cAMP • mg ⁻¹ • min ⁻¹]	EC ₅₀ -Wert für cGMP [μM]	Max. Stimulation durch cGMP	Hill- Koeffizient
PDE11/CyaB1	5,8±0,3	72,5±10,1	3,8±0,4 (n = 4)	0,60±0,02 (R ² = 0,965)
PDE11/CyaB1 ab Leu-164	9,7±0,3	121,4±41,1	2,8±0,3 (n = 4)	0,43±0,02 (R ² = 0,988)
PDE11/CyaB1 ab Ala-169	10,9±0,2	224,0±7,7	2,5±0,2 (n = 6)	0,58±0,05 (R ² = 0,970)
PDE11/CyaB1 ab Glu-177	64,3±2,0	3,5±2,2	1,5±0,2 (n = 4)	0,48±0,12 (R ² = 0,678)
PDE11/CyaB1 ab Pro-187	43,1±1,7	10,2±4,0	1,6±0,2 (n = 4)	0,47±0,03 (R ² = 0,936)
PDE11/CyaB1 ab Lys-197	61,6±5,1	7,6±0,9	3,4±0,3 (n = 10)	0,90±0,07 (R ² = 0,978)

Tab. 4-5: Übersicht über Basalwert, EC₅₀-Wert, Hill-Koeffizient und max. Stimulation der PDE11/CyaB1-Chimären ab Met-1, Leu-164, Ala-169, Glu-177, Pro-187 und Lys-197

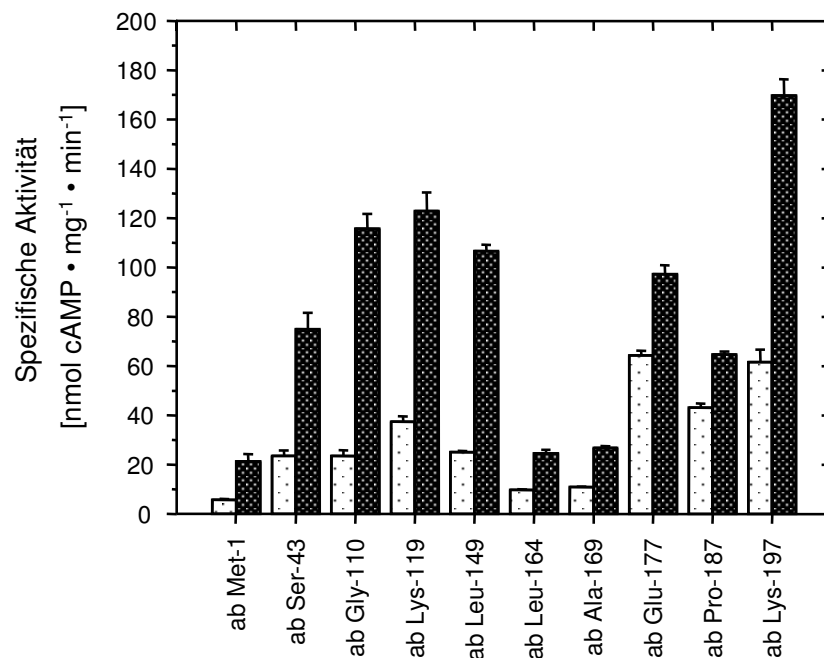


Abb. 4-44: Vergleich der Basal- (helle Balken) und Maximalaktivitäten (dunkle Balken) der Chimären mit N-terminalen Verkürzungen mit dem Chimären-Wildtyp

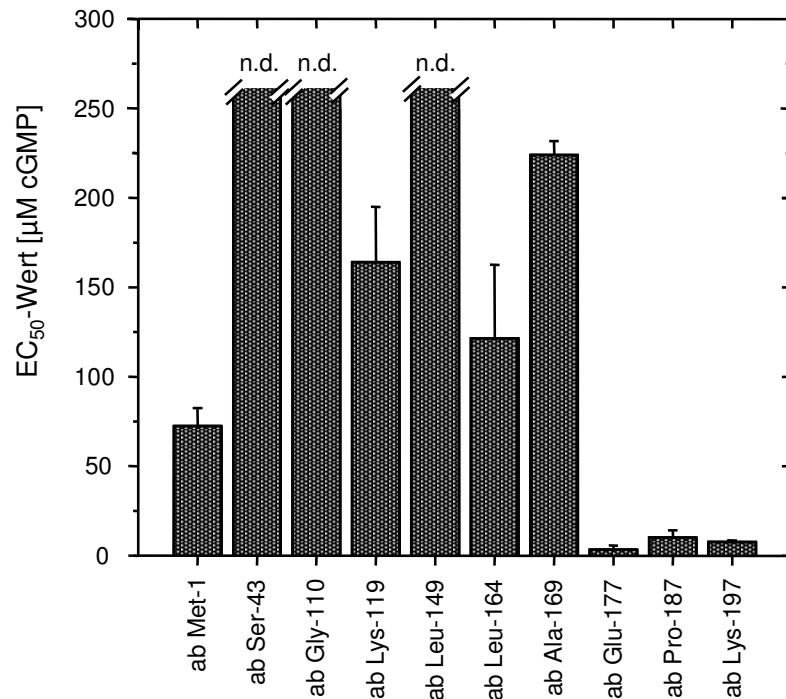


Abb. 4-45: Vergleich der cGMP-EC₅₀-Werte der Chimären mit N-terminalen Verkürzungen mit dem Chimären-Wildtyp; die EC₅₀-Werte der Verkürzungen ab Ser-43, Gly-110 und Leu-149 waren nicht bestimmbar (n.d.)

Als letztes wurde noch ein Protein exprimiert, das mit Lys-198 startete (Klonierung s. 3.7.2.4). Hier wurde mit Lys-197 die erste AS der GAF-A und der vorhergesagten α 1-Helix entfernt. Dieses Protein war nicht mehr stimulierbar.

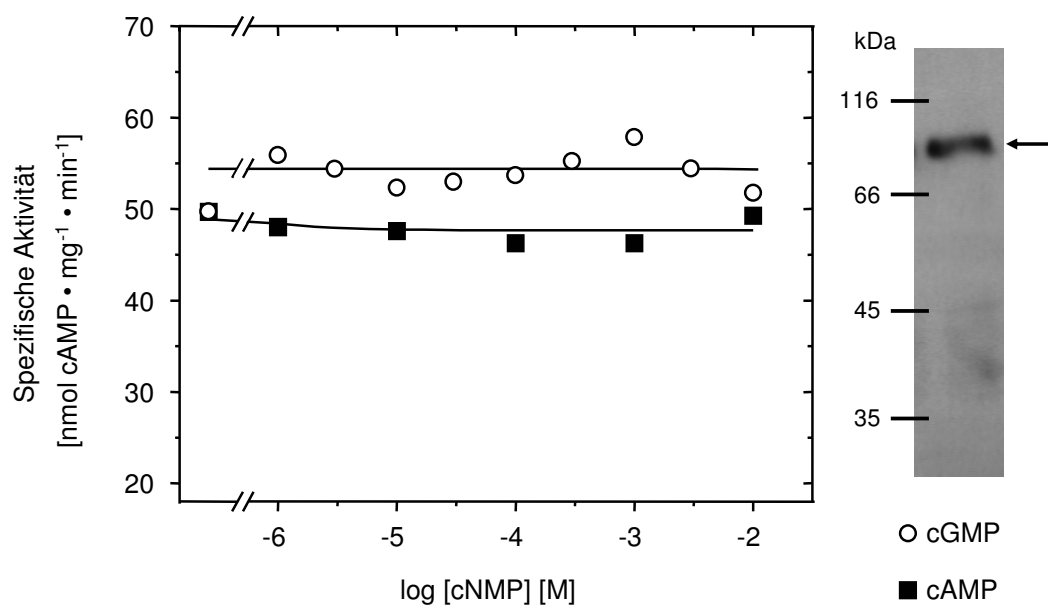


Abb. 4-46: Dosis-Wirkungs-Kurve von PDE11/CyaB1 ab Lys-198; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; rechts: Western Blot mit 0,5µg Protein

4.1.5.4 Phosphorylierung einiger N-terminaler Verkürzungen

Entsprechend der Phosphorylierungsversuche (4.1.4) blieb die Frage der cGMP-Affinitätserhöhung durch die Ser-162 Phosphorylierung. Falls diese Affinitätserhöhung durch ein Umklappen des N-Terminus vermittelt wurde, könnte man erwarten, dass auch eine Ser-162 Phosphorylierung in N-terminal verkürzten Konstrukten eine Affinitätszunahme bewirkt. Daher wurden in den Chimären ab Ser-43 und Lys-119 die Reste Ser-162 bzw. Ser-117 und Ser-162 nach Glutamat mutiert, um erneut eine Phosphorylierung vorzutauschen. Weder die Basalwerte und die Stimulation, noch die cGMP-Affinität änderten sich durch die Phosphorylierung (Abb. 4-47 und Tab. 4-6).

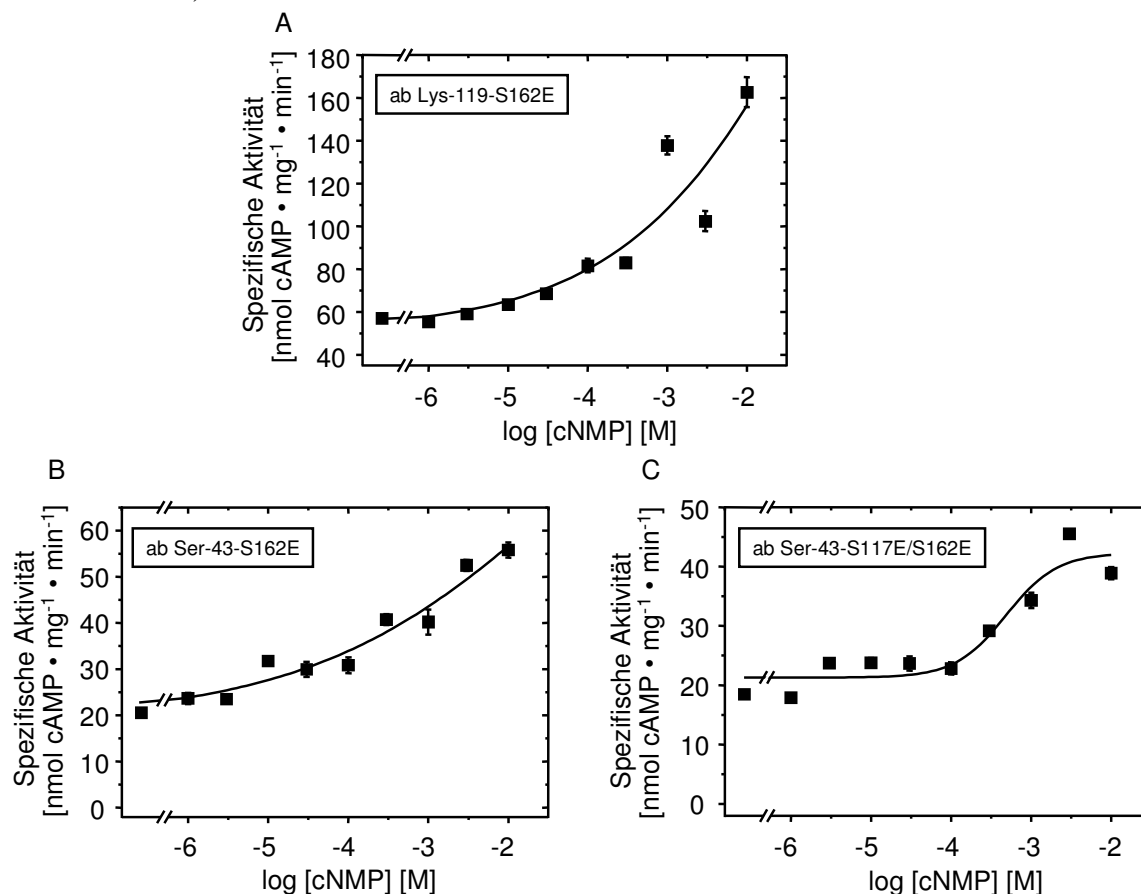


Abb. 4-47: Dosis-Wirkungs-Kurven von PDE11/CyaB1 ab Lys-119-S162E (A) PDE11/CyaB1 ab Ser-43-S162E (B), und -S117E/S162E (C) mit cGMP; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4-6

Konstrukt	Basalaktivität [nmol cAMP • mg ⁻¹ • min ⁻¹]	EC ₅₀ -Wert für cGMP [µM]	Max. Stimulation durch cGMP	Hill- Koeffizient
PDE11/CyaB1 ab Ser-43	23,6±2,2	n. d.	2,7±0,5 (n = 4)	0,26±0,02 (R ² = 0,966)
PDE11/CyaB1 ab Ser-43-S162E	20,5±0,7	n. d.	2,8±0,1 (n = 4)	0,44±0,06 (R ² = 0,910)
PDE11/CyaB1 ab Ser-43-S117E/S162E	18,5±0,3	487,2±26,9	2,6 + 0,1 (n = 4)	0,22±0,03 (R ² = 0,896)
PDE11/CyaB1 ab Lys-119	37,4±2,2	164,0±31,0	4,2±0,5 (n=4)	0,43±0,01 (R ² = 0,997)
PDE11/CyaB1 ab Lys-119-S162E	57,1±1,4	n. d.	3,1±0,1 (n = 6)	0,44±0,06 (R ² = 0,910)

Tab. 4-6: Übersicht über Basalwert, EC₅₀-Wert, Hill-Koeffizient und max. Stimulation der phosphorylierten PDE11/CyaB1-Chimären ab Ser-43 und Lys-119

4.2 Untersuchung der PDE11A3/CyaB1-Chimären

Alle PDE11A-Spleißvarianten unterscheiden sich in ihren kinetischen Parametern und in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren (vgl. Kap. 7.1.2 und [44, 45, 89, 106]). Besonders eingehend wurden die Unterschiede zwischen PDE11A3 und PDE11A4 untersucht [45]. Die Autoren argumentierten, dass die unterschiedlichen N-terminalen Bereiche die Konformation des Proteins beeinflussen und zu einer Änderung des enzymatischen Profils führen. Zu Beginn dieser Arbeit waren in der SMART-Datenbank zwei verschiedene Sequenzen für die PDE11A3 zu finden. Erstere war identisch mit PDE11A4, hatte jedoch N-terminal weitere 54 ASn (Abb. 4-48). Diese ASn wurden über Exon 2 codiert. Die zweite Variante war aufgebaut, wie in der Einleitung beschrieben. Es stellte sich später heraus, dass die längere Variante überhaupt nicht existiert. Diese wurde aus der Datenbank gelöscht, so dass die einzige PDE11A3-Variante die in Abb. 1-2 aufgeführte ist. Diese wird im Folgenden als PDE11A3 bezeichnet, die längere Variante als PDE11A4 mit zusätzlichem PDE11A3 N-Terminus.

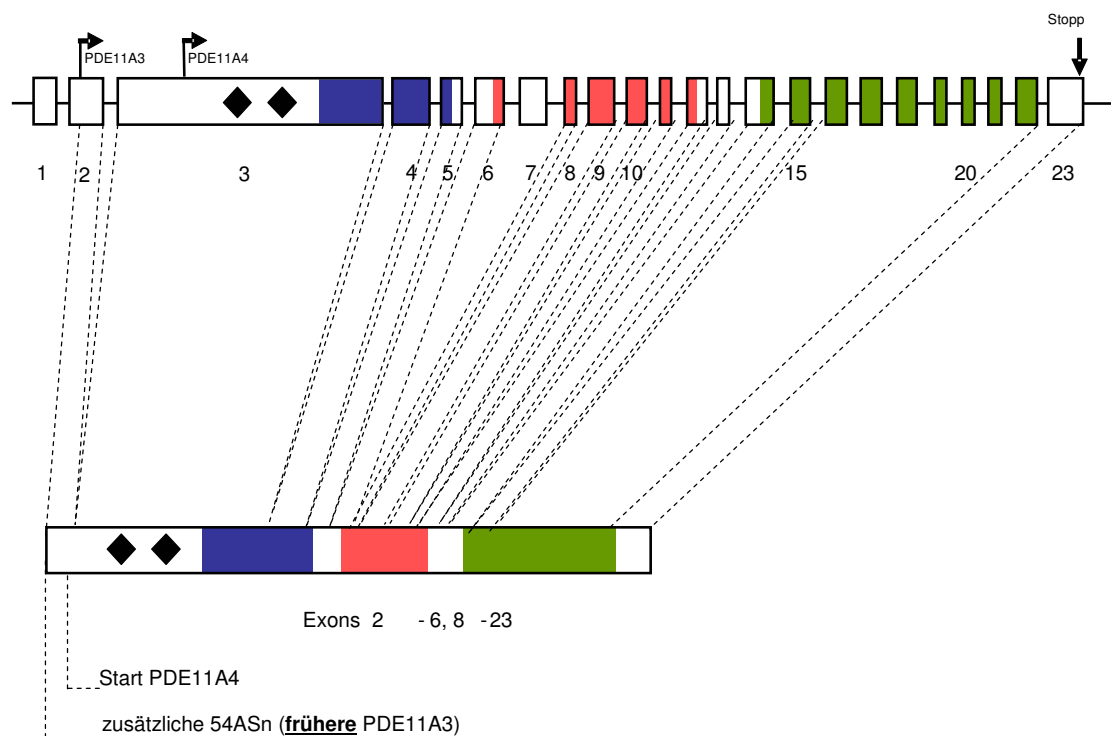


Abb. 4-48: Darstellung der PDE11A4 mit zusätzlichem PDE11A3 N-Terminus; oben sind alle Exons des hsPDE11A Gens dargestellt, darunter der offene Leserahmen dieser PDE11A3-Variante; man erkennt, dass diese Variante im Gegensatz zur PDE11A4 noch Exon 2 enthält und im Gegensatz zur real existierenden PDE11A3 (Abb. 1-2) zusätzlich Exon 3; zur besseren Übersichtlichkeit wurden nur die Exons im oberen und unteren Teil dieser Abbildung durch gestrichelte Linien miteinander verbunden, die zur Erklärung des Aufbaus dieser PDE11A3-Variante wichtig sind.

4.2.1 Dosis-Wirkung von PDE11A4/CyaB1 mit zusätzlichem PDE11A3 N-Terminus

Die PDE11A4/CyaB1-Chimäre mit zusätzlichem PDE11A3 N-Terminus wurde kloniert (3.7.3.1), in BL-21-Zellen transformiert und wie PDE11/CyaB1-Chimären exprimiert und gereinigt. Das Protein besaß ähnliche enzymatische Eigenschaften wie PDE11/CyaB1 (Abb. 4-49). Die Basalwerte ($7,6 \pm 0,3$ vs. $5,8 \pm 0,3 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) und Stimulationen bei 3mM cGMP ($3,0 \pm 0,6$ vs. $3,8 \pm 0,4$) waren vergleichbar, der EC_{50} -Wert der Chimäre mit PDE11A3 N-Terminus war allerdings etwa doppelt so hoch wie der des Chimären-Wildtyps ($143,1 \pm 43,9$ vs. $72,5 \pm 10,1 \mu\text{M}$ cGMP; $n = 4$), d.h. eine weitere N-terminale Verlängerung hatte nur einen geringen Einfluss. Wie bereits erwähnt, hat sich erst nach Durchführung dieser Tests herausgestellt, dass diese Spleißvariante beim Menschen nicht existiert.

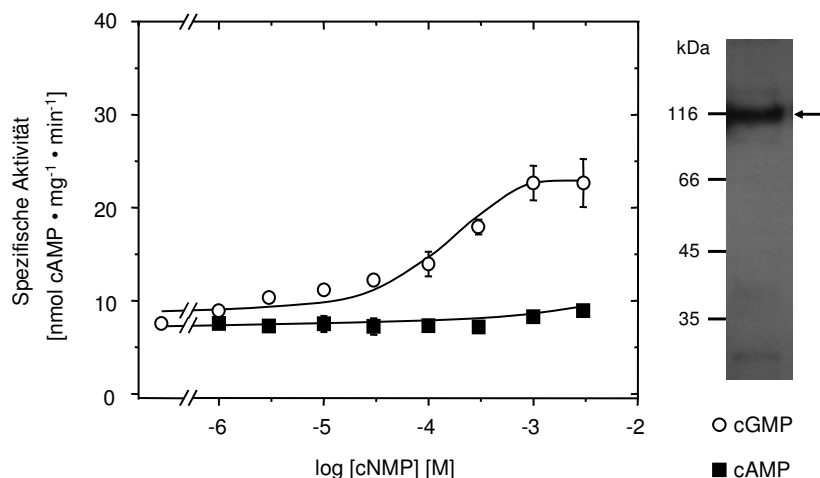


Abb. 4-49: Dosis-Wirkungs-Kurve der PDE11A4/CyaB1-Chimäre mit zusätzlichem PDE11A3 N-Terminus; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75 μM ATP, Tris/HCl pH 7,5; $n = 4$; rechts: Western Blot mit 1 μg Protein

4.2.2 Dosis-Wirkung von PDE11A3/CyaB1

Daraufhin wurde PDE11A3/CyaB1 kloniert (3.7.3.2) und das Plasmid in BL-21-Zellen transformiert. Expression und Reinigung erfolgten analog zum Basiskonstrukt. PDE11A3/CyaB1 war fast 15x so aktiv wie PDE11/CyaB1 ($84,7 \pm 2,2 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), allerdings kam es zu keiner Stimulation (3mM cAMP: Faktor $1,06 \pm 0,03$; 3mM cGMP: Faktor $1,00 \pm 0,10$) (Abb. 4-50). Die N-terminale Verkürzung schien enthemmt zu sein, durch die verkürzte GAF-A Domäne kam es erwartungsgemäß zu keiner Stimulation des katalytischen Zentrums, da die für die Nukleotidbindung verantwortlichen ASn fehlten.

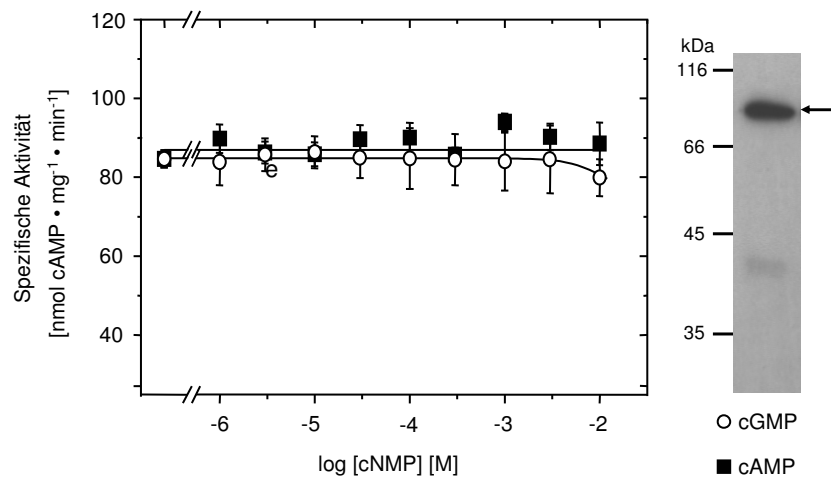


Abb. 4-50: Dosis-Wirkungs-Kurve von PDE11A3/CyaB1; Testbedingungen: 10min, 37°C, 75µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 6; rechts: Western Blot mit 1µg Protein

Die kinetischen Parameter unterschieden sich kaum von denen der PDE11A4-Konstrukte ($K_m = 37,9 \pm 2,0 \mu\text{M ATP}$, $V_{\max} = 74,7 \pm 6,1 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 4-51; n = 4)).

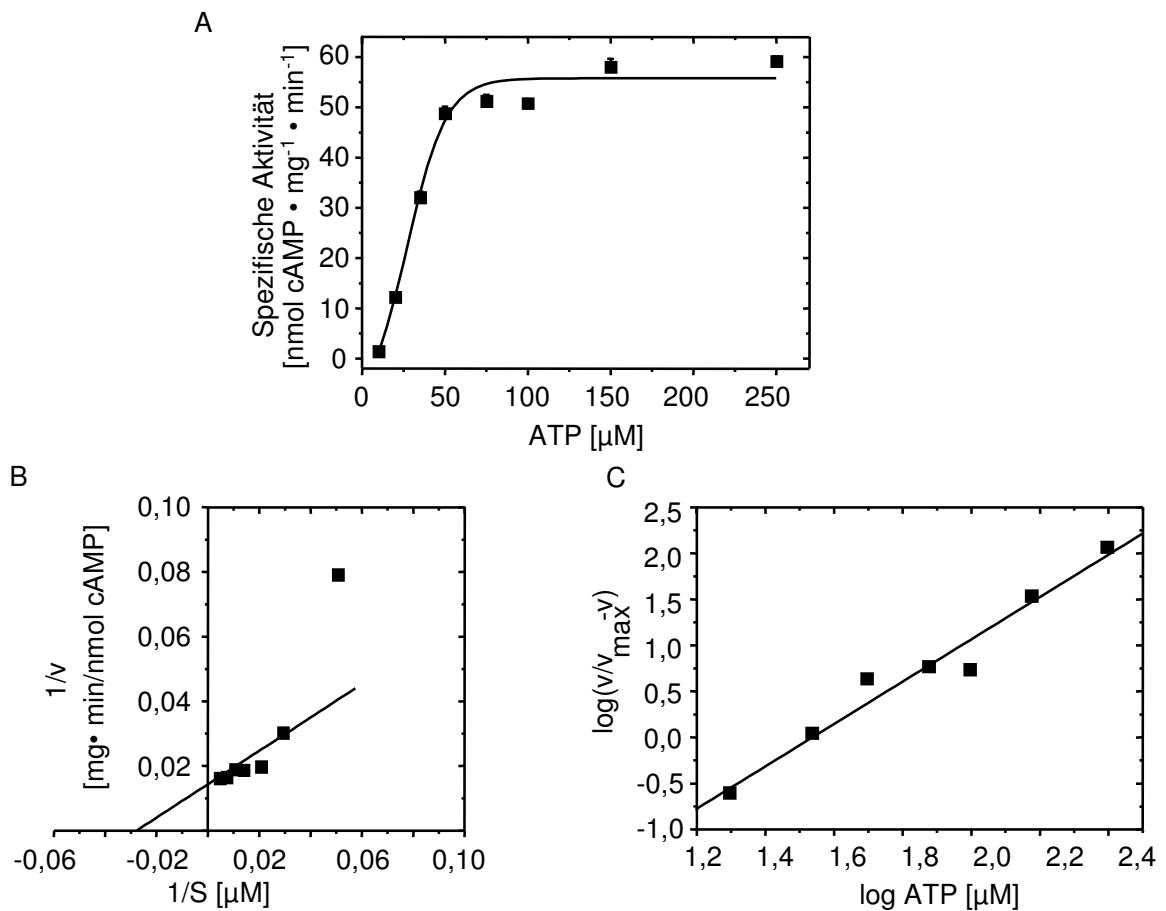


Abb. 4-51: Substratkinetik von PDE11A3/CyaB1; Testbedingungen: 10min, 37°C, 10 - 250µM ATP, Tris/HCl pH 7,5; n = 4; Auftragung nach A: Michaelis-Menten; B: Lineweaver-Burk ($R^2 = 0,835$); C: Hill ($R^2 = 0,959$)

4.3 Untersuchungen von Prostata- und anderen Gewebehomogenaten auf PDE11A4-spezifische Proteaseaktivität

Die N-terminalen Verkürzungen führen teilweise zu einem Aktivitätsanstieg und einer 10-20-fachen Erhöhung der cGMP-Affinität der GAF-Domänen (4.1.5), wodurch der EC_{50} -Wert in einen Bereich physiologischer cGMP-Konzentrationen gelangt. Dies könnte ein Hinweis auf eine Regulation der GAF-Domänen sein, falls es auch *in vivo* zu einem proteolytischen Verdau in diesem N-terminalen Bereich kommt. Die Feinregulation von PDEn durch proteolytischen Verdau wurde u. a. bei der PDE4A5 beschrieben, die durch Caspase-3 geschnitten wird. Durch diesen Verdau wird ein Bereich entfernt, der mit der SH3-Domäne einer Tyrosinkinase interagiert [39].

Da die Prostata das Gewebe darstellt, in dem die Expression der PDE11A4 am besten dokumentiert ist [46], wurde dieses Gewebe im Hinblick auf einen proteolytischen Verdau der PDE11A4 untersucht.

4.3.1 Vorversuche zur Untersuchung der Proteaseaktivität des Prostatahomogenats

Als erstes wurde geprüft, ob humanes Prostatahomogenat proteolytisch aktiv ist, um die wesentlichen Parameter für eine Umsetzung der N-terminalen Region der PDE11A4 (Pos. 1-568) zu bestimmen. Es wurde mit dem chromogenen Proteasesubstrat Azocasein gearbeitet. Die Absorption der entstandenen Abbauprodukte steigt mit der proteolytischen Aktivität, so dass diese photometrisch bestimmt werden kann. Zunächst wurde bei verschiedenen pH-Werten für 18,5h bei 37°C inkubiert (Abb. 4-52A) Die proteolytische Aktivität hatte ein pH-Optimum von 7. Allerdings war eine große Menge an Prostatahomogenat und eine lange Inkubationszeit notwendig, um diese Aktivität nachzuweisen (Abb. 4-52B).

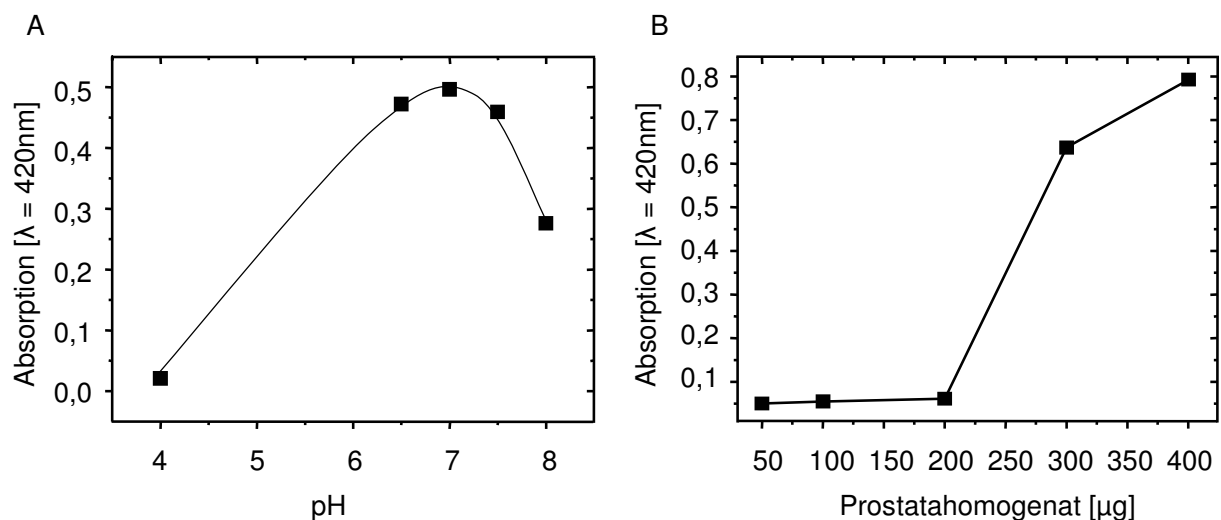


Abb. 4-52: pH- (A) und Proteinabhängigkeit (B) der Umsetzung von Azocasein mit humanem Prostatahomogenat; Testbedingungen: A: 220 μg Homogenat, 6,1 μg Azocasein, 18,5h, 37°C; B: 50-400 μg Homogenat, 6,1 μg Azocasein, 14h, 37°C

4.3.2 Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit dem Prostatahomogenat

Als nächstes wurde untersucht, ob die Protease(n) die PDE11A4 als Substrat erkennen und proteolytisch angreifen kann. Das PDE11 GAF-Tandem (1-568) wurde in pQE60 kloniert und mit einem C-terminalen His-Tag auszustatten (3.7.4.1). Dadurch konnten N-terminal verkürzte Proteine mittels Western Blot nachgewiesen werden. Für die Umsetzung mit dem Prostatahomogenat wurde das ungereinigte Lysat²⁰ eingesetzt, da eine Aufreinigung erfolglos war (Abb. 4-64).

Nachdem sich in einem ersten Test zeigte, dass das PDE11 GAF-Tandem (1-568) durch das Prostatahomogenat verdaut werden kann, wurde die Proteinabhängigkeit der Umsetzung untersucht (Abb. 4-53). Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass eine vierstündige Inkubation bei 37°C für einen nahezu vollständigen Abbau ausreicht (Abb. 4-54ff.). Jeweils 5µg Gesamtprotein dieser Ansätze wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und es wurde ein Western Blot angeschlossen.

Es entstanden immer nur zwei Abbauprodukte, d.h. es kam zu einem spezifischen Abbau. Für einen nahezu vollständigen Abbau des PDE11 GAF-Tandems (1-568) musste das Proteinverhältnis Homogenat:Lysat mindestens 2,5:7 betragen (Spur 2 in Abb. 4-53). Zudem war ersichtlich, dass von dem größeren Fragment etwa die doppelte Menge entstanden ist. Mit Hilfe des Western Blots ließ sich die Fragmentgrößen nur grob abschätzen. Daher wurden beide Banden mittels Massenspektrometrie analysiert (4.3.4).

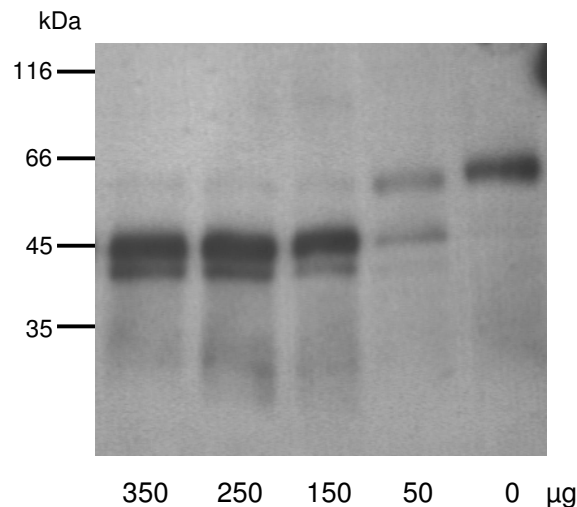
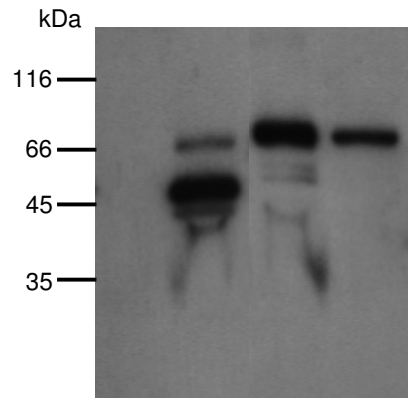


Abb. 4-53: Western Blot zur Bestimmung der Proteinabhängigkeit der Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit humanem Prostata-homogenat; Testbedingungen: 50-350µg Homogenat, 700µg GAF-Tandem-Lysat, pH 7,0, 13,5h, 37°C

Als Kontrolle wurde in einem weiteren Ansatz vor der eigentlichen Reaktion das Prostatahomogenat für 20min auf 95°C erhitzt. Daraufhin erfolgte kein Abbau mehr, d.h. es handelte sich um eine enzymatische Reaktion. Desweiteren wurde nur das Prostatahomogenat aufgetragen. Die Tatsache, dass man kein Signal erkennt beweist, dass im Prostatahomogenat selbst keine immunoreaktiven Proteine waren (Abb. 4-54).

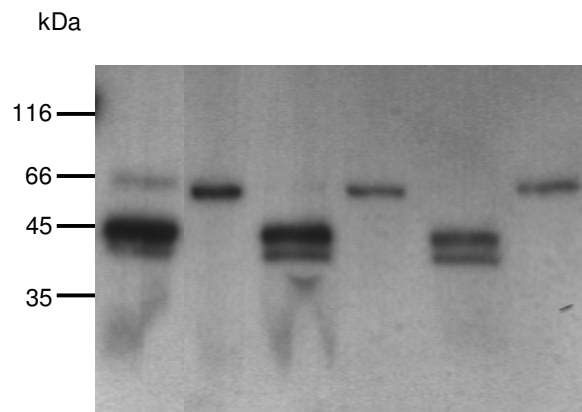
²⁰ beim ungereinigten Lysat handelt es sich stets um den Überstand mit den löslichen Bestandteilen nach Lyse und Zentrifugation (3.2.6)



Prostatahomogenat	+	+	-	-
Prostatahomogenat, denat.	-	-	+	-
PDE11 GAF-Tandem	-	+	+	+

Abb. 4-54: Western Blot zur Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit humanem Prostatahomogenat; Testbedingungen: Homogenat:GAF-Tandem-Lysat 1:2,5, pH 7,0, 4h, 37°C

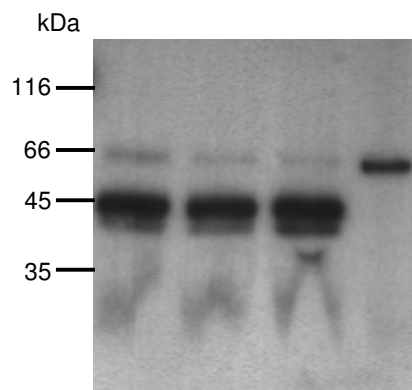
Als nächstes wurde die Wirkung einer Phosphorylierung an Ser-162 untersucht. Dazu wurden die phosphomimetischen Konstrukte PDE11 GAF-Tandem (1-568)-S162D und -S162E in pQE60 kloniert (3.7.4.2), in BL-21-Zellen transformiert und exprimiert. Das Lysat der beiden Proteine wurde unter gleichen Bedingungen wie der Wildtyp mit dem Prostatahomogenat umgesetzt. Der Vergleich mit dem Wildtyp zeigt, dass bei diesem der Anteil des größeren Abbauproduktes etwas größer erscheint als bei den phosphorylierten Proteinen. (Abb. 4-55).



Prostatahomogenat	+	-	+	-	+	-
PDE11 GAF-Tandem -WT	+	+	-	-	-	-
-S162D	-	-	+	+	-	-
-S162E	-	-	-	-	+	+

Abb. 4-55: Western Blot zum Einfluss der Phosphorylierung auf die Umsetzung des PDE11GAF-Tandems (1-568) mit humanem Prostatahomogenat; Testbedingungen: Homogenat:Lysat 1:2,3, pH 7,0, 4h, 37°C

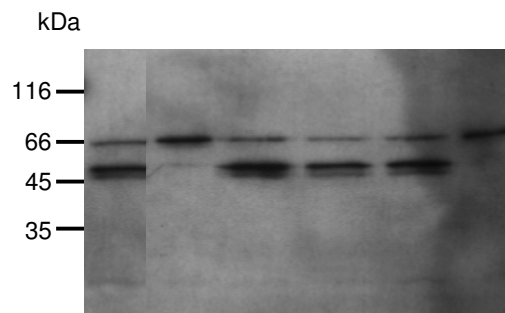
Um einen cGMP Einfluss auf die Protease(n) zu überprüfen, wurden 5µM und 1mM cGMP zugesetzt. cGMP hat keinen Einfluss auf den Abbau (Abb. 4-56).



Prostatahomogenat	+	+	+	-
PDE11 GAF-Tandem	+	+	+	+
5µM cGMP	-	+	-	-
1mM cGMP	-	-	+	-

Abb. 4-56: Western Blot zum Einfluss von cGMP auf die Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit humanem Prostatahomogenat; Testbedingungen: Homogenat:Lysat 1:2,3, pH 7,0, 4h, 37°C

Die Klassifizierung und Charakterisierung der Protease(n) ist nicht Bestandteil dieser Arbeit. Es wurden jedoch Inhibitoren eingesetzt gegen Serin- (250µg/ml Aprotinin, 0,5mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)), Cystein- (1,5mM E-64²¹), und Metalloproteasen (1mM EDTA), zudem spezifische Inhibitoren gegen Caspasen (50µM z-Val-Ala-DL-Asp-Fluoromethylketon (zVAD)) und Trypsin (500µM N-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon (TLCK)). Der einzige wirksame Inhibitor war E-64, somit muss es sich um Cysteinprotease(n) handeln (Abb. 4-57).



Prostatahomogenat	+	+	+	+	+	-
PDE11 GAF-Tandem	+	+	+	+	+	+
Inhibitor	-	E-64	Apr.	PMSF	TCLK	-

Abb. 4-57: Western Blot zur Hemmung der Proteolyse des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit Prostatahomogenat; Testbedingungen: Homogenat:Lysat 1:2,5, pH 7,0, 4h, 37°C

²¹ (2*S*,3*S*)-3-(*N*-{(*S*)-1-[*N*-(4-Guanidinobutyl)carbamoyl]3-methylbutyl}carbamoyl)oxirane-2-carboxylic acid

4.3.3 Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit anderen Gewebekomogenaten

Die nächste Frage war, ob hinsichtlich der Proteolyse eine gewisse Gewebespezifität besteht. Zum Vergleich wurden Homogenate aus humanem BPH-Gewebe, Prostatatumor, Nieren und Hoden und von SV129 Mäusen Herz, Uterus, Nieren, Skelettmuskulatur und Blase in gleichartigen Inkubationen eingesetzt.²² In Inkubationen mit humanen Gewebekomogenaten wurde das PDE11 GAF-Tandem (1-568) verdaut, während durch Mausgewebekomogenate kein Verdau erfolgte. Um auszuschließen, dass die Mausgewebe generell keine proteolytische Aktivität aufweisen bzw. dass diese durch die Präparation der Gewebe verloren gegangen ist, wurden alle murinen Gewebekomogenate mit Azocasein umgesetzt. Eine proteolytische Aktivität war in Mausgewebekomogenaten messbar (Abb. 4-60). Auffällig war, dass die proteolytische Aktivität der anderen humanen Gewebe niedriger als die des benignen Prostatagewebes war. Die proteolytische Aktivität des malignen Prostata- und das BPH-Gewebekomogenats betrug nur etwa 10-20% der Aktivität des gesunden Prostatagewebekomogenats, die anderen humanen Gewebe- und die Mausgewebekomogenate hatten eine etwa halb so hohe proteolytische Aktivität wie das Homogenat des Prostatagewebes.

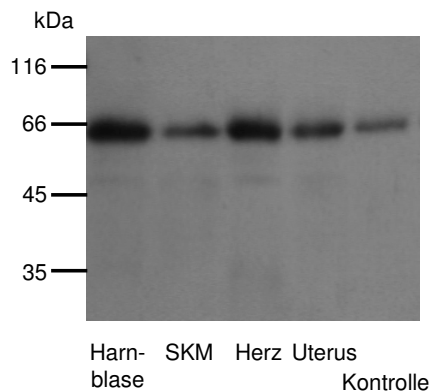


Abb. 4-58: Western Blot zur Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit Mausgewebe; Testbedingungen: Homogenat:GAF-Tandem-Lysat 1:1,2, pH 7,0, 4h, 37°C; SKM: Skelettmuskel

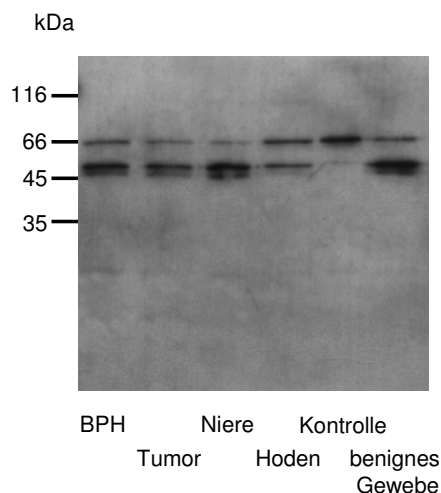


Abb. 4-59: Western Blot zur Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) mit verschiedenen humanen Gewebekomogenaten; Testbedingungen: Homogenat:Lysat 1:2,5, 4h, 37°C

²² die Mausgewebe wurden freundlicherweise von Dres. M. und U. Sausbier, Abteilung Pharmakologie und Toxikologie am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt

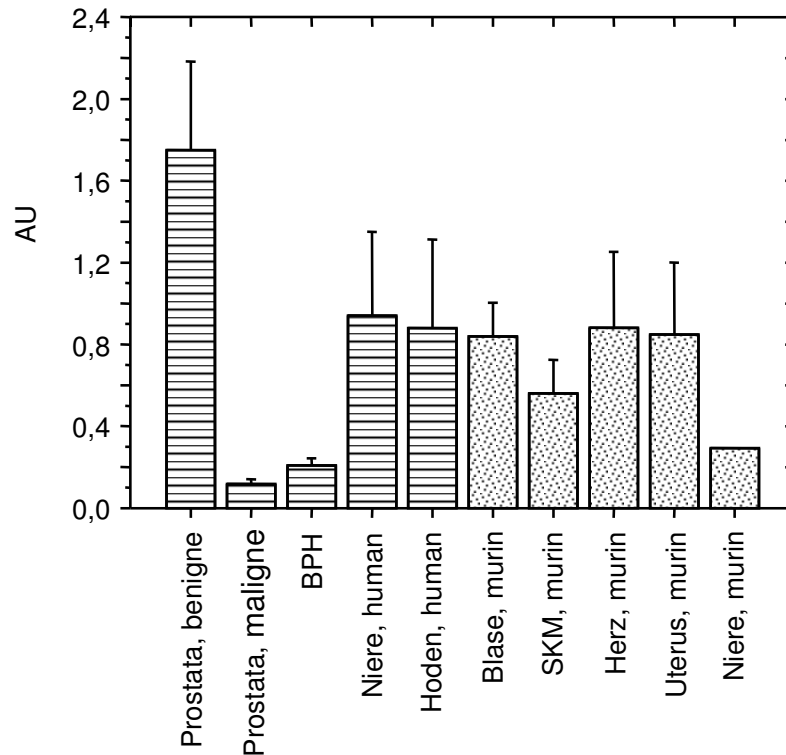


Abb. 4-60: Umsetzung verschiedener Gewebe mit Azocasein; Testbedingungen: 400 μ g Homogenat, 6,1 μ g Azocasein, 16,5h, 37°C

4.3.4 Massenspektrometrische Analyse der PDE11A4-Abbauprodukte

Um die Fragmente des proteolytischen Verdaus des PDE11 GAF-Tandems (1-568) zu bestimmen, wurde eine massenspektrometrische Analyse der Gelbanden durchgeführt (Florian Altenberend, Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung Immunologie, AG Prof. Stevanovic). Es wurde ein neues Protein, das den N-terminalen Bereich der PDE11A4 enthält, vorbereitet: die DNA des PDE11 GAF-Tandems (1-568) in pQE60 wurde mitsamt C-terminalem His-Tag in den pQE80-Vektor kloniert (3.7.4.9). Dadurch wurde das Protein mit einem N-terminalen und einem C-terminalen His-Tag versehen.

Das Protein ließ sich gut exprimieren und reinigen. Die Expression erfolgte bei 18°C über Nacht nach Induktion mit 1mM IPTG. Nach Zellyse und Zentrifugation (30min, 48000xg, 0°C) wurde der Überstand für 2h an Ni-NTA gebunden. Die Reinigung erfolgte mit 8ml Waschlösung D mit 70mM Imidazol und es wurde mit 300 μ l Elutionspuffer A mit 300mM Imidazol eluiert (Abb. 4-60 Spur 3; MW: 66,2kDa; IEP: 7,1).

Das gereinigte Protein wurde mit 50 μ g Prostatahomogenat für 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut für 2h an Ni-NTA gebunden. Die zwei Abbauprodukte waren damit gereinigt (Abb. 4-61).

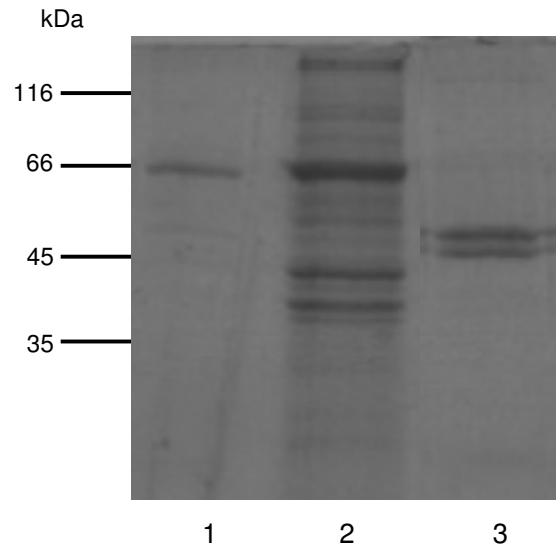


Abb. 4-61: SDS-PAGE der Umsetzung des PDE11 GAF-Tandems (1-568) in pQE80 mit humanem Prostatahomogenat; Testbedingungen: Homogenat:GAF-Protein im Verhältnis 1:2, 4h, 37°C; 1 Ausgangsprotein 2 Prostatahomogenat 3 Protein nach Verdau und erneuter Reinigung

Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, einem tryptischen Verdau unterzogen und mit 1% Ameisensäure und 50% Acetonitril extrahiert. Es wurde zur Trockne eingengt und in 10µl 1%iger Ameisensäure aufgenommen. Durch die Analyse konnten die Startaminosäuren der beiden Proteine nicht genau festgestellt werden. Diese lagen zwischen Arg-115 und Lys-129 bzw. Arg-154 und Lys-160. Da in diesem Bereich häufig tryptisch verdaut wurde²³ (Abb. 4-62), war eine Detektion der entstandenen sehr kleinen Fragmente nicht möglich.

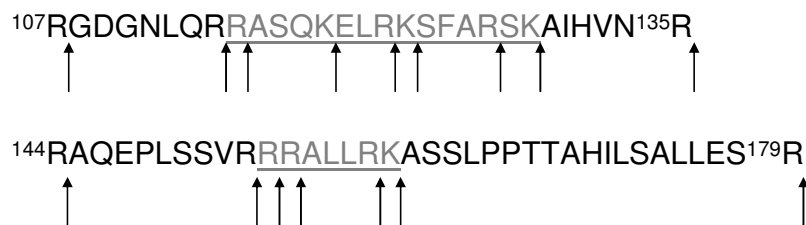


Abb. 4-62: Trypsinschnittstellen zwischen Arg-107 und Arg-135 bzw. Arg-144 und Arg-179

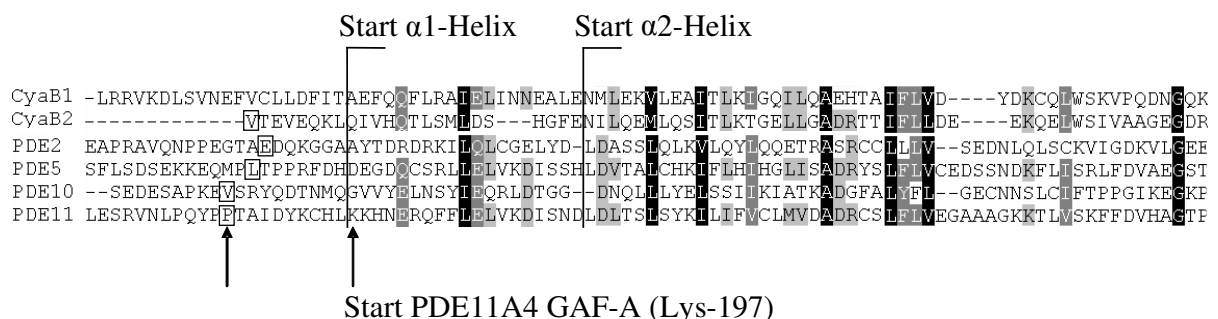
Die Bereiche der Proteolyse zeigten allerdings, dass die beiden Proteaseschnittstellen nicht direkt im Bereich des cGMP-Affinitätsprungs liegen.

²³ Trypsin schneidet hinter Arg und Lys

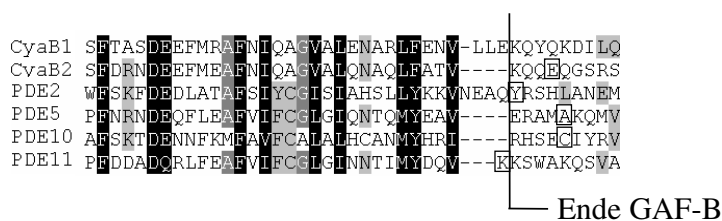
4.4 Versuche zur Kristallisation der PDE11A4 GAF- Domänen

Eine Aussage über die Bindung des cGMP an die PDE11 GAF-Domänen und deren räumliche Anordnung lässt sich nur über die Aufklärung der Kristallstruktur machen. Damit ließe sich zudem zeigen, ob die Anordnung der GAF-Domänen im Dimer parallel oder antiparallel erfolgt (s. Ref. [73, 80]).

Dafür wurden sieben verschiedene Konstrukte kloniert. Variiert wurden der N-Terminus, der Klonierungsvektor und An- bzw. Abwesenheit des His-Tags. Zur Auswahl der Startpunkte wurde PDE11A4 mit den entsprechenden Sequenzen von PDE2A, PDE5A, PDE10A, CyaB1 und CyaB2 verglichen (Abb. 4-63). Von PDE2A und CyaB2 sind die Strukturen der GAF-Domänen bekannt [73, 80], für die PDE10A GAF-Domänen wurden erfolgreich Kristalle gezüchtet [111].



- Start Kristallisationskonstrukte.
PDE2 und CyaB2 GAF-Domänen wurden dergestalt kristallisiert



- Ende Kristallisationskonstrukte

Abb. 4-63: Ausschnitt aus einem Clustal W Alignment [112], das die GAF-Domänen der humanen PDEn 2A, 5A2, 10A, PDE11A4 und der cyanobakteriellen ACn CyaB1 und CyaB2 miteinander vergleicht; dargestellt sind die Anfangsbereiche der GAF-A Domänen; je dunkler der Hintergrund, desto größer ist die Ähnlichkeit (schwarz: 100%; dunkelgrau: 80%; hellgrau: 60%)

Als Startpunkte für PDE11 Kristallisationskonstrukte wurden gewählt:

- Met-1; Start des PDE11A4 N-Terminus
- Asn-181; Startpunkt innerhalb der flexiblen Region vor der α 1-Helix
- Pro-187; Start erfolgreicher PDE10A Kristallisationskonstrukte; kurz vor der α 1-Helix
- Lys-197; Start der GAF-A und der α 1-Helix
- Asp-217; Start der α 2-Helix

Als letzte AS wurde, wie auch bei den PDE11/CyaB1-Chimären, Lys-568 gewählt.

4.4.1 Kristallisationskonstrukt ab Met-1

Das PDE11 GAF-Tandem (1-568) wurde in den pQE60-Vektor kloniert und anschließend in BL-21-Zellen transformiert (3.7.4.1). Trotz zahlreicher Optimierungsversuche ließ sich das Protein (MW: 64,5kDa; IEP: 6,7) nicht zufrieden stellend exprimieren. Abb. 4-64 zeigt beispielhaft das SDS-PAGE Gel eines Ansatzes, bei dem das Protein nach Induktion mit 400µM IPTG bei 16°C O/N exprimiert wurde. Nach Zellyse (Ultraschall, Stufe 4 für 7 mal 5 Sek.) und Zentrifugation (30min., 48000xg, 0°C) wurde für 2h an Ni-NTA gebunden (1mM Imidazol im Bindepuffer). Die Reinigung erfolgte mit 8ml Waschpuffer D und es wurde mit 300µl Elutionspuffer A eluiert. Man kann bereits im Lysat (Spur 1) erkennen, dass das Protein kaum exprimiert wurde. Auch durch die Aufreinigung wurde keine brauchbare Menge des Proteins erhalten (Eluat, Spur 5). Dass das Protein überhaupt exprimiert wurde, beweist der Western Blot (Spur 6).

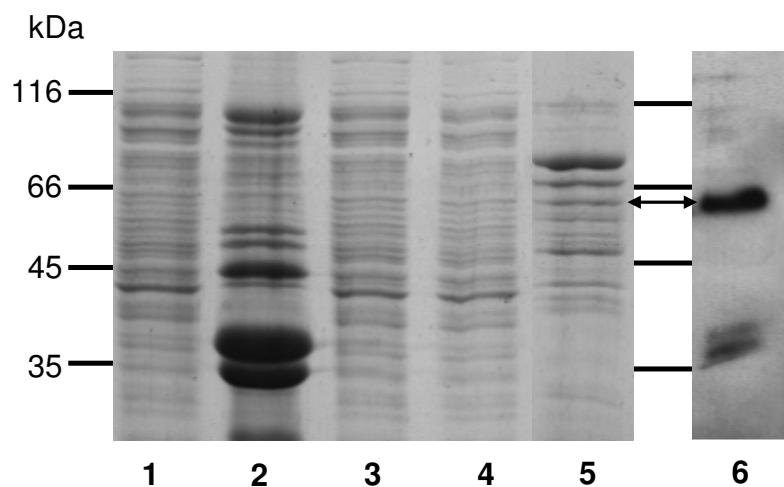


Abb. 4-64: SDS-PAGE Gel und Western Blot des PDE11 GAF-Tandems (1-568) in pQE60; 1 Überstand nach Lyse; 2 Membranniederschlag; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 2µg Proteineluat; 6 Western Blot mit 0,5µg Proteineluat

Es wurde versucht, das Eluat über eine MonoQ-Säule zu reinigen. Der pH-Wert des Puffers lag mit 7,2²⁴ eine halbe Einheit über dem isoelektrischen Punkt. Als Salzstufen wurden 150, 200, 300, 500 und 1000mM NaCl gewählt. Die 150, 200 300, und 500mM-Fractionen wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Es zeigte sich, dass die Reinheit nicht verbessert worden ist, d.h. es folgten keine Kristallisationsversuche.

4.4.2 Kristallisationskonstrukt ab Asn-181

Das PDE11 GAF-Tandem (181-568) wurde in den pQE60-Vektor kloniert. Auch hier war die Ausbeute schlecht (Abb. 4-65) Anhand des Western Blots sieht man, dass das gewünschte Protein exprimiert wurde. Der abgebildete Ansatz wurde wie beim PDE11 GAF-Tandem (1-568) beschrieben exprimiert und gereinigt (4.4.1).

²⁴ eine Erhöhung des pH-Wertes auf 7,7 brachte keine Verbesserung

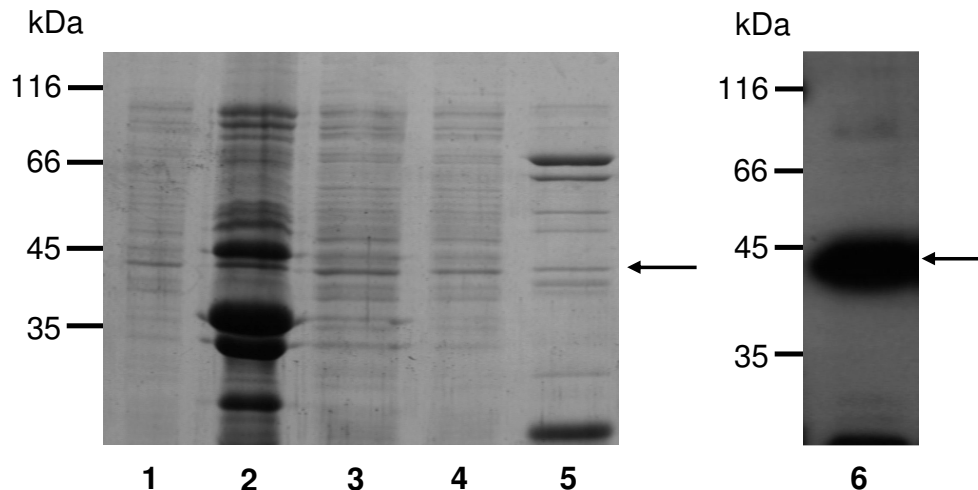


Abb. 4-65: SDS-PAGE Gel und Western Blot des PDE11 GAF-Tandems (181-568) in pQE60 (MW: 45,4kDa); 1 Überstand nach Lyse; 2 Membranniederschlag; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 2µg Proteineluat; 6 Western Blot mit 0,5µg Proteineluat

4.4.3 Kristallisationskonstrukte ab Pro-187

Es wurden zwei Konstrukte des PDE11 GAF-Tandems (187-568) kloniert. Beim ersten Konstrukt wurde dieses in pQE80 kloniert. Beim zweiten Konstrukt wurde zwischen His-Tag und GAF-Domänen eine TEV-Protease Schnittstelle (ENLYFQG) eingefügt um nach der Expression den His-Tag proteolytisch zu entfernen.

Beide Konstrukte wurden nach Induktion mit 1mM IPTG bei 18°C O/N exprimiert. Nach Zelllyse und Zentrifugation (30min, 48000xg, 0°C) wurde für 2h an Ni-NTA gebunden. Die Reinigung erfolgte mit 8ml Waschpuffer D (erstes Konstrukt) bzw. 8ml Waschpuffer E (zweites Konstrukt). Anschließend wurde mit 300µl Elutionspuffer A (erstes Konstrukt) bzw. 300µl Elutionspuffer B (zweites Konstrukt) eluiert. Das SDS-PAGE Gel und der Western Blot des ersten Konstrukts zeigen, dass sich das Protein sehr gut exprimieren und reinigen ließ (Abb. 4-66). Mehrere Eluate wurden vereinigt und mit Sartorius *Vivaspin 2* Konzentratoren konzentriert. Anschließend erfolgte eine Umpufferung in den Kristallisationspuffer. Dessen Zusammensetzung wurde entsprechend der Puffer von bereits kristallisierten GAF-Domänen gewählt: die GAF-Domänen aus mPDE2 [73], CyaB2 [80], CodY [82], sowie YKG9 [70] wurden in Tris-Puffer mit einem pH-Wert, der um 2-3 Einheiten höher lag als der IEP des entsprechenden Proteins, kristallisiert. Zur Vermeidung einer zu hohen Osmolalität wurden nur 10% Glycerin zugesetzt. Nach der Umpufferung wurden 2mM cGMP zugegeben (vgl. mPDE2 [73] und CyaB2 [80]).

Abschließend wurde von Dr. Christoph Schall, Interfakultäres Institut für Biochemie der Universität Tübingen, AK Prof. Stehle, eine Gelfiltration auf einer Superdex75 Säule auf einem SMART Gelfiltrationssystem von Amersham Biosciences durchgeführt. Es lag fast ausschließlich das Dimer vor (Abb. 4-67).

In mehreren Ansätzen wurden bis auf die phosphat- und arsenhaltigen Puffer alle Puffer der Kristallisationskits *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2*, *Crystal Screen Lite* von Hampton Research in VDX 24-Well Kristallisationsplatten mit jeweils 8µg und 12µg Protein angesetzt und bei 12 oder 16°C gelagert. Zudem wurden von Dr. Schall Ansätze mit den *Wizard I* und *II* Kristallisationskits von Emerald Biosystems bei 4°C gelagert. Bei keinem der Ansätze bildeten sich Kristalle.

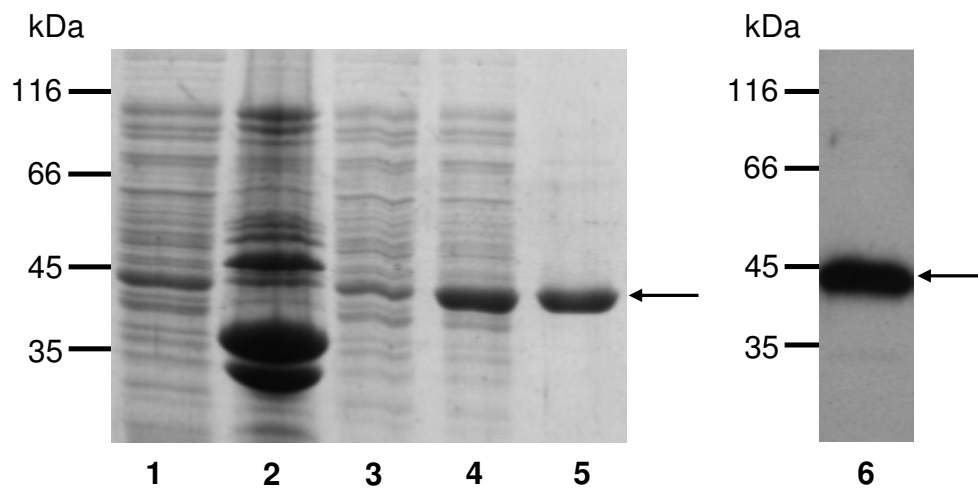


Abb. 4-66: SDS-PAGE Gel und Western Blot des PDE11 GAF-Tandems (187-568) in pQE80; 1 Überstand nach Lyse; 2 Membranniederschlag; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 4 µg Protein eluat; 6 Western Blot mit 0,1 µg Protein eluat

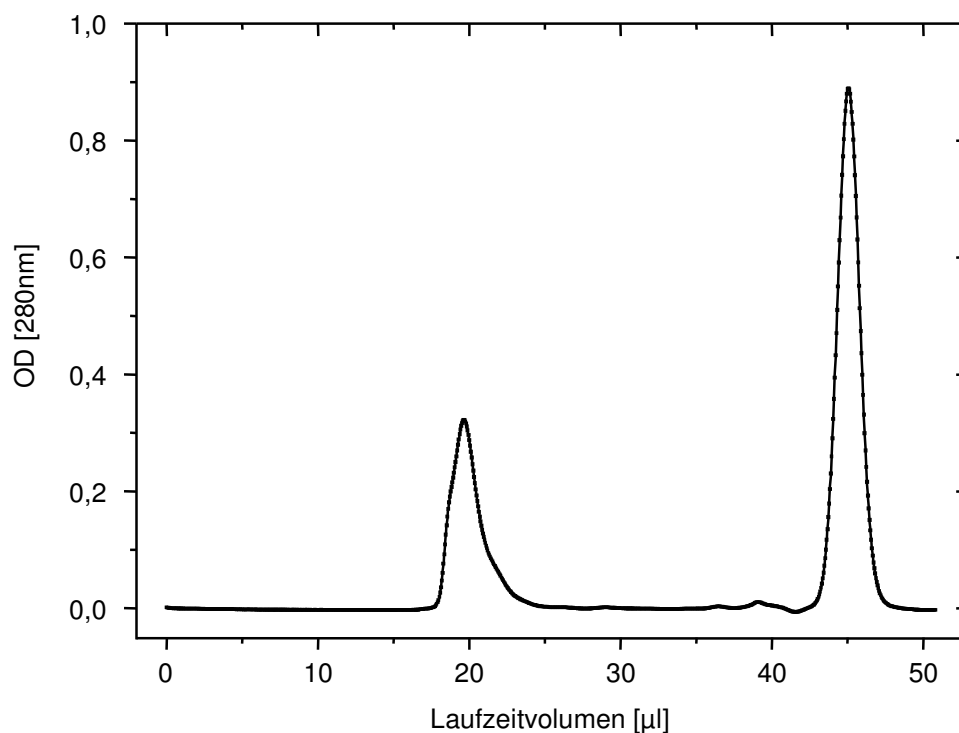


Abb. 4-67: Gelfiltrationslauf des PDE11 GAF-Tandems (187-568) in pQE80 auf Superdex75 (50mM Na₂HPO₄, 100mM NaCl)

Der N-terminale His-Tag kann ein Grund für Probleme bei der Kristallisation sein. Deshalb wurde zwischen His-Tag und Pro-187 eine TEV-Protease Schnittstelle eingeführt. Diese sieben ASn umfassende Sequenz (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Glu-Gly) wurde zudem C-terminal um drei Glycinreste erweitert, um ausreichende Flexibilität zu erhalten und den Proteaseangriff zu erleichtern (Abb. 4-68).

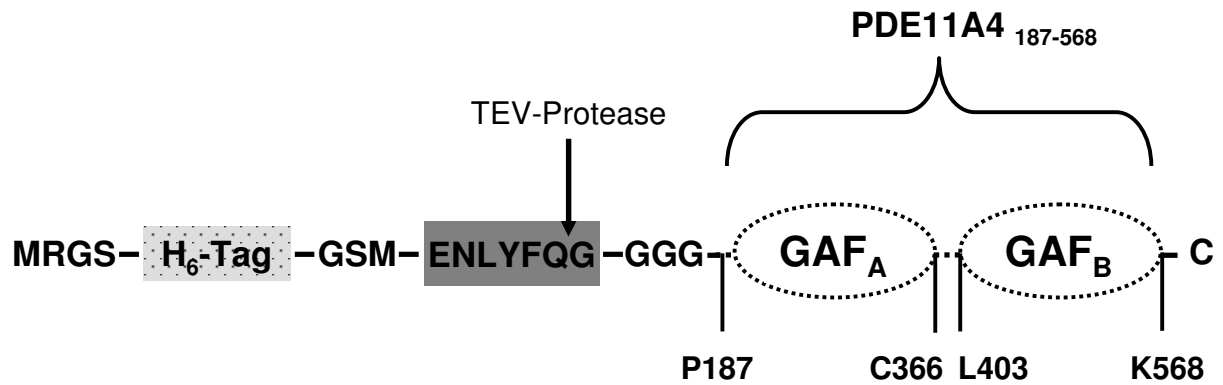


Abb. 4-68: Schematische Darstellung des TEV-Verdaus des PDE11 GAF-Tandems (187-568) in pQE80;

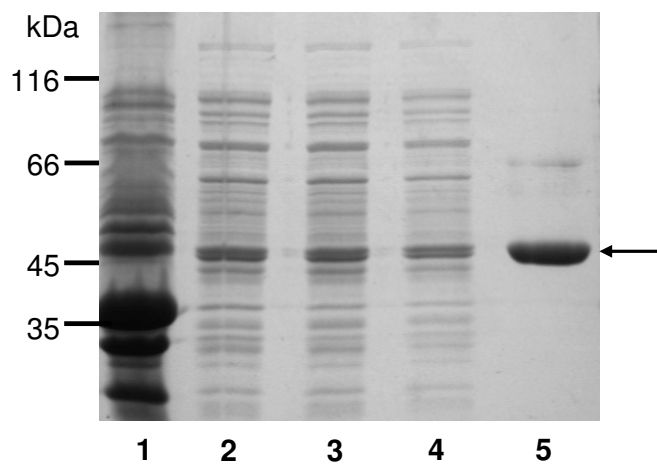


Abb. 4-69: SDS-PAGE Gel und Western Blot des PDE11 GAF-Tandems (187-568) in pQE80; 1 Membranniederschlag; 2 Überstand nach Lyse; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 4µg Proteineluat

Die nachfolgenden Präparationen wurden mit Ursula Kurz durchgeführt. Nach Expression und Reinigung des Proteins (SDS-PAGE Abb. 4-69) wurde gegen Dialysepuffer B dialysiert, um Imidazol, das beim TEV-Verdau stören kann, zu entfernen. Das Verhältnis TEV-Konstrukt:TEV betrug 20:1 (mg/mg). Ein Verdau über Nacht bei 4°C führte zu einer fast hundertprozentigen Umsetzung (Abb. 4-70, 4-71).

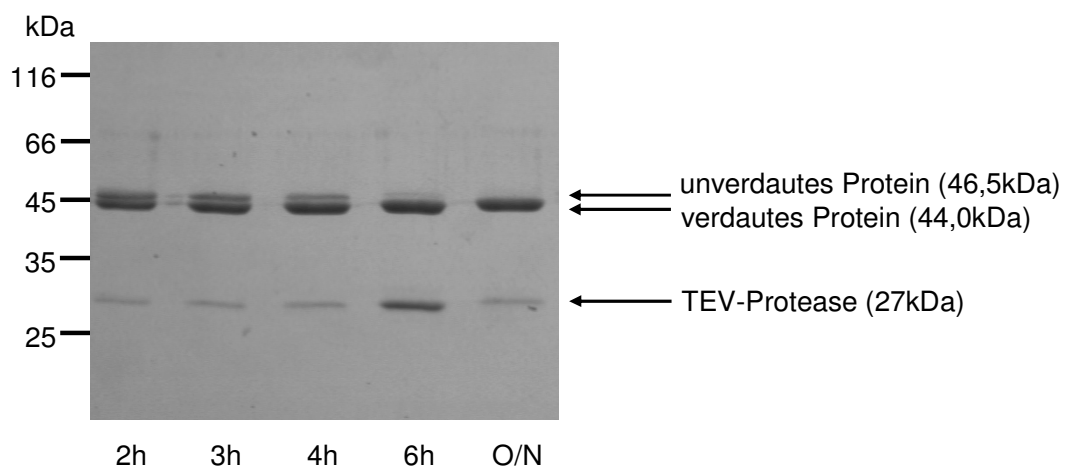


Abb. 4-70: SDS-PAGE Gel zur Zeitabhängigkeit des TEV-Verdaus bei 4°C; 2µg Verdauansatz pro Spur

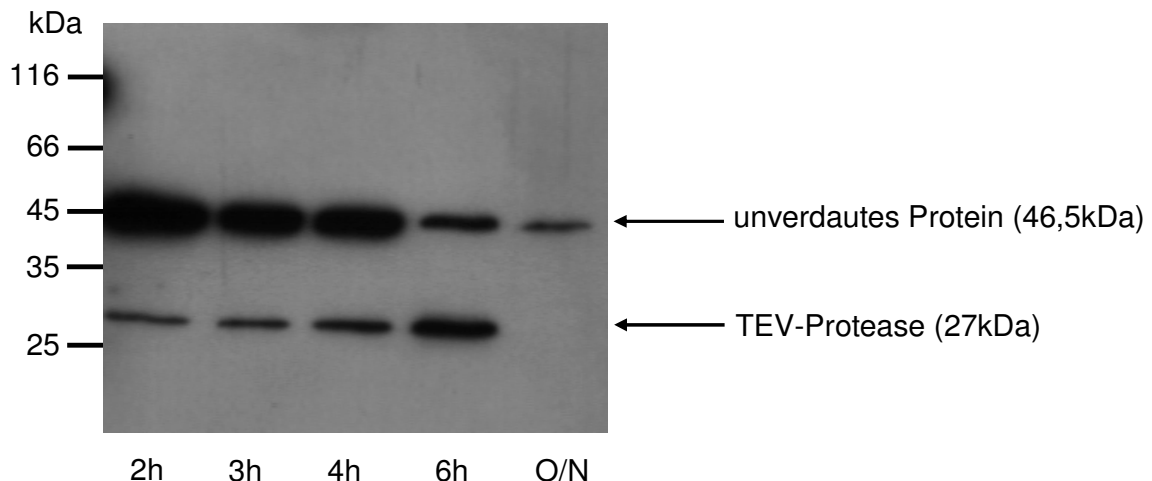


Abb. 4-71: Western Blot zur Zeitabhängigkeit des TEV-Verdau bei 4°C; 0,2µg Verdauansatz pro Spur; das verdaute Protein ist nicht zu erkennen, da der zur Immunodetektion erforderliche His-Tag durch die TEV-Protease entfernt wurde

Am nächsten Morgen wurde der Ansatz wieder gegen Dialysepuffer B dialysiert. Dadurch wurde EDTA aus dem TEV-Puffer entfernt und eine Komplexierung der Ni²⁺-Ionen aus dem Ni-IDA-Material bei der anschließenden Bindung wurde vermieden.

Zur Entfernung der TEV-Protease wurden 2-3ml TEV-Ansatz mit 200µl Ni-IDA und 10mM Imidazol versetzt und für 2h inkubiert. Es wurde anschließend mit 2ml Waschpuffer F gewaschen und mit 100µl Elutionspuffer B eluiert. Die Durchläufe mit dem verdauten Protein wurden gesammelt, mit *Vivaspin 2* Konzentratoren konzentriert (bis zu 40mg/ml) und in Kristallisationspuffer umgepuffert.

Die Kristallisation wurde von Dr. Jörg Martin, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, mit einem *Cartesian Honeybee Crystallization Roboter* angesetzt. Drei Proteinansätze wurden mit jeweils 1000 verschiedenen Puffern versetzt: 20µg Protein mit 2mM cGMP, 10µg Protein mit 2mM cGMP und 10µg Protein ohne cyclisches Nukleotid. Nach 7, 28 und 90 Tagen wurden die Kristallisationstropfen mit der *Formulatrix Rock Maker and Imager System* Verarbeitungssoftware untersucht. Es bildeten sich keine Proteinkristalle.

4.4.4 Kristallisationskonstrukte ab Lys-197

Kristallisationskonstrukte, die mit der ersten AS der GAF-A (Lys-197) beginnen, wurden in pQE60- (C-terminaler His-Tag) und pQE80- (N-terminaler His-Tag) kloniert (3.7.4.6, 3.7.4.7) und anschließend in BL-21-Zellen transformiert. Der unterschiedliche Vektoraufbau der MCS führte zu geringen Abweichungen von MW und IEP (pQE60-Konstrukt: MW: 43,5kDa; IEP: 5,4; pQE80-Konstrukt: MW: 44,2kDa; IEP: 5,2).

Das pQE60-Konstrukt ließ sich schlecht exprimieren und reinigen (Abb. 4-72; Bedingungen wie bei den anderen pQE60-Konstrukten, 4.4.1). Die erwartete Proteinbande lässt sich im SDS-PAGE Gel nicht eindeutig ausmachen.

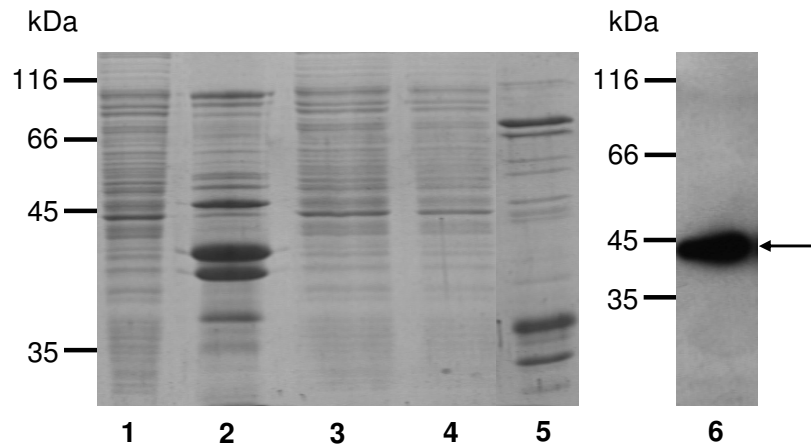


Abb. 4-72: SDS-PAGE Gel und Western Blot des PDE11 GAF-Tandems (197-568) in pQE60; 1 Überstand nach Lyse; 2 Membranniederschlag; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 2µg Proteineluat; 6 Western Blot mit 0,5µg Proteineluat

Das pQE80-Konstrukt wurde nach Induktion mit 1mM IPTG O/N bei 18°C exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte wie bei den pQE60-Konstrukten (4.4.1). Die Ausbeute (500-1000µg pro 200ml LB-Medium) und der Reinheitsgrad (vgl. Abb. 4-73 Spur 4) waren für Kristallisationsansätze geeignet.

Den Proteinlösungen wurden 2mM cGMP zugesetzt. Anschließend wurde von Dr. Ch. Schall eine Gelfiltration durchgeführt die zeigte, dass fast ausschließlich das Dimer vorlag (Abb. 4-74). In mehreren Ansätzen wurden bis auf die phosphat- und arsenhaltigen Puffer alle Puffer der Kristallisationskits *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2*, *Crystal Screen Lite* von Hampton Research in VDX 24-Well Kristallisationsplatten mit jeweils 5,5µg und 13µg Protein angesetzt und bei 12 und 16°C gelagert. Zudem wurden von Dr. Ch. Schall Ansätze mit den *Wizard I* und *II* Kristallisationskits von Emerald Biosystems vorbereitet und bei 4°C gelagert. Bei keinem der Ansätze bildeten sich Kristalle.

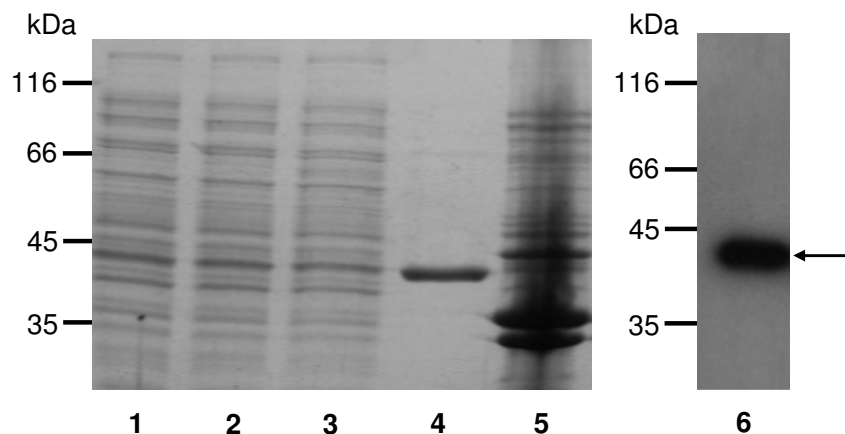


Abb. 4-73: SDS-PAGE Gel und Western Blot des PDE11 GAF-Tandems (197-568) in pQE80; 1 Überstand nach Lyse; 2 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 3 Waschfraktion; 4 2µg Proteineluat; 5 Membranniederschlag; 6 Western Blot mit 0,1µg Proteineluat

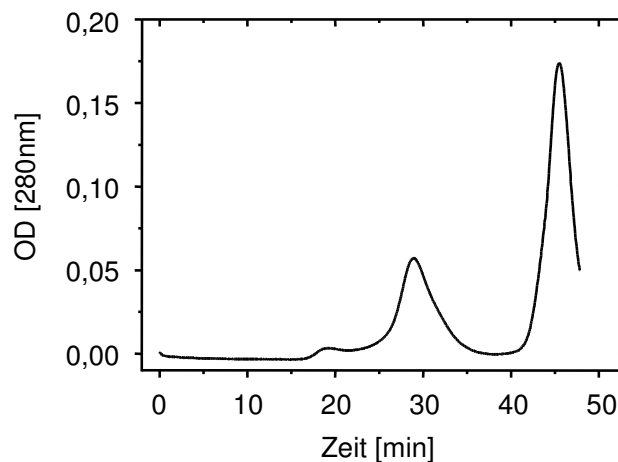


Abb. 4-74: Gelfiltrationslauf des PDE11 GAF-Tandems (197-568) in pQE80 auf Superdex200 (50mM Na₂HPO₄, 100mM NaCl)

4.4.5 Kristallisationskonstrukt ab Asp-217

Das PDE11 GAF-Tandem (217-568) wurde in pQE60 kloniert und in BL-21-Zellen transformiert (3.7.4.8). Das Protein (MW: 41,1; IEP: 5,3) wurde wie die anderen pQE60-Konstrukte exprimiert und gereinigt (4.4.1). Das Protein war für Kristallisationsversuche geeignet (Abb. 4-75). Die Western Blots zeigen dass der *Complete-EDTA-free*-Proteaseinhibitor-Cocktail notwendig war, um Abbruchbanden zu vermeiden (Abb. 4-75, Spuren 6, 7).

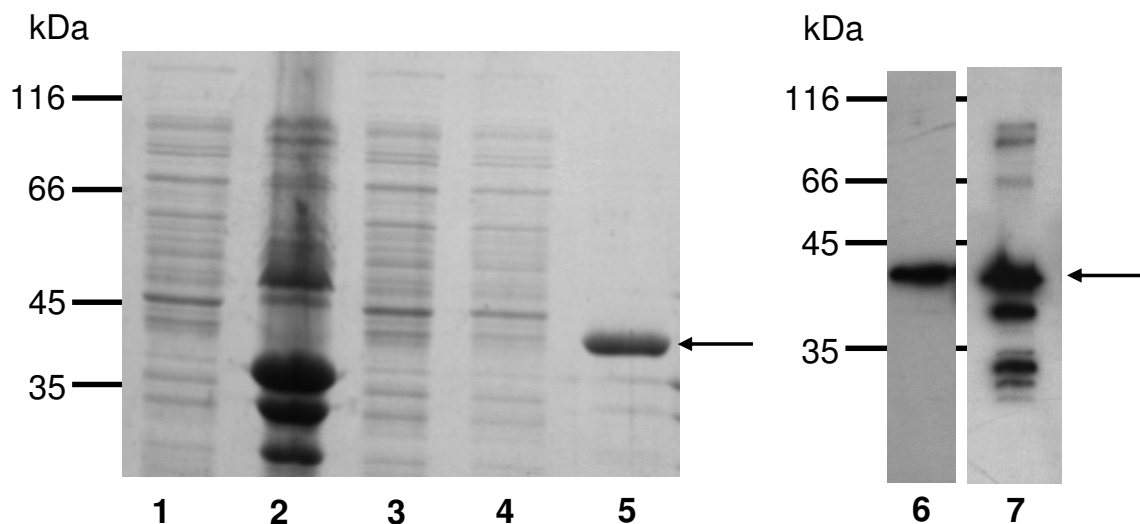


Abb. 4-75: SDS-PAGE Gel und Western Blot des PDE11 GAF-Tandems (217-568) in pQE60; 1 Überstand nach Lyse; 2 Membranniederschlag; 3 Überstand nach Ni-NTA-Bindung; 4 Waschfraktion; 5 2µg Proteineluat; 6 Western Blot mit 0,5µg Proteineluat (Lysispuffer mit *Complete-EDTA-free*-Proteaseinhibitor-Cocktail; 2h Ni-NTA-Bindung); 7 Western Blot mit 0,5µg Proteineluat (Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren; 14h Ni-NTA-Bindung)

Mehrere Eluate wurden vereinigt, mit Pall *NANOSEP 10k* konzentriert und in Kristallisationspuffer umgepuffert (bis zu 15mg/ml). Es wurden 2mM cGMP zugesetzt. In einem Screen

wurden bis auf die phosphat- und arsenhaltigen Puffer alle Puffer der Kristallisationskits *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2*, *Crystal Screen Lite* von Hampton Research und *Wizard I* und *II* von Emerald Biosystems in VDX 24-Well Kristallisationsplatten mit jeweils 6µg Protein angesetzt und bei 16°C gelagert. Nach acht Wochen waren rechteckige Kristalle mit 100x20 bis 110x30µM in CS#13 (30% PEG 400, 01% Tris/HCl pH 8,5, 0,2M Na-Citrat) gewachsen (Abb. 4-76). Dies war nicht zu reproduzieren.

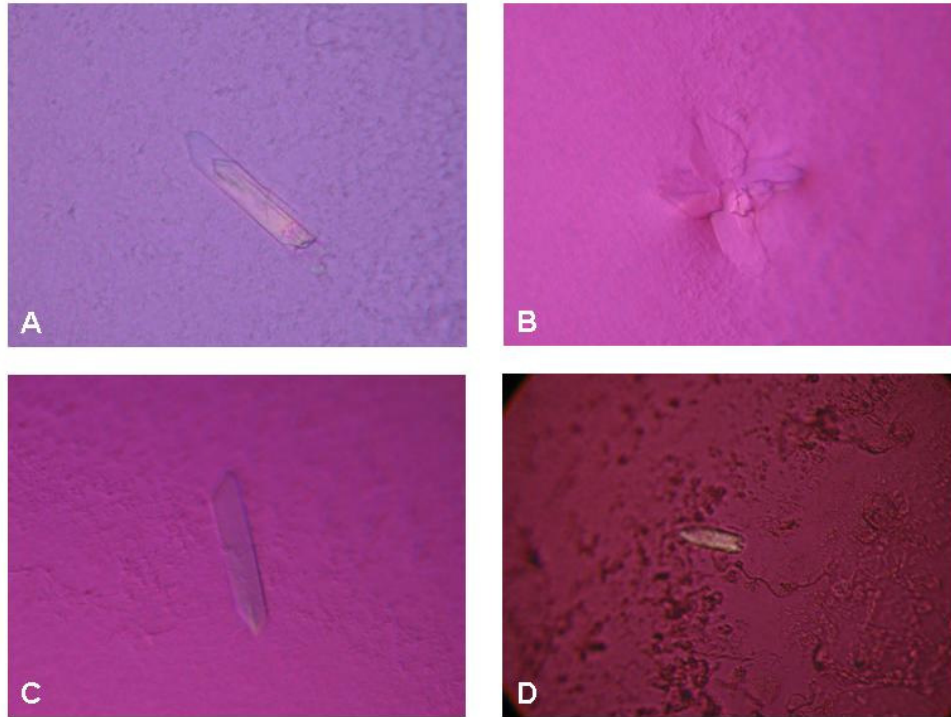


Abb. 4-76: Darstellung von vier Kristallen; Präzipitationslösungen: 30% PEG 400, 01% Tris/HCl pH 8,5, 0,2M Na-Citrat (A-C) und 25% PEG 400 0,1M Na-Citrat, Tris/HCl pH 8,5 (D); Größen: A: 100x20µM; B: 110x30µM; C: 100x20µM; D: 70x20µM

5 Diskussion

5.1 Die PDE11A4 GAF-Domänen stimulieren über die Bindung von cGMP

Noch Jahre nach der Entdeckung von PDE11 war die Funktion der N-terminalen GAF-Domänen ungeklärt. Über Bindungsstudien wurde kein Ligand identifiziert [44, 45]. Der Nachweis, dass die GAF-Domänen der rPDE2 mit dem katalytischen Zentrum der cyanobakteriellen Adenylatcyclase CyaB1 funktionell koppeln, d.h. dass cGMP die Cyclaseaktivität stimuliert [60], ließ hoffen, dass auch eine funktionelle Kopplung der PDE11 GAF-Domänen mit der cyanobakteriellen AC erfolgt.

Eine Chimäre, bestehend ausschließlich aus den GAF-Domänen der PDE11A4 und dem N-Terminus und der katalytischen Domäne der CyaB1, ließ sich jedoch weder durch cAMP noch cGMP stimulieren. Dies konnte bedeuten, dass entweder der Ligand des PDE11A4 GAF-Tandems kein cyclisches Nukleotid ist, oder aber dass hier keine funktionelle Kopplung mit dem Reporterenzym erfolgte. Eine nächste Chimäre schloss den vollständigen N-terminalen Bereich der PDE11A4 (ASn 1- 568) ein. Hier wurde bei der Zugabe von cGMP die AC bis zu vierfach stimuliert, cAMP war inaktiv (4.1.2.2). Die Affinität der GAF-Domänen für cGMP war mit einem EC_{50} -Wert von $72,5\mu\text{M}$ jedoch sehr gering, d.h. nicht in einem physiologisch relevanten Konzentrationsbereich von cGMP.

Das Ergebnis erklärte zunächst einmal negative Befunde anderer: Fawcett et al. untersuchten den Einfluss von cGMP auf die cAMP-Hydrolyse und vice versa bei PDE11A1 [44]. Hier fehlten bei Verwendung der kürzesten PDE11 Spleißvariante die für die Nukleotidbindung notwendigen ASn. Yuasa et al. führten Bindungsassays mit PDE11A4 durch und setzten $2\mu\text{M}$ [^3H]-cGMP bzw. [^3H]-cAMP ein [45]. Bei einer EC_{50} von $72,5\mu\text{M}$ cGMP ist eine Konzentration von $2\mu\text{M}$ viel zu gering, um eine Bindung von cGMP zu bemerken, zumal der K_{off} -Wert gezeigt hat, dass der Ligand sehr schnell von den GAF-Domänen abdissoziiert. Die Frage war auch, warum es bei der ersten Chimäre zu keiner cGMP-Stimulation gekommen war. Entweder war aufgrund der Verknüpfung mit CyaB1 der Zugang zu den GAF-Domänen blockiert, oder aber die cGMP-Bindung erfolgte, es erfolgte aber keine intramolekulare Signalweiterleitung.

Durch die Trennung von Substrat und Ligand in der PDE11/CyaB1-Chimäre, im Gegensatz zum PDE11-Holoenzym, ist somit ein Werkzeug geschaffen, mit dem sich die Eigenschaften der PDE11A4 GAF-Domänen isoliert untersuchen lassen. In der PDE11 ist cGMP zugleich Substrat und Ligand.

Die kinetischen Eigenschaften des katalytischen Zentrums der CyaB1 blieben durch die Verknüpfung mit den PDE11A4 GAF-Domänen unverändert. Dies trifft auf alle hier verwendeten Konstrukte zu. Die Beschreibung der Eigenschaften der GAF-Domänen wurde also nicht durch ein verändertes Verhalten des katalytischen Zentrums beeinträchtigt. Ein Nachteil der PDE11/CyaB1-Chimären ist allerdings, dass eine Übertragbarkeit der GAF-Tandem Eigenschaften auf die PDE11 problematisch sein könnte, denn die Tatsache, dass sich die katalytischen Parameter der CyaB1 nicht wesentlich geändert haben, muss natürlich noch nicht bedeuten, dass die Eigenschaften der GAF-Domänen in der Chimäre unverändert geblieben sind (vgl. 5.6). Dennoch ist die Übertragbarkeit sehr wahrscheinlich, wie der Vergleich der Daten weiterer Chimären mit Bindungs- und Mutationsstudien der entsprechenden Holoenzyme zeigt [60, 75, 80, 87].

Bei Mutationsstudien zur Klärung der Nukleotidbindung und -spezifität wurden die Ergebnisse von Untersuchungen anderer PDE GAF-Domänen zu Rate gezogen. Eine wichtige, wenn auch ungeklärte Rolle spielt das NKFDE-Motiv, das in 12 der 14 GAF-Domänen in Mammalia PDEn

auftaucht²⁵ [35]. Zunächst wurde vermutet, dass dieses Motiv direkt für die Nukleotidbindung zuständig ist, da Mutationsstudien an der PDE5 darauf hinwiesen [71, 72]. Der Verdacht erhärtete sich zudem durch die Tatsache, dass die GAF-Domäne des Proteins YKG9 aus *S. cerevisiae* kein NKFDE-Motiv enthält und auch kein cyclisches Nukleotid bindet [70]. Die Strukturaufklärung der mPDE2 widerlegte allerdings diese Vermutungen. Hier zeigte sich, dass das NKFDE-Motiv entfernt von der Bindungstasche liegt und daher höchstens für eine Stabilisierung der Bindungstasche sorgt [73]. Dennoch ist es offensichtlich für eine effiziente Bindung nötig, wie entsprechende Mutationstudien zeigen [60, 71, 74, 87, 113].

In der PDE11A4 ist das NKFDE-Motiv nur in GAF-A vorhanden, in GAF-B liegt es als NRFDQ-Motiv vor. Zunächst wurde Asp-355 in GAF-A nach Alanin mutiert. Es zeigte sich, dass Basalaktivität, Stimulation und Affinität im Vergleich zum Chimären-Wildtyp verringert waren (4.1.3.1 und 4.1.5.2). cGMP bindet also an die GAF-A.

Anschließend wurden die in der mPDE2 für die Diskriminierung zwischen cAMP und cGMP ausgemachten ASn Phe-258, Asp-259 und Thr-319 untersucht. In der mPDE2 hatte sich gezeigt, dass die Spezifität durch Mutation der genannten Reste nach Alanin umgekehrt wurde [74]. Entsprechend wurden auch die Mutanten der PDE11/CyaB1-Chimäre geplant. Die Stimulation war bei den F258A- und D259A-Mutanten völlig verschwunden (4.1.3.5f.). Bei der PDE11 sind diese ASn somit nicht für die Diskriminierung des Liganden zuständig, aber direkt an der Nukleotidbindung beteiligt. Dies zeigten auch die entsprechenden Mutationen in PDE11A (197-568) - CyaB1 (386-859). Da PDE11A (197-568) - CyaB1 (386-859) sowohl durch cGMP als auch durch cAMP stimuliert wurde, bestand die Möglichkeit, dass eine Mutation von Phe-258 und Asp-259 bei Beteiligung dieser Reste an der Diskriminierung zwischen den Nukleotiden das Verhältnis der Stimulationen durch cGMP und cAMP deutlich auf die Seite des cAMP verschieben könnte. Aber auch diese Mutanten stimulierten weder über cAMP noch über cGMP. Die Mutationen können nicht zu einer veränderten Spezifität in der Nukleotidbindung führen, ohne dass es zur Stimulation des katalytischen Zentrums kommt. Wie unten erläutert, ist von einem einheitlichen Mechanismus der Signalweiterleitung in Tandem GAF-Domänen auszugehen, der unabhängig vom Aufbau der Bindungstasche ist. Eine umgekehrte Bindungsspezifität wird daher keinen Einfluss auf die Signalweiterleitung haben und führt weiterhin zu einer Stimulation des katalytischen Zentrums, die hier zu beobachten gewesen wäre.

Thr-319 scheint dagegen einen Teil zur Nukleotidspezifität beizutragen. PDE11A (1-568) - CyaB1 (386-859) T319A wurde nicht mehr über cGMP stimuliert, dagegen leicht über cAMP (4.1.3.7). Aufgrund der nur geringen Stimulation bei hohen cAMP-Konzentrationen kann davon ausgegangen werden, dass auch noch andere ASn an der Diskriminierung beteiligt sind. Auf eine weitere Untersuchung zur Nukleotidspezifität der GAF-A wurde verzichtet, da statt einzelner ASn sehr wahrscheinlich ganze Bereiche dafür zuständig sind. Dies wurde z. B. durch den Austausch einzelner Bereiche der cN-bindenden GAF-Domänen der PDE2 und CyaB2 gezeigt [88]. Genaue Erkenntnisse kann erst die Aufklärung der Struktur der GAF-Domänen geben.

Neben der Bindung von cGMP scheint die GAF-A auch für die Dimerisierung zuständig zu sein. Eine Chimäre, beginnend mit Lys-198 konnte das katalytische Zentrum nicht aktivieren (4.1.5.3). Da durch das Weglassen von Lys-197, nach Sequenzvergleich der Beginn der α 1-Helix (4-63), die erste α -Helix nicht mehr ausgebildet werden konnte, ist anzunehmen, dass diese Helix und somit die GAF-A wie in der mPDE2 für die Ausbildung des Dimers notwendig ist [73].

In der GAF-B liegt das NKFDE-Motiv leicht verändert als NRFDQ-Motiv vor. Eine Nukleotidbindung ist hier unwahrscheinlich, da sich die D534A-Mutante in ihrem Verhalten kaum vom Wildtyp unterschied (4.1.3.3). Zudem wurde der Einfluss einer Rückmutation zu NKFDE im Chimären-Wildtyp und in PDE11A (1-568) - CyaB1 (386-859) D355A untersucht. Beide Q/E-Mutanten zeigten ein kaum verändertes Verhalten bezüglich Stimulation und

²⁵ vgl. Fußnote 4 und Abb. 1-3

Affinität im Vergleich zu ihren Ausgangsproteinen (4.1.3.2). Bei einer Nukleotidbindung durch die GAF-B hätten diese Mutationen zu einer weiteren Stabilisierung der Bindungstasche führen können. Dass die GAF-B dennoch für die Signalweiterleitung essentiell ist, zeigte sich daran, dass ein Konstrukt bestehend aus GAF-A und dem katalytischen Zentrum der CyaB1 zwar AC-Aktivität besaß aber nicht durch cGMP stimuliert wurde. Das lässt darauf schließen, dass GAF-B zum Beispiel durch Beteiligung an der Dimerisierung für die Ausbildung einer Gesamtstruktur notwendig ist, die die Signalweiterleitung an das katalytische Zentrum ermöglicht. Die GAF-A der PDE11A3 ist im Vergleich zur PDE11A4 GAF-A um 162 ASn verkürzt [46]. Somit fehlen u. a. die für die cGMP-Bindung essentiellen ASn Phe-258 und Asp-259. Zu einer Nukleotidbindung und Stimulation des katalytischen Zentrums könnte auch der 54 ASn lange N-Terminus beitragen, der sich in der Sequenz vom PDE11A4 N-Terminus unterscheidet und dessen Funktion unbekannt ist. Die PDE11A3/CyaB1-Chimäre wurde weder durch cGMP noch durch cAMP stimuliert, die Basalaktivität war jedoch die höchste aller untersuchten Chimären (4.2.2). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die cGMP-Bindung nur über die GAF-A erfolgt.

5.2 Modulation der Regulation der PDE11A4 GAF-Domänen

Die niedrige cGMP-Affinität der GAF-Domänen stellte die Frage, ob Bedingungen existieren, die zu einer höheren Affinität führen, z.B. posttranslationale Modifikationen oder Phosphorylierung an Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten. Die PDE11A4 besitzt zwei N-terminale Phosphorylierungsstellen (Ser-117 und Ser-162) [45]. Eine *in vitro* Phosphorylierung der PDE11A4/CyaB1-Chimäre erhöhte ansatzweise die cGMP-Affinität (4.1.4.1). Um diese abzusichern, wurden beide Serinreste durch Asp oder Glu im Sinne einer phosphomimetischen Mutation ersetzt. Die Mutation von Ser-162 führte zu einer zwei- bis vierfach erhöhten cGMP-Affinität (4.1.4.2). Dies ist besonders interessant, da Ser-162 bevorzugt durch eine cGMP-abhängige Kinase phosphoryliert werden sollte. Bei einer erhöhten cGMP-Konzentration kann somit die PKG aktiviert werden, diese phosphoryliert Ser-162, cGMP bindet an GAF-A und aktiviert die cGMP-Hydrolyse. Hier bietet sich also für die Zelle eine Möglichkeit, durch einen verstärkten cGMP-Abbau schnell auf erhöhte cGMP-Spiegel zu reagieren.

Die Mutation der Phosphorylierungsstelle für die PKA (Ser-117) brachte keine Veränderung (4.1.4.2). Es gibt aber zahlreiche andere Parameter unabhängig von der cGMP-Affinität der GAF-Domänen, die eine Phosphorylierung von Ser-117 beeinflussen könnten, z.B. eine direkte Beeinflussung des katalytischen Zentrums, die in den PDE11/CyaB1-Chimären aufgrund des Austauschs der katalytischen Domäne nicht erkannt wird, oder eine Beeinflussung der Konformation, so dass es zu weiteren Protein-Protein-Interaktionen kommen könnte (vgl. [114]). Wie bei der PDE10A2 wäre eine Ser-117 Phosphorylierung auch als Translokationssignal denkbar [110].

Die Unterschiede in den Eigenschaften der PDE11/CyaB1-Chimären mit CyaB1- bzw. PDE11 N-Terminus wurden dahingehend interpretiert, dass der N-Terminus Bedeutung für die Funktion der GAF-Domänen besitzt, wie dies auch für die PDE5 gezeigt wurde [75]. Ein Konstrukt ohne N-Terminus beginnend mit GAF-A ergab, dass die Stimulation im Vergleich zum Konstrukt mit dem PDE11A4 N-Terminus etwa gleich blieb, jedoch waren sowohl Basalaktivität als auch cGMP-Affinität zehnmal höher (4.1.5). Dies weist darauf hin, dass der N-Terminus massive intramolekulare Bedeutung besitzt.

Es wurde untersucht, ob schrittweises Verkürzen des N-Terminus die Funktion des GAF-Tandems beeinflusst. Es zeigte sich, dass die Basalaktivität der verkürzten Chimären generell erhöht war, allerdings nicht vollständig mit der Länge des verbliebenen N-Terminus korrelierend (4.1.5). Eine im Vergleich zum Chimären-Wildtyp 10-fach erhöhte Basalaktivität hatten die Konstrukte ab Glu-177 und Lys-197. Die cGMP-Affinität der GAF-Domänen nahm sprunghaft

zu bei Chimären, die bei Glu-177 oder weiter C-terminal begannen. Die cGMP-Affinität der anderen Chimären war teilweise sogar erniedrigt (4.1.5). Es wäre denkbar, dass es durch das Verkürzen des N-Terminus bis Ala-169 zu einer Fehlfaltung des N-Terminus kommt, so dass cGMP schlechter gebunden werden konnte. Ab Glu-177 war der N-Terminus zu kurz, um die GAF-Domänen und das katalytische Zentrum zu beeinflussen. Ein Modell des Einflusses des N-Terminus auf die GAF-Domänen ist weiter unten beschrieben.

In der Zelle kann es zu diesen Änderungen nur dann kommen, wenn die PDE11A4 entsprechend N-terminal proteolytisch wird. Dazu wurde der N-Terminus samt GAF-Tandem der PDE11A4 (ASn 1-568) mit einem Homogenat von Prostatagewebe umgesetzt. Als erstes wurde Prostatagewebe deshalb untersucht, weil eine starke Expression der PDE11A4 in diesem Gewebe mehrfach nachgewiesen wurde [44, 45, 50, 51, 53]. Sollte es *in vivo* eine Regulation durch Proteolyse geben, so sollten die entsprechende(n) Protease(n) in Prostatagewebe zu finden sein.

Prostatagewebeshomogenat besitzt proteolytische Aktivität. Der N-terminale Bereich der PDE11A4 wird an zwei Stellen geschnitten, da zwei definierte Abbauprodukte entstanden (4.3.2). Dieser Abbau erscheint spezifisch für humanes Gewebe, da es mit humanem BPH-, Nieren- und Hodengewebe ebenfalls zur Bildung dieser beiden Fragmente kam, während mit Homogenaten aus verschiedenen Mausgeweben kein Abbau erfolgte, obwohl eine proteolytische Aktivität in diesen Gewebe präsent ist (4.3.3). Da die PDE11A4 sowohl in benignem als auch in malignem Prostatagewebe vorkommt [50], ist auch der Unterschied der proteolytischen Aktivität zwischen benignem und malignem Prostatagewebe untersucht worden. Die proteolytische Aktivität des malignen Gewebes war geringer als die des benignen, der Verdau des PDE11A4 N-Terminus erfolgte gleichartig (4.3.3).

Durch die Zugabe verschiedener Proteaseinhibitoren konnte(n) die Protease(n) der Klasse der Cysteinproteasen zugeordnet werden (4.3.2), darüber hinaus ist sie nicht weiter charakterisiert worden. Die Phosphorylierung des PDE11A4 N-Terminus beeinflusste das Produktverhältnis der Proteolyse. Während im unphosphorylierten Zustand die beiden Fragmente im Verhältnis von etwa 2:1 entstanden, war es im phosphorylierten Zustand nahezu 1:1 (4.3.2).

Die massenspektrometrische Analyse der Fragmente ergab, dass die Hydrolyseschnitte zwischen Arg-115 und Lys-129 bzw. Arg-154 und Lys-160 lagen (4.3.4). Es ist eindeutig, dass die Fragmente größer waren als die N-terminalen Bereiche der Chimären mit deutlich erhöhter Affinität. Somit zeigte sich, dass der proteolytische Abbau nicht unmittelbar zu Proteinen mit erhöhter cGMP-Affinität führte.

Auch wenn die Ergebnisse noch nicht darauf weisen, so könnte es in der Zelle dennoch zu einer Affinitätssteigerung kommen, wie sie durch die Untersuchung der entsprechenden verkürzten Chimären gezeigt wurde. Zum einen durch einen proteolytischen Verdau durch eine Protease, die im Homogenat nicht mehr aktiv war oder die zusätzliche Faktoren benötigt. Sie selbst oder ein entscheidender Aktivator kann durch den Homogenisationsvorgang entfernt oder zerstört worden sein, oder die gewählten Versuchsbedingungen haben die Aktivität der Protease deutlich verringert. Die Protease könnte sich in Gegenwart des PDE11-Holoenzym auch anders verhalten im Vergleich zum rekombinanten Protein.

Zum anderen könnte eine Affinitätssteigerung auch durch eine andersartige Beeinflussung des Proteins zustande kommen, zum Beispiel durch Wechselwirkung mit zellulären Komponenten. Der Effekt dieser Wechselwirkung wäre dann dem Einfluss eines verkürzten N-Terminus ähnlich.

Es konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob und wie es in der Zelle zu einer erhöhten Affinität der PDE11A4 GAF-Domänen kommt, die Versuche weisen aber auf einen spezifischen Verdau im N-terminalen Bereich der PDE11A4 hin. Spezifisch dahingehend, dass die Schnitte lediglich an zwei Stellen innerhalb des N-Terminus erfolgten und dass dieser Verdau spezifisch für humanes Gewebe war.

Die Hoffnung, die Messung der Aktivitäten dieser Protease(n) zur Diagnose von Prostatakrebs einzusetzen, hat sich nicht erfüllt. Sollte es unterschiedliche Eigenschaften der Protease(n) in benignem und malignem Gewebe geben, so ist eine genaue Charakterisierung und Untersuchung der Protease(n) in den entsprechenden Geweben erforderlich.

Nachdem dem 196 ASn langen N-Terminus der PDE11A4 bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte, kommt diesem nun erstmals eine Bedeutung zu. Die Charakterisierung steht erst am Anfang, aber es ist klar, dass der N-Terminus zum einen das katalytische Zentrum direkt (Veränderung der Basalaktivität) und auch indirekt (Regulation der Affinität der GAF-Domänen) beeinflusst.

Die Ergebnisse des Einflusses der Phosphorylierung und des N-Terminus auf die Aktivität und Affinität der PDE11/CyaB1-Chimäre lassen folgendes Modell entstehen:

Der 196 ASn lange N-Terminus der PDE11A4 scheint die Bindung von cGMP an die GAF-Domänen zu behindern, sowie die Aktivität des katalytischen Zentrums herabzusetzen. Zum einen könnte dies durch ein Umklappen des N-Terminus auf die GAF-Domänen und die katalytische Domäne geschehen. Durch die Behinderung der cGMP-Bindung ist die Affinität der GAF-Domänen geringer, der EC_{50} -Wert entsprechend hoch. Außerdem wird das katalytische Zentrum beeinflusst. Zum anderen könnte der N-Terminus die GAF-Domänen gegen das katalytische Zentrum drücken, wodurch die Katalyse erschwert wird, die Basalaktivität nimmt ab.

Zwei verschiedene Mechanismen können dafür sorgen, dass der N-Terminus die GAF-Domänen und auch die katalytische Domäne freigibt. Durch eine Phosphorylierung von Ser-162 entfernt sich der N-Terminus von den GAF-Domänen, die Affinität für cGMP nimmt zu, da die GAF-Domänen nun besser zugänglich sind.

Durch das Verkürzen des N-Terminus durch eine Protease nimmt zunächst die Basalaktivität zu, entweder durch eine verringerte Wechselwirkung des N-Terminus mit dem katalytischen Zentrum ab oder dadurch, dass die GAF-Domänen nicht mehr gegen das katalytische Zentrum gedrückt werden. In den verkürzten Chimären kommt es möglicherweise zu einer Fehlfaltung des N-terminalen Bereichs, wodurch der Zugang für cGMP an die GAF-Domänen weiter erschwert wird und die Affinität abnimmt. Eine Fehlfaltung könnte ebenfalls eine Begründung dafür sein, dass es durch die Phosphorylierung der verkürzten Proteine zu keiner Affinitätserhöhung kommt, da ein Wegklappen des N-Terminus von den GAF-Domänen trotz Phosphorylierung nicht möglich ist. Sobald eine kritische Länge des N-Terminus unterschritten ist, kommt es zu keiner Wechselwirkung zwischen N-Terminus und GAF-Domänen bzw. katalytischer Domäne, wodurch die Affinität der GAF-Domänen für cGMP deutlich zunimmt ebenso wie die Basalaktivität.

Das Modell soll neben den genannten Mechanismen beschreiben, wie die GAF-Domänen und die katalytische Domäne zueinander angeordnet sein könnten. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die regulatorischen und katalytischen Domänen in sich abgeschlossene Bereiche sind, die über flexible Linker miteinander verbunden sind. Dadurch ist eine Anordnung in zwei Ebenen möglich, die GAF-Domänen liegen ober- oder unterhalb der katalytischen Domäne und können durch eine Konformationsänderung die Eigenschaften der katalytischen Domäne beeinflussen. Dieser modulare Aufbau ist auch daher wahrscheinlich, weil der Austausch der GAF-Domänen zwischen verschiedenen Enzymfamilien möglich war.

Für einen einheitlichen Aufbau des Homodimers der Tandem GAF-Domänen spricht die Tatsache, dass in den PDE GAFs die Ligandenbindung in GAF-A oder -B erfolgen kann, aber auch an beide GAF-Domänen [35, 73, 75, 80, 87]. Zudem sind Aufbau und Lage der Bindungstaschen nicht leicht vergleichbar, obwohl und selbst bei Austausch längerer Bereiche mit veränderter Spezifität die Fähigkeit zur Signalweiterleitung erhalten bleibt [88]. Aufgrund dessen kann man schließen, dass die Signalweiterleitung über die Konformationsänderung eines größeren Bereichs erfolgt. So ist von einem einheitlichen Gesamtaufbau des GAF-Tandems auszugehen.

5.3 Erst die Strukturaufklärung der PDE11 GAF-Domänen wird deren genauen Aufbau zeigen

Erste Versuche zur Kristallisation der PDE11A4 GAF-Domänen wurden hier unternommen. Bei der Planung der Kristallisationskonstrukte wurde auf die Daten bereits kristallisierter GAF-Domänen zurückgegriffen [73, 80, 82, 83]. Nur vier der Konstrukte ließen sich vernünftig exprimieren, reinigen und somit für die Kristallisation verwenden (4.4). Da es keine reproduzierbare Kristallisation gab, stellt sich die Frage, wie hier weiter zu verfahren ist. Weiter untersucht werden sollten Konstrukte ab Pro-187 im pQE80-Vektor, einmal mit und einmal ohne TEV-Schnittstelle zwischen His-Tag und Start der PDE11-Sequenz. Dafür, dass diese Proteine noch kristallisieren werden spricht, dass sie sich hervorragend exprimieren und reinigen lassen und dass sie kurz vor der α 1-Helix der GAF-A starten. Eine vergleichbare Länge haben bereits kristallisierte Proteine [73, 80, 111]. Das Scheitern der Kristallisationsversuche wird kaum am Aufbau dieser Proteine liegen. Einer möglichen Störung durch den N-terminalen His-Tag kann die Entfernung durch die TEV-Protease entgegenwirken.

Für die Kristallisation sollten zwei Parameter variiert werden: die Zusammensetzung des Lagerpuffers und die Zahl der Bedingungen. Zur Stabilisierung des Proteins wurden 10% Glycerin zugesetzt. Dies ist möglicherweise zu hoch, da das Protein durch Glycerin in der Lösung so stabilisiert wird, dass es nicht kristallisieren kann. Auch der pH-Wert könnte noch in Richtung des isoelektrischen Punktes gesenkt werden. Die Zahl der zu testenden Kristallisationsbedingungen kann deutlich erhöht werden. Da so zahlreiche Parameter die Kristallisation beeinflussen, müssen viele verschiedene Puffer verwendet werden, um eine möglichst große Zahl an Bedingungen abzudecken. Die rund 200 Bedingungen der hier verwendeten Kits werden nicht ausreichen. Um das Ansetzen der Platten mit 1000-2000 verschiedenen Puffer ermöglichen zu können, wird man auf den Einsatz eines Pipettierroboters angewiesen sein. Trotz oder gerade wegen der noch nicht gelungenen Kristallisation der PDE11A4 GAF-Domänen sollen Überlegungen zum möglichen Aufbau des GAF-Tandems angestellt werden. Die Nukleotidbindung erfolgt wahrscheinlich nur über GAF-A (4.1.3).

Die GAF-A wird zudem an der Dimerisierung beteiligt sein. Strukturvorhersagen und Sequenzvergleiche sagen den Beginn der α 1-Helix für Position Lys-197 voraus (Abb. 4-61). In der mPDE2 ist die α 1-Helix essentiell für die Dimerisierung [73]. Eine PDE11/CyaB1-Chimäre, die erst mit der darauf folgenden AS beginnt, also deren α 1-Helix nicht mehr vollständig ist, kann nicht aktivieren (4.1.5.3). Das zeigt, dass die α 1-Helix und damit die GAF-A der PDE11A4 für die Signalweiterleitung und die Dimerisierung erforderlich ist.

Über die Funktion der GAF-B lässt sich nichts Genaues sagen. Das GAF-A Konstrukt hat zwar gezeigt, dass die GAF-B für die Stimulation des katalytischen Zentrums erforderlich ist (4.1.3.4). Ob aber die GAF-B die Dimerisierung vermittelt oder nur generell für die Ausbildung der Struktur, die die Signalweiterleitung ermöglicht, zuständig ist, kann nicht gesagt werden.

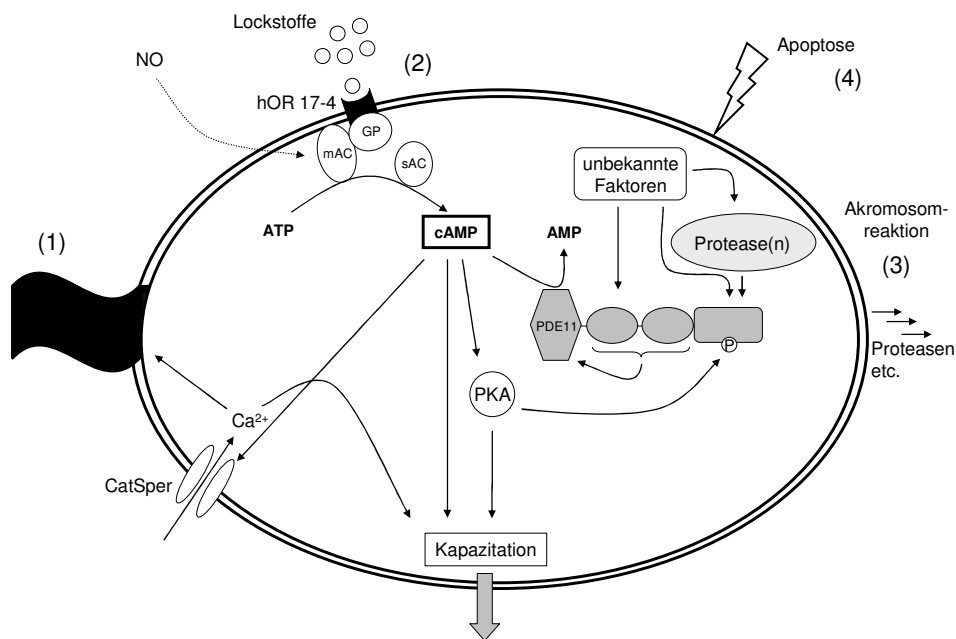
5.4 Mögliche (patho-)physiologische Funktionen der PDE11

Die möglichen (patho-)physiologischen Funktionen der PDE11 lassen sich anhand des Gewebevorkommens herleiten. Das Vorkommen in Hoden [45, 48, 50, 54], Spermatozoen [48], benignem und malignem Prostatagewebe [44, 45, 50, 51, 53], sowie die Untersuchung von PDE11^{-/-}-Mäusen [48] lässt auf eine Beteiligung an der Spermatogenese und der Proliferation von (malignem) Prostatagewebe schließen.

Die Anzahl an Spermatozoen, denen es möglich ist, eine Eizelle zu befruchten ist verschwindend gering. Das liegt daran, dass zunächst pro einer Million ejakulierter Spermatozoen nur eines in

den Eileiter gelangt. Von diesen Spermatozoen können wiederum nur solche die Kumulus-Schicht durchdringen, die den Prozess der Kapazitation²⁶ durchlaufen haben und dadurch befähigt sind, auf Chemotaxis zu reagieren und somit von den Lockstoffen zum Ei geführt werden. Sie binden an den Spermienrezeptor auf der Oberfläche und führen die Akrosomreaktion durch [115]: Durch die Akrosomreaktion werden u. a. proteolytische Enzyme aus der Spitze des Kopfbereiches der Spermatozoen, dem sog. Akrosom, freigesetzt, die es schließlich ermöglichen, dass die Spermatozoen die *Zona pellucida* (Glashaut) durchdringen und in die Eizelle gelangen können.

Bei der Kapazitation, also der Reaktion, die letztendlich die Voraussetzung für eine Befruchtung ist, spielen cyclische Nukleotide und somit auch PDEn eine wichtige Rolle. Die Kapazitation wird u. a. über cAMP vermittelt. Der olfaktorische Rezeptor hOR17-4 wird z. B. über den Lockstoff Bourgeonal aktiviert und stimuliert sAC und mAC. Das gebildete cAMP öffnet den Ca²⁺-Kanal *CatSper*, es kommt zu einem verstärkten Ca²⁺-Einstrom, der die Zelle depolarisiert und dadurch das notwendige Aktionspotential für die Einleitung der Kapazitation erzeugt [9]. Darüber hinaus kann die Kapazitation auch über die Phosphorylierung verschiedener Proteine, durch eine PKA-aktivierte Tyrosinkinase oder direkt durch cAMP ausgelöst werden [116] (Abb. 5-1).



Vorwärtsbewegung (1), Chemotaxis (2), Akrosomreaktion (3), Apoptose (4) etc.

Abb. 5-1: Einfluss der PDE11A4 bei der Kapazitationsreaktion; der besseren Übersichtlichkeit wegen wurde nur die cAMP-Kaskade eingezeichnet, der cGMP-Weg ist im Text beschrieben; eine Vereinfachung ist zudem, dass das dargestellte Spermatozoon bereits zur Chemotaxis befähigt ist; die PDE11 ist vom C-terminalen zum N-terminalen Ende gezeichnet; GP: G-Protein; mAC: membrangebundene AC; sAC: lösliche AC; hOR 17-4: olfaktorischer Rezeptor; CatSper: Ca²⁺-Kanal; in Anlehnung an [48]

Durch die Kapazitationsreaktion wird auch die Apoptose der entsprechenden Spermatozoen eingeleitet. Dadurch ist die Lebenszeit kapazitierter Spermatozoen sehr kurz (1-4h). Der cAMP-Abbau durch die PDE11 verringert somit die Zahl kapazitierter Spermatozoen, wodurch das Fertilisationspotential höher gehalten wird, da Kapazitationsreaktionen in zu großer Zahl zu einer geringen Anzahl lebendiger ejakulierter Spermien führen. Das Fertilisationspotential

²⁶ Kapazitation: die Kapazitation ist eine Reifung der Spermatozoen, aus der die volle Befruchtungsfähigkeit der männlichen Gameten resultiert

korreliert neben der Motilität und Spermienkonzentration auch direkt mit dem Anteil an lebenden bzw. nichtkapazitierten Spermien bei der Ejakulation [48] und somit mit der Aktivität der PDE11. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Aktivität der PDE11A4 auch in Hodengewebe verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegt, kann davon ausgegangen werden, dass die PDE11 an der Spermatogenese beteiligt ist, da dieser Prozess einer sehr feinen Regulation mit strengen Kontrollen unterliegt.

Dies zeigen Untersuchungen von PDE11^{-/-}-Mäusen: diese führen vermehrt die Kapazitationsreaktion und somit auch die Apoptose der kapazitierten Spermatozoen durch und haben dadurch eine geringere Anzahl lebendiger Spermien [48]. PDE11^{-/-}-Mäuse sind allerdings nicht steril, sondern nur weniger fruchtbar, im Gegensatz zu *CatSper*^{-/-}- und *sAC*^{-/-}- Mäusen, die steril sind. Vor diesem Hintergrund können PDE11-, aber auch *CatSper*- und *sAC*-Hemmer theoretisch zur Empfängnisverhütung eingesetzt werden.

Durch den cGMP-Abbau kann die PDE11 die Spermatogenese über die Motilität der Spermatozoen beeinflussen. Die membranassoziierte Guanylatcyclase auf dem Flagellum ist ein Chemotaxisrezeptor. Durch Lockstoffe wie Asterosap beim Sternfisch *Asterias amurensis* oder Resact beim Seeigel *Arbacia punctulata* wird diese bis zu 25x aktiviert [117, 118]. Der Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration aktiviert einen K⁺-selektiven cN-gesteuerten Kanal und der K⁺-Ausstrom führt zur Hyperpolarisation der Zelle. Die Hyperpolarisation wiederum aktiviert sogenannte hyperpolarisationsaktivierte Kanäle, die durch cN gesteuert werden. Der folgende Na⁺-Einstrom depolarisiert T-Typ Ca²⁺-Kanäle. Die steigende Ca²⁺-Konzentration durch den Ca²⁺-Einstrom sorgt für den Flagellenschlag und somit für eine verstärkte Motilität der Spermien in Richtung der Lockstoffe [115].

Eine erhöhte PDE11-Aktivität im Flagellum [47] verringert also die Motilität der Spermatozoen und somit ihr Fertilisationspotential.

Ob die PDE5-Hemmer Sildenafil und Tadalafil über eine schwache Hemmung der PDE11 die Spermatogenese beeinflussen, ist nicht eindeutig geklärt, da widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden. Während bei Sildenafilanwendung häufig eine erhöhte Motilität der Spermien nachgewiesen wurde, gibt es für Tadalafil Studien, die von einer verringerten [119] oder einer erhöhten Spermienmotilität [120] sprechen.

Eine Beteiligung der PDE11 an der Proliferation von Prostatagewebe ist aufgrund des Vorkommens der PDE11 in der Prostata und der Bedeutung cyclischer Nukleotide bei Proliferationsvorgängen gut vorstellbar. Die antiproliferative Wirkung von cAMP und cGMP wurde bereits mehrfach beschrieben. Erhöhte cN-Spiegel, sei es durch PDE-Hemmer [57, 121, 122] oder NO-Donoren [123], hemmen das Gewebewachstum, möglicherweise durch eine verringerte DNA-Synthese, wie bei der vaskulären glatten Muskulatur nachgewiesen [124].

Das Vorkommen der PDE11 in glandulären Strukturen der Prostata, in der periurethralen Mantelzone [51, 53] und in malignem Prostatagewebe [50] sprechen für eine Beteiligung an der Pathogenese von BPH, LUTS (*lower urinary tract symptoms*) und Prostatakarzinom. Die periurethrale Mantelzone umgibt die Harnröhre zwischen *Colliculus* und Harnblasenhals und ist bei der BPH stark vergrößert. Der Nachweis von NO, cGMP, PKG-1 [125] und auch der PDE11 [53] in dieser Zone machen es sehr wahrscheinlich, dass die Proliferation auch hier über die NO/cGMP-Signalkaskade vermittelt wird. Eine Hemmung der PDE11 könnte zu einer cGMP-Akkumulation führen und somit antiproliferativ wirken.

Auch eine Behandlung des Prostatakarzinoms mit PDE11-Inhibitoren wäre theoretisch möglich. Dass auch die Proliferation malignen Prostatagewebes über niedrige cGMP-Level vermittelt wird, haben Sun et al. gezeigt, indem sie über verstärkte cGMP-Synthese durch Gabe die GC-Aktivatoren ANP und LANP (*long acting natriuretic peptide*) die Enzyme ERK-1 und -2 gehemmt haben, deren Kaskaden letztlich zur Proliferation führen [126]. Die Tatsache, dass es sich bei PDE11 um eine Dualsubstrat-PDE handelt, untermauert zudem die These, dass die PDE11 die Proliferation, die über cAMP und cGMP vermittelt wird, beeinflusst. Ebenso spricht

die Regulation der PDE11 in benignem und malignem Prostatagewebe dafür, dass der PDE11 in der Prostata eine physiologische Funktion wie die Beeinflussung der Proliferation zukommt. Dass die PDE11 prinzipiell an der Proliferation beteiligt ist, zeigten Untersuchungen, bei denen eine Dysregulation des cAMP-Signaling, verursacht durch Mutationen im PDE11A Gen, zu endokrinen Tumoren führen kann [56].

5.5 Ein Blick in die Zukunft der PDE-Forschung

Die Forschung auf dem Gebiet der PDEn ist in den letzten Jahren intensiviert worden. Dem Grundlagenforscher bietet sich ein weites Feld, für die Industrie stellen sie, spätestens seit dem kommerziellen Erfolg der PDE5 Hemmer, potentielle Angriffspunkte für Pharmaka dar. Warum sind PDEn derart interessante Drug-Targets (vgl. [4])? Zunächst einmal sind, wie bereits erwähnt, die über 50 verschiedenen Isoformen an unterschiedlichen physiologischen Vorgängen beteiligt, bedingt durch die spezifische Gewebe- und subzelluläre Verteilung. Durch die Entwicklung isoformspezifischer Inhibitoren ließen sich äußerst selektive Wirkungen erzielen. Vorteilhaft ist zudem die relativ geringe Konzentration der PDE-Substrate in der Zelle (<1 bis 10 μ M), d.h. ein kompetitiver Inhibitor konkurriert nur mit einer geringen Menge an endogenem Substrat (im Vergleich dazu konkurrieren z. B. Kinaseinhibitoren oder auch AC-Hemmer mit ATP im millimolaren Bereich). Zuletzt spricht auch ein allgemeines pharmakologisches Prinzip für den Einsatz von PDE-Inhibitoren. Dieses besagt, dass die Regulierung des Abbaus von Liganden und *second messengern* zumeist schneller und in einem größeren Umfang zu einer Änderung der Konzentration führt als die Beeinflussung der Synthese. Das trifft umso zu, wenn V_{\max} des abbauenden Enzyms größer ist als V_{\max} des Syntheseenzym. In nahezu allen Geweben ist die PDE-Aktivität um mindestens eine Größenordnung höher als die AC/GC-Aktivität.

Die Entwicklung von PDE-Inhibitoren geht nun schneller voran, da die ersten Kristallstrukturen katalytischer Domänen bekannt sind (PDE1B, 3B, 4B, 4D, 5, 7, 9, 10) [127, 128]. Durch die Auflösung der Kristallstruktur ganzer Holoenzyme ließe sich die Spezifität der Inhibitoren weiter verbessern. Zudem könnten Kenntnisse, die bereits über die Funktion der regulatorischen Domänen gewonnen werden konnten sind, mit in die Entwicklung einfließen.

Nun zu einigen konkreten Anwendungsgebieten potentieller PDE-Inhibitoren. Diese liegen vor allem im Bereich der ZNS-, Herz-Kreislauf-, Urogenital- und obstruktiven Atemwegserkrankungen.

Am genauesten untersucht wurden neben der erektilen Dysfunktion weitere mögliche Erkrankungen, v. a. des Herz-Kreislaufsystems, die mit PDE5-Hemmern behandelt werden können. Auf dem Markt ist Sildenafil unter dem Handelsnamen Revatio[®] zur Behandlung des pulmonalen arteriellen Bluthochdrucks [24, 25]. Bei herzinsuffizienten Patienten führen kardiale Hypertrophie und Remodeling über die Apoptoseeinleitung zu einem Absterben der Kardiomyocyten und dadurch zu einer weiteren Schwächung des Herzens. U. a. werden Hypertrophie und Remodeling durch erhöhte cGMP-Spiegel verursacht. Die Aktivierung der im Myocard exprimierten PDE5 führt zu einer Verringerung des cGMP-Spiegels [129].

Erste präklinische Daten existieren für eine mögliche Behandlung der benignen Prostatahyperplasie und der *lower urinary tract symptoms* (LUTS) mit PDE5-Hemmern. Zum einen wird die PDE5 in Geweben des unteren Harntraktes exprimiert. Zum anderen inhibieren PDE5-Hemmer die Proliferation humaner prostaticher Stromazellen über den bereits beschriebenen Mechanismus (5.4). PDE5-Hemmer induzierten eine signifikante Relaxation des Gewebes. Dies führte zu einer Dekompression des Harnleiters und somit zu einem erleichterten Wasserlassen [57].

Im Fokus der PDE-Forschung steht zur Zeit die Untersuchung der PDEn im ZNS, da sich dort die Möglichkeit der Beeinflussung mannigfacher physiologischer Vorgänge durch Hemmung der

PDEn, v. a. PDE4 und PDE10, bietet. So ist z. B. bekannt, dass PDE4 an Lernprozessen beteiligt ist [130, 131]. Zudem scheint sie an der Entstehung der Schizophrenie [132], sowie von Depressionen [133] beteiligt zu sein. Auch wenn es noch keine konkreten Wirkstoffkandidaten gibt, so wird doch zumindest an Verfahren gearbeitet, die ein schnelleres Auffinden von PDE4-Inhibitoren ermöglichen sollen [134]. Erschwert wird die Suche nach geeigneten Inhibitoren durch die Tatsache, dass diese Therapeutika die Blut-Hirn-Schranke überwinden müssen.

Auf einem ähnlichen Stand ist die Erforschung der PDE10, die fast ausschließlich im Gehirn vorkommt. Eine Behandlung der Schizophrenie durch einen PDE10 Inhibitor ist denkbar [135]. Etwas weiter ist man bei der Behandlung von Alzheimer mittels eines PDE9-Inhibitors. Erste *in vitro* Studien zeigten ermutigende Ergebnisse [136]. Bei den anderen PDEn ist man größtenteils noch bei der Aufklärung physiologischer Funktionen. Aber erste Hinweise deuten auf ein breites Spektrum an Funktionen der anderen PDEn hin, so dass das Gebiet der potentiellen Anwendungsmöglichkeiten noch ausgeweitet werden kann.

5.6 Offene Fragen und Ausblick

Diese Arbeit hat zahlreiche neue Erkenntnisse zur Funktion und Regulation der PDE11 und ihrer GAF-Domänen gebracht, die die PDE11-Forschung teilweise in eine neue Richtung stoßen und die auch Impulse für die Untersuchung anderer PDEn geben. Die Zahl der zu beantwortenden Fragen ist somit eher größer geworden.

Zunächst gibt es noch einiges zur Struktur der PDE11A4 GAF-Domänen zu klären. Eine endgültige Aussage über die Bindung des cGMP an die GAF-Domänen, sowie die dreidimensionale Struktur des GAF-Tandems lässt sich nur mit Hilfe der Kristallstruktur machen. Andere Bedingungen und bessere Methoden werden nötig sein, um die Struktur aufzuklären. Durch die Struktur des Holoenzym ließe sich zudem zeigen, wie die Signalweiterleitung von den GAF-Domänen zur katalytischen Domäne einer PDE abläuft und wie der N-Terminus die Funktion der GAF-Domänen beeinflusst. Es wäre außerdem interessant zu sehen, ob die Stimulation des katalytischen Zentrums durch die GAF-Domänen zu einer vermehrten Umsetzung eines seiner beiden Substrate führt, oder ob cAMP und cGMP stärker abgebaut werden. Sollte die Stimulation durch die GAF-Domänen spezifisch für eines der beiden cN sein, so wäre es interessant, den Mechanismus dieser Diskriminierung aufzuklären.

Die Funktion der anderen PDE11-Spleißvarianten ist ebenfalls zu klären. Fest steht lediglich, dass die verkürzte GAF-A Domäne der PDEn 11A2 und A3 kein cyclisches Nukleotid binden kann und es auch zu keiner Stimulation der katalytischen Domäne über cGMP kommt. Falls eine Regulation durch die verkürzten GAF-Domänen dieser Spleißvarianten existiert, so muss die Art der Regulation und deren Mechanismus noch aufgedeckt werden.

Neben der Aufklärung der Kristallstruktur sind die bedeutendsten Fragen in Bezug auf die Feinregulation der PDE11A4 zu beantworten. Das Vorkommen, die Funktionen und Eigenschaften der Abbauprodukte nach dem Proteaseverdau sind unbekannt. Außerdem sind die Proteasen, die für diesen Verdau verantwortlich sind, zu identifizieren und zu charakterisieren. Auch bleibt die Suche nach einer Protease, die die PDE11A4 zwischen den Positionen Ala-169 und Glu-177 schneidet, um somit zu einer deutlich erhöhten Affinität der GAF-Domänen für cGMP zu führen. Falls die Phosphorylierung des PDE11A4 N-Terminus noch weitere Auswirkungen hat, als eine Affinitätserhöhung der GAF-Domänen, so sind diese nicht bekannt und müssen, ebenso wie eine mögliche Regulation der Phosphorylierung untersucht werden.

Einige Fragestellungen, die das Holoenzym betreffen, waren zwar nicht Bestandteil dieser Arbeit, sind aber dahingehend von Interesse, dass sie die hier präsentierten Ergebnisse in ein entsprechendes Gesamtbild einfügen können. Wie einleitend erwähnt, ist die Untersuchung der Gewebeverteilung der PDE11-Isoformen nicht abgeschlossen. Darauf aufbauend ließe sich das

intrazelluläre Verhalten der PDE11 untersuchen, also subzelluläre Lokalisation und Wanderung, Interaktion mit anderen Proteinen und abschließend natürlich physiologische Funktionen der PDE11 in den einzelnen Geweben und Zellkompartimenten.

Schlussendlich ist noch die Übertragbarkeit der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen auf das Holoenzym in der Zelle kritisch zu hinterfragen und zu untersuchen. Da hier nur mit einer Chimäre aus Proteinen unterschiedlicher Organismen gearbeitet wurde, kann nicht mit Sicherheit behauptet werden, dass diese Bedingungen auch für das Holoenzym *in vivo* gelten. Auch die Versuche bezüglich der posttranslationalen Modifikationen fanden unter Bedingungen statt, die nicht unbedingt in der Zelle vorherrschen müssen. Aber da Forschungsergebnisse nicht mehr als eine Annäherung an die Realität im Rahmen der technischen Möglichkeiten sein können, zeigen die hier dargestellten Ergebnisse und aufgestellten Theorien den Weg auf, den die Forschung der PDE11-Familie gehen wird.

6 Zusammenfassung

Hier wurde die Funktion des Tandem-GAF-Ensembles der PDE11A4 untersucht. Als Ligand an die GAF-Domänen wurde das cyclische Nucleotid cGMP gefunden. Dies war möglich, da sich durch die Schaffung eines speziellen Testsystems im Gegensatz zum Holoenzym Ligand und Substrat voneinander unterscheiden. Der Einbau des N-terminalen Bereichs der PDE11A4 in die cyanobakterielle Adenylatcyclase CyaB1 erzeugte ein hochempfindliches Testsystem, das die Charakterisierung der PDE11A4 GAF-Domänen und seines N-Terminus durch Messung der enzymatischen Aktivität der Adenylatcyclase ermöglichte.

Die Bindung des Liganden erfolgte mit geringer Affinität und sorgte für eine bis zu vierfache Stimulation des katalytischen Zentrums. Die nähere Charakterisierung der GAF-Domänen zeigte, dass GAF-A cGMP bindet und für die Dimerisierung notwendig ist, während für die GAF-B nachgewiesen werden konnte, dass diese keine cGMP bindet, aber für die Ausbildung einer Struktur, die die Signalweiterleitung ermöglicht, essentiell ist.

Durch Modifikationen ließ sich die Affinität der GAF-Domänen für cGMP erhöhen. Zum einen durch eine Phosphorylierung eines Serinrestes durch PKG (Ser-162), zum anderen durch eine Proteolyse im Bereich des N-Terminus. Die Phosphorylierung an Ser-162 führte zu einer bis zu vierfachen Affinität der GAF-Domänen für cGMP, während die Phosphorylierung der zweiten Phosphorylierungsstelle im N-Terminus, Ser-117, keinen mit diesem Testsystem messbaren Effekt zeigte.

Die imitierte Proteolyse des N-Terminus durch N-terminal verkürzte PDE11A4/CyaB1-Chimären führte zu einer zehn- bis zwanzigfach erhöhten Affinität, wenn mehr als 168 Aminosäuren des N-Terminus entfernt wurden. Eine Untersuchung auf ein Vorkommen dieser Proteolyse *in vivo* ergab, dass durch das Umsetzen des N-terminalen Bereichs der PDE11A4 mit Homogenaten verschiedener Gewebe eine spezifische Proteolyse stattfand. Spezifisch, da erstens diese Umsetzung bisher nur in humanen Geweben nachgewiesen werden konnte und zweitens der Schnitt lediglich an zwei Positionen innerhalb des N-Terminus erfolgte. Eine massenspektrometrische Analyse zeigte, dass sich die Schnittstellen nahe den beiden Phosphorylierungsstellen lagen. Allerdings entsprachen die Längen der entstandenen Fragmente nicht denen der N-terminalen Bereiche der Chimären mit erhöhter Affinität. Daher ist von einer anderen Funktion als der Erhöhung der Affinität der GAF-Domänen für cGMP auszugehen.

7 Anhang

7.1 PDE11 Holoenzym

7.1.1 DNA- und Proteinsequenz

s. 7.2

7.1.2 Kinetische Parameter

Isoenzym	cGMP	cAMP	Untersuchte Inhibitoren	Ref.
hsPDE11A1	$K_m = 0,52 \pm 0,34 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 3,9 \text{ pmol/min}/\mu\text{g}$	$K_m = 1,04 \pm 0,23 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 3,6 \text{ pmol/min}/\mu\text{g}$ $V_{\max} (A/G) = 0,92$	IBMX $IC_{50} = 49,8 \mu\text{M}$ (cGMP) Zaprinast $IC_{50} = 12,0 \mu\text{M}$ (cGMP) Dipyridamol $IC_{50} = 0,37 \mu\text{M}$ (cGMP)	[44]
hsPDE11A2	$K_m = 3,7 \mu\text{M}$	$K_m = 3,3 \mu\text{M}$ $V_{\max} (A/G) = 1,0$	Zaprinast $IC_{50} = 28 \mu\text{M}$ Dipyridamol $IC_{50} = 1,8 \mu\text{M}$ Sildenafil $IC_{50} > 0,5 \mu\text{M}$	[89]
hsPDE11A3	$K_m = 4,2 \mu\text{M}$	$K_m = 5,7 \mu\text{M}$ $V_{\max} (A/G) = 1,0$	Zaprinast $IC_{50} = 5 \mu\text{M}$ Dipyridamol $IC_{50} = 0,82 \mu\text{M}$	
hsPDE11A3	$K_m = 1,5 \pm 0,07 \mu\text{M}$	$K_m = 3,0 \pm 0,28 \mu\text{M}$ $V_{\max} (A/G) = 2,4$		[45]
hsPDE11A4	$K_m = 1,4 \pm 0,06 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 120 \pm 4,6$ pmol/min/ μg	$K_m = 3,0 \pm 0,26 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 270 \pm 28$ pmol/min/ μg $V_{\max} (A/G) = 2,2$		
hsPDE11A4	$K_m = 0,97 \mu\text{M}$	$K_m = 2,4 \mu\text{M}$ $V_{\max} (A/G) = 4 \text{ bis } 10$	Dipyridamol $IC_{50} = 0,84 \pm 0,22 \mu\text{M}$ Tadalafil $IC_{50} = 0,073 \pm 0,003 \mu\text{M}$ Sildenafil $IC_{50} = 3,8 \pm 0,75 \mu\text{M}$ Vardenafil $IC_{50} = 0,84 \pm 0,16 \mu\text{M}$	[106]

7.1.3 Posttranslationale Modifikationen [137]

<u>Asn-Glykolisierung</u>	<u>Myristilierung</u>	<u>Phosphorylierung</u>	<u>Caseinkinase 2</u>
79 <u>NGSA</u>	69 <u>GSSVGG</u>	Proteinkinase A	4 <u>SRLD</u>
134 <u>NRTY</u>	75 <u>GTGPNG</u>	RRA ¹¹⁷ <u>S</u>	13 <u>TFLD</u>
472 <u>NNSI</u>	89 <u>GGDCG</u>	Proteinkinase G	106 <u>SRGD</u>
487 <u>NISD</u>	104 <u>GSRGD</u>	RKA ¹⁶² <u>S</u>	117 <u>SQKE</u>
559 <u>NNTI</u>	245 <u>GAAAGK</u>	Proteinkinase C	136 <u>TYDE</u>
755 <u>NLSS</u>	337 <u>GVAQAI</u>	65 <u>TCR</u>	188 <u>TAID</u>
901 <u>NRSK</u>	348 <u>GAPFTE</u>	117 <u>SQK</u>	270 <u>SSTE</u>
<u>Amidierung</u>	367 <u>GIAISN</u>	142 <u>TSR</u>	331 <u>SDGE</u>
248 <u>AGKK</u>	483 <u>GLPVNI</u>	151 <u>SVR</u>	352 <u>TEDD</u>
<u>Cell Attachment</u>	555 <u>GLGINN</u>	222 <u>SYK</u>	379 <u>SRKE</u>
<u>(RGD)</u>	710 <u>GTNNAF</u>	379 <u>SRK</u>	401 <u>TDLE</u>
107 <u>RGD</u>	720 <u>GSALAQ</u>	446 <u>SPK</u>	456 <u>SFKE</u>
	728 <u>GTSATL</u>	456 <u>SFK</u>	465 <u>SYSD</u>
		653 <u>TVR</u>	474 <u>SIAE</u>
		757 <u>SSK</u>	588 <u>SKAE</u>
		900 <u>TNR</u>	690 <u>TEVE</u>
		Tyrosinkinase	757 <u>SSKE</u>
		KESMEKSS ⁴⁵⁸ <u>Y</u>	792 <u>SKGE</u>
			813 <u>TACD</u>
			903 <u>SKWE</u>

7.2 DNA- und Proteinsequenzen

7.2.1 PDE11A4

gi: 15128482

Acc.nb.: BAB62712

gene ID (PDE11A): 50940

												bp	AS	
atg	gca	gcc	tcc	cgc	ctg	gac	ttc	ggg	gag	gtg	gaa	act	39	
M	A	A	S	R	L	D	F	G	E	V	E	T		13
ttc	ctg	gac	agg	cac	cca	gag	ttg	ttt	gaa	gat	tac	ttg	78	
F	L	D	R	H	P	E	L	F	E	D	Y	L		26
atg	cgg	aag	ggg	aag	cag	gag	atg	ggt	gaa	aag	tgg	ctg	117	
M	R	K	G	K	Q	E	M	V	E	K	W	L		39
cag	agg	cac	agt	cag	ggt	cag	ggg	gct	tta	ggt	cca	agg	156	
Q	R	H	S	Q	G	Q	G	A	L	G	P	R		52
ccc	tct	ttg	gct	ggt	acc	agc	agc	ttg	gct	cac	agc	acc	195	
P	S	L	A	G	T	S	S	L	A	H	S	T		65
tgc	aga	ggt	ggc	agc	agc	ggt	ggt	ggt	ggc	act	gga	cca	234	
C	R	G	G	S	S	V	G	G	G	T	G	P		78
aat	ggc	tct	gcc	cac	agc	cag	ccc	ctt	ccc	ggt	ggc	ggg	273	
N	G	S	A	H	S	Q	P	L	P	G	G	G		91
gac	tgt	ggt	ggg	ggt	ccc	ttg	agt	ccc	agc	tgg	gcc	ggt	312	
D	C	G	G	V	P	L	S	P	S	W	A	G		104
ggc	agc	agg	ggc	gat	ggg	aac	ctg	cag	cgg	aga	gct	tct	351	
G	S	R	G	D	G	N	L	Q	R	R	A	S		117
cag	aaa	gag	cta	agg	aag	agt	ttt	gcc	cgc	tcc	aag	gcc	390	
Q	K	E	L	R	K	S	F	A	R	S	K	A		130
atc	cac	gtg	aac	agg	acc	tac	gat	gaa	cag	gtg	acc	tcc	429	
I	H	V	N	R	T	Y	D	E	Q	V	T	S		143

cgg	gct	cag	gaa	ccc	ctg	agt	agt	gtg	cga	cgg	agg	gca	468	
R	A	Q	E	P	L	S	S	V	R	R	R	A	156	
ctt	ctc	cgg	aag	gca	agc	tcc	ctg	ccc	ccc	acc	aca	gcc	507	
L	L	R	K	A	S	S	L	P	P	T	T	A	169	
cat	att	ctc	agt	gcg	ctg	ctg	gaa	tcg	aga	gtg	aat	ctg	546	
H	I	L	S	A	L	L	E	S	R	V	N	L	182	
cct	cag	tat	ccc	cct	aca	gcc	atc	gac	tac	aag	tgc	cat	585	
P	Q	Y	P	P	T	A	I	D	Y	K	C	H	195	
ctg	aaa	aag	cat	aat	gag	cgt	cag	ttc	ttt	ctg	gaa	ttg	624	
L	K	K	H	N	E	R	Q	F	F	L	E	L	208	
gtc	aaa	gat	atc	tcc	aat	gac	ctt	gac	ctc	acc	agc	ctg	663	
V	K	D	I	S	N	D	L	D	L	T	S	L	221	
agc	tac	aag	att	ctc	atc	ttt	gtc	tgc	ctt	atg	gtg	gat	702	
S	Y	K	I	L	I	F	V	C	L	M	V	D	234	
gct	gac	cgc	tgc	tct	ctt	ttc	ctg	gtg	gaa	ggg	gca	gct	741	
A	D	R	C	S	L	F	L	V	E	G	A	A	247	
gct	ggc	aag	aag	acc	ttg	gtc	tcc	aaa	ttc	ttt	gat	gtg	780	
A	G	K	K	T	L	V	S	K	F	F	D	V	260	
cat	gca	gga	acc	cct	ctg	ctg	cct	tgc	agc	agc	aca	gag	819	
H	A	G	T	P	L	L	P	C	S	S	T	E	273	
aac	tca	aat	gag	gtg	cag	gtc	ccc	tgg	ggc	aaa	ggt	atc	858	
N	S	N	E	V	Q	V	P	W	G	K	G	I	286	
att	ggc	tat	gtc	ggg	gag	cat	gga	gaa	acg	gtc	aac	att	897	
I	G	Y	V	G	E	H	G	E	T	V	N	I	299	
cct	gat	gcc	tac	cag	gat	cga	cga	ttc	aat	gat	gaa	atc	936	
P	D	A	Y	Q	D	R	R	F	N	D	E	I	312	
gac	aag	cta	act	gga	tac	aag	aca	aaa	tca	tta	ttg	tgc	975	
D	K	L	T	G	Y	K	T	K	S	L	L	C	325	
atg	cct	atc	cga	agc	agt	gat	ggt	gag	att	att	ggt	gtg	1014	
M	P	I	R	S	S	D	G	E	I	I	G	V	338	
gcc	caa	gcg	ata	aat	aag	att	cct	gaa	gga	gct	cca	ttt	1053	
A	Q	A	I	N	K	I	P	E	G	A	P	F	351	
act	gaa	gat	gat	gaa	aaa	gtt	atg	cag	atg	tat	ctt	cca	1092	
T	E	D	D	E	K	V	M	Q	M	Y	L	P	364	
ttt	tgt	gga	atc	gcc	ata	tct	aac	gct	cag	ctc	ttt	gct	1131	
F	C	G	I	A	I	S	N	A	Q	L	F	A	377	
gcc	tca	agg	aaa	gaa	tat	gaa	aga	agc	aga	gct	ttg	cta	1170	
A	S	R	K	E	Y	E	R	S	R	A	L	L	390	
gag	gtg	gtt	aat	gac	ctc	ttt	gaa	gaa	cag	act	gac	ctg	1209	
E	V	V	N	D	L	F	E	E	Q	T	D	L	403	
gag	aaa	att	gtc	aag	aaa	ata	atg	cat	cgg	gcc	caa	act	1248	
E	K	I	V	K	K	I	M	H	R	A	Q	T	416	
ctg	ctg	aaa	tgt	gaa	cgc	tgt	tcc	gtt	tta	ctc	cta	gag	1287	
L	L	K	C	E	R	C	S	V	L	L	L	E	429	
gac	atc	gaa	tca	cca	gtg	gtg	aaa	ttt	acc	aaa	tcc	ttt	1326	
D	I	E	S	P	V	V	K	F	T	K	S	F	442	
gaa	ttg	atg	tcc	cca	aag	tgc	agt	gct	gat	gct	gag	aac	1365	
E	L	M	S	P	K	C	S	A	D	A	E	N	455	
agt	ttc	aaa	gaa	agc	atg	gag	aaa	tca	tca	tac	tcc	gac	1404	
S	F	K	E	S	M	E	K	S	S	Y	S	D	468	
tgg	cta	ata	aat	aac	agc	att	gct	gag	ctg	gtt	gct	tca	1443	
W	L	I	N	N	S	I	A	E	L	V	A	S	481	
aca	ggc	ctt	cca	gtg	aac	atc	agt	gat	gcc	tac	cag	gat	1482	
T	G	L	P	V	N	I	S	D	A	Y	Q	D	494	
ccg	cgc	ttt	gat	gca	gag	gca	gac	cag	ata	tct	ggt	ttt	1521	
P	R	F	D	A	E	A	D	Q	I	S	G	F	507	
cac	ata	aga	tct	gtt	ctt	tgt	gtc	cct	att	tgg	aat	agc	1560	
H	I	R	S	V	L	C	V	P	I	W	N	S	520	
aac	cac	caa	ata	att	gga	gtg	gct	caa	gtg	tta	aac	aga	1599	
N	H	Q	I	I	G	V	A	Q	V	L	N	R	533	
ctt	gat	ggg	aaa	cct	ttt	gat	gat	gca	gat	caa	cga	ctt	1638	

L	D	G	K	P	F	D	D	A	D	Q	R	L	546
ttt	gag	gct	ttt	gtc	atc	ttt	tgt	gga	ctt	ggc	atc	aac	1677
F	E	A	F	V	I	F	C	G	L	G	I	N	559
aac	aca	att	atg	tat	gat	caa	gtg	aag	aag	tcc	tgg	gcc	1716
N	T	I	M	Y	D	Q	V	K	K	S	W	A	572
aag	cag	tct	gtg	gct	ctt	gat	gtg	cta	tca	tac	cat	gca	1755
K	Q	S	V	A	L	D	V	L	S	Y	H	A	585
aca	tgt	tea	aaa	gct	gaa	gtt	gac	aag	ttt	aag	gca	gcc	1794
T	C	S	K	A	E	V	D	K	F	K	A	A	598
aac	atc	cct	ctg	gtg	tca	gaa	ctt	gcc	atc	gat	gac	att	1833
N	I	P	L	V	S	E	L	A	I	D	D	I	611
cat	ttt	gat	gac	ttt	tct	ctc	gac	gtt	gat	gcc	atg	atc	1872
H	F	D	D	F	S	L	D	V	D	A	M	I	624
aca	gct	gct	ctc	cgg	atg	ttc	atg	gag	ctg	ggg	atg	gta	1911
T	A	A	L	R	M	F	M	E	L	G	M	V	637
cag	aaa	ttt	aaa	att	gac	tat	gag	aca	ctg	tgt	agg	tgg	1950
Q	K	F	K	I	D	Y	E	T	L	C	R	W	650
ctt	ttg	aca	gtg	agg	aaa	aac	tat	cgg	atg	gtt	tta	tac	1989
L	L	T	V	R	K	N	Y	R	M	V	L	Y	663
cac	aac	tgg	aga	cat	gcc	ttc	aac	gtg	tgt	Q	L	M	2028
H	N	W	R	H	A	F	N	V	C	gac	att	ctg	676
cag	ctg	atg	ttc	gcg	atg	tta	acc	act	gct	ggg	ttt	caa	2067
F	A	M	L	T	T	A	G	F	Q	D	I	L	689
acc	gag	gtg	gaa	att	tta	gcg	gtg	att	gtg	gga	tgc	ctg	2106
T	E	V	E	I	L	A	V	I	V	G	C	L	702
tgt	cat	gac	ctc	gac	cac	agg	gga	acc	aac	aat	gcc	ttc	2145
C	H	D	L	D	H	R	G	T	N	N	A	F	715
caa	gct	aag	agt	ggc	tct	gcc	ctg	gcc	caa	ctc	tat	gga	2184
Q	A	K	S	G	S	A	L	A	Q	L	Y	G	728
acc	tct	gct	acc	ttg	gag	cat	cac	cat	ttc	aac	cac	gcc	2223
T	S	A	T	L	E	H	H	H	F	N	H	A	741
gtg	atg	atc	ctt	caa	agt	gag	ggt	cac	aat	atc	ttt	gct	2262
V	M	I	L	Q	S	E	G	H	N	I	F	A	754
aac	ctg	tcc	tcc	aag	gaa	tat	agt	gac	ctt	atg	cag	ctt	2301
N	L	S	S	K	E	Y	S	D	L	M	Q	L	767
ttg	aag	cag	tca	ata	ttg	gca	aca	gac	ctc	acg	ctg	tac	2340
L	K	Q	S	I	L	A	T	D	L	T	L	Y	780
ttt	gag	agg	aga	act	gaa	ttc	ttt	gaa	ctt	gtc	agt	aaa	2379
F	E	R	R	T	E	F	F	E	L	V	S	K	793
gga	gaa	tac	gat	tgg	aac	atc	aaa	aac	cat	cgt	gat	ata	2418
G	E	Y	D	W	N	I	K	N	H	R	D	I	806
ttt	cga	tea	atg	tta	atg	aca	gcc	tgt	gac	ctt	gga	gcc	2457
F	R	S	M	L	M	T	A	C	D	L	G	A	819
gtg	acc	aaa	ccg	tgg	gag	atc	tcc	aga	cag	gtg	gca	gaa	2496
V	T	K	P	W	E	I	S	R	Q	V	A	E	832
ctt	gta	acc	agt	gag	ttc	ttc	gaa	caa	gga	gat	cgg	gag	2535
L	V	T	S	E	F	F	E	Q	G	D	R	E	845
aga	tta	gag	ctc	aaa	ctc	act	cct	tca	gca	att	ttt	gat	2574
R	L	E	L	K	L	T	P	S	A	I	F	D	858
cgg	aac	cgg	aag	gat	gaa	ctg	cct	cgg	ttg	caa	ctg	gag	2613
R	N	R	K	D	E	L	P	R	L	Q	L	E	871
tgg	att	gat	agc	atc	tgc	atg	cct	ttg	tat	cag	gca	ctg	2652
W	I	D	S	I	C	M	P	L	Y	Q	A	L	884
gtg	aag	gtc	aac	gtg	aaa	ctg	aag	ccg	atg	cta	gat	tca	2691
V	K	V	N	V	K	L	K	P	M	L	D	S	897
gta	gct	aca	aac	aga	agt	aag	tgg	gaa	gag	cta	cac	caa	2730
V	A	T	N	R	S	K	W	E	E	L	H	Q	910
aaa	cga	ctg	ctg	gcc	tca	act	gcc	tca	tcc	tcc	tcc	cct	2769
K	R	L	L	A	S	T	A	S	S	S	S	P	923
gcc	agt	gtt	atg	gta	gcc	aag	gaa	gac	agg	aac	taa		2805
A	S	V	M	V	A	K	E	D	R	N	.		934

7.2.2 PDE11A3

gi: 63253296

Acc.nb.: BAB62713

gene ID (PDE11A): 50940

Sequenz bis zur Übereinstimmung mit PDE11A4

atg	ctg	aag	cag	gca	aga	aga	cct	tta	ttc	aga	aat	gtg	39	AS
M	L	K	Q	A	R	R	P	L	F	R	N	V	13	
ctc	agt	gcc	aca	cag	tgg	aaa	aag	gtg	aaa	atc	aca	aga	78	
L	S	A	T	Q	W	K	K	V	K	I	T	R	26	
ctg	gtc	caa	atc	tct	ggg	gcc	tct	ttg	gct	gaa	aaa	cag	117	
L	V	Q	I	S	G	A	S	L	A	E	K	Q	39	
gaa	aag	cac	cag	gat	tft	ctt	ata	cag	agg	caa	aca	aaa	156	
E	K	H	Q	D	F	L	I	Q	R	Q	T	K	52	
aca	aag												162	
T	K												54	

7.2.3 CyaB1

gi: 15553050

Acc.nb.: BAA13998

gene ID (CyaB1): 1105863

atg	act	ctt	ccc	aat	cct	ggt	agc	gtt	ttg	gct	tcg	tta	39	AS
M	T	L	P	N	P	G	S	V	L	A	S	L	13	
aca	gaa	ctg	act	caa	gtt	aat	cgt	acc	cac	gct	tta	ttg	78	
T	E	L	T	Q	V	N	R	T	H	A	L	L	26	
cgt	cgg	gtc	aaa	gac	ctt	tct	ggt	aac	gaa	tft	gtt	tgc	117	
R	R	V	K	D	L	S	V	N	E	F	V	C	39	
ttg	cta	gac	ttt	atc	act	gcc	gaa	tft	caa	caa	tft	ctc	156	
L	L	D	F	I	T	A	E	F	Q	Q	F	L	52	
aga	gca	att	gaa	ctc	att	aat	aat	gaa	gct	cta	gaa	aat	195	
R	A	I	E	L	I	N	N	E	A	L	E	N	65	
atg	ttg	gag	aaa	gtg	ttg	gaa	gca	att	aca	ctg	aaa	atc	234	
M	L	E	K	V	L	E	A	I	T	L	K	I	78	
ggt	caa	att	ctc	caa	gca	gaa	cat	aca	gcc	att	ttc	tta	273	
G	Q	I	L	Q	A	E	H	T	A	I	F	L	91	
Gtt	gac	tat	gat	aaa	tgt	caa	tta	tgg	tca	aaa	gta	ccc	312	
V	D	Y	D	K	C	Q	L	W	S	K	V	P	104	
caa	gat	aat	ggg	cag	aaa	tft	tta	gaa	att	cgt	act	ccc	351	
Q	D	N	G	Q	K	F	L	E	I	R	T	P	117	
att	act	gta	gga	att	cct	ggt	cat	gtt	gct	agt	aca	ggt	390	
I	T	V	G	I	P	G	H	V	A	S	T	G	130	
caa	tat	tta	aat	atc	tca	gaa	act	gct	act	cat	cct	ttg	429	
Q	Y	L	N	I	S	E	T	A	T	H	P	L	143	
tft	agc	cca	gaa	tta	gag	aga	caa	atg	ggc	tat	aag	att	468	
F	S	P	E	L	E	R	Q	M	G	Y	K	I	156	
aat	aat	att	tta	tgt	atg	cct	gtc	gtt	agt	agc	aaa	gat	507	
N	N	I	L	C	M	P	V	V	S	S	K	D	169	
caa	att	gtc	gca	gta	gta	caa	tta	gct	aat	aag	aca	gga	546	
Q	I	V	A	V	V	Q	L	A	N	K	T	G	182	

aat	ata	ccc	ttc	aat	cga	aat	gat	gaa	gag	tct	ttt	cgt	585	
N	I	P	F	N	R	N	D	E	E	S	F	R	195	
gat	ttt	gct	gct	tct	att	ggg	att	att	tta	gaa	acc	tgt	624	208
D	F	A	A	S	I	G	I	I	L	E	T	C	208	
caa	tct	ttt	tat	gtt	gca	gct	cgc	aat	caa	cgg	gga	gtc	663	221
Q	S	F	Y	V	A	A	R	N	Q	R	G	V	221	
aca	gca	ctt	tta	cgc	gct	act	caa	aca	cta	ggg	caa	agt	702	234
T	A	L	L	R	A	T	Q	T	L	G	Q	S	234	
tta	gat	tta	gag	gct	act	ttg	caa	ata	gtg	atg	gaa	caa	741	247
L	D	L	E	A	T	L	Q	I	V	M	E	Q	247	
gcc	cga	att	ttg	atg	cag	gca	gac	cgc	agc	aca	tta	ttt	780	260
A	R	I	L	M	Q	A	D	R	S	T	L	F	260	
ctg	tat	cgc	aaa	gaa	atg	ggc	gaa	ctc	tgg	act	aaa	gta	819	273
L	Y	R	K	E	M	G	E	L	W	T	K	V	273	
gca	gca	gca	gca	gat	acc	aca	cag	tta	ata	gaa	att	cgg	858	286
A	A	A	A	D	T	T	Q	L	I	E	I	R	286	
att	ccg	gcg	aat	cgc	ggt	att	gtc	ggc	tat	gtg	gca	tct	897	299
I	P	A	N	R	G	I	V	G	Y	V	A	S	299	
aca	ggc	gat	gcg	ctg	aat	atc	tct	gat	gct	tat	aaa	gac	936	312
T	G	D	A	L	N	I	S	D	A	Y	K	D	312	
ccc	cgg	ttt	gat	cca	aca	aca	gac	aga	aaa	aca	ggc	tat	975	325
P	R	F	D	P	T	T	D	R	K	T	G	Y	325	
ttg	acc	aga	aat	att	ttg	tgt	ttg	cca	gtc	ttt	aat	tca	1014	338
L	T	R	N	I	L	C	L	P	V	F	N	S	338	
gcc	aat	gaa	ttg	atc	gga	gta	aca	cag	tta	att	aat	aag	1053	351
A	N	E	L	I	G	V	T	Q	L	I	N	K	351	
caa	caa	gga	agt	ttt	acg	gct	tct	gat	gaa	gag	ttt	atg	1092	364
Q	Q	G	S	F	T	A	S	D	E	E	F	M	364	
cgg	gct	ttt	aat	att	caa	gcc	gga	ggt	gct	tta	gaa	aat	1131	377
R	A	F	N	I	Q	A	G	V	A	L	E	N	377	
gct	cgt	tta	ttt	gaa	aat	gta	tta	cta	gaa	aaa	caa	tat	1170	390
A	R	L	F	E	N	V	L	L	E	K	Q	Y	390	
caa	aaa	gac	att	tta	caa	agc	ttg	tca	gat	gct	gta	att	1209	403
Q	K	D	I	L	Q	S	L	S	D	A	V	I	403	
tct	aca	gat	atg	gcc	ggg	aga	att	gtc	aca	att	aat	gat	1248	416
S	T	D	M	A	G	R	I	V	T	I	N	D	416	
gca	gcc	ttg	gaa	tta	ctc	ggt	tgt	cct	tta	ggt	gat	gct	1287	429
A	A	L	E	L	L	G	C	P	L	G	D	A	429	
aat	cat	aaa	agt	aat	aag	ctg	ctg	tgg	gaa	caa	aat	tta	1326	442
N	H	K	S	N	K	L	L	W	E	Q	N	L	442	
att	ggt	cgc	gta	gtt	tgg	gaa	att	gta	cca	att	gaa	aat	1365	455
I	G	R	V	V	W	E	I	V	P	I	E	N	455	
ttg	cag	atg	cgc	tta	gaa	gat	agt	tta	aaa	agt	ggt	gct	1404	468
L	Q	M	R	L	E	D	S	L	K	S	G	A	468	
aaa	cat	tat	gtg	cca	gaa	caa	agt	ttg	ata	gtg	gga	att	1443	481
K	H	Y	V	P	E	Q	S	L	I	V	G	I	481	
tat	caa	tta	caa	atg	tct	gaa	agt	cgg	ggt	ttg	cat	gaa	1482	494
Y	Q	L	Q	M	S	E	S	R	V	L	H	E	494	
act	caa	gac	tac	tct	att	ttg	aca	gta	cgc	gat	cgc	atc	1521	507
T	Q	D	Y	S	I	L	T	V	R	D	R	I	507	
aac	cca	gat	att	ttt	ctc	ccc	tgg	aat	tta	ccc	caa	acc	1560	520
N	P	D	I	F	L	P	W	N	L	P	Q	T	520	
ccc	cag	tcg	caa	ttt	atc	acc	ccg	gaa	gaa	gta	caa	atc	1599	533
P	Q	S	Q	F	I	T	P	E	E	V	Q	I	533	
tta	gaa	cgc	agt	att	aat	ctt	acc	ggt	aat	cct	ttg	acg	1638	546
L	E	R	S	I	N	L	T	V	N	P	L	T	546	
aac	cca	gaa	ggc	ggt	gtc	cgt	ggt	ggt	ttg	gta	ggt	ttg	1677	559
N	P	E	G	G	V	R	G	G	L	V	V	L	559	
gaa	gat	att	agt	caa	gag	aag	cgc	ctc	aaa	act	act	atg	1716	572
E	D	I	S	Q	E	K	R	L	K	T	T	M	572	
tat	cgc	tac	ctt	aca	ccc	cat	gta	gct	gaa	cag	gta	atg	1755	

Y	R	Y	L	T	P	H	V	A	E	Q	V	M	585
gct	tta	ggg	gaa	gat	gcc	tta	atg	ggt	ggt	gaa	cgc	aag	1794
A	L	G	E	D	A	L	M	V	G	E	R	K	598
gag	gtg	act	gtt	tta	ttt	tca	gat	atc	cga	ggc	tac	acc	1833
E	V	T	V	L	F	S	D	I	R	G	Y	T	611
aca	ctt	acg	gaa	aat	cta	ggt	gcg	gct	gaa	gtg	gta	tca	1872
T	L	T	E	N	L	G	A	A	E	V	V	S	624
ctc	ctg	aac	caa	tat	ttt	gaa	aca	atg	ggt	gaa	gca	ggt	1911
L	L	N	Q	Y	F	E	T	M	V	E	A	V	637
ttc	aac	tat	gaa	ggc	aca	ctg	gat	aaa	ttt	atc	ggt	gat	1950
F	N	Y	E	G	T	L	D	K	F	I	G	D	650
gct	tta	atg	gct	gtt	ttt	ggt	gcg	cca	cta	cca	ctc	aca	1989
A	L	M	A	V	F	G	A	P	L	P	L	T	663
gaa	aat	cat	gct	tgg	caa	gca	gta	cag	tca	gca	tta	gat	2028
E	N	H	A	W	Q	A	V	Q	S	A	L	D	676
atg	cgc	caa	cgc	ctg	aag	gaa	ttt	aac	caa	cga	cgc	atc	2067
M	R	Q	R	L	K	E	F	N	Q	R	R	I	689
att	cag	gca	caa	cca	caa	atc	aaa	atc	ggt	att	ggt	att	2106
I	Q	A	Q	P	Q	I	K	I	G	I	G	I	702
agt	tct	gga	gaa	gta	gtt	tct	ggt	aac	atc	ggt	tct	cac	2145
S	S	G	E	V	V	S	G	N	I	G	S	H	715
aag	cgt	atg	gat	tac	aca	gtc	att	ggt	gat	ggt	gtg	aat	2184
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	2223
L	S	S	R	L	E	T	V	T	K	E	Y	G	741
tgt	gat	att	atc	ctc	agt	gag	ttt	act	tac	caa	tta	tgc	2262
C	D	I	I	L	S	E	F	T	Y	Q	L	C	754
agc	gat	cgc	att	tgg	gta	cgf	cag	tta	gat	aaa	atc	cga	2301
S	D	R	I	W	V	R	Q	L	D	K	I	R	767
gtc	aaa	ggg	aaa	cac	caa	gct	gtc	aat	atc	tat	gag	ttg	2340
V	K	G	K	H	Q	A	V	N	I	Y	E	L	780
att	agc	gat	cgc	agt	act	ccc	tta	gat	gac	aac	acc	caa	2379
I	S	D	R	S	T	P	L	D	D	N	T	Q	793
gag	ttc	ctc	ttt	cac	tat	cat	aat	ggt	cgg	act	gcc	tac	2418
E	F	L	F	H	Y	H	N	G	R	T	A	Y	806
tta	gtc	cgc	gat	ttt	acc	cag	gcg	atc	gct	tgt	ttt	aac	2457
L	V	R	D	F	T	Q	A	I	A	C	F	N	819
tca	gct	aaa	cat	att	cga	ccc	aca	gac	caa	gct	gtc	aat	2496
S	A	K	H	I	R	P	T	D	Q	A	V	N	832
att	cac	cta	gaa	cgc	gcc	tac	aat	tat	caa	caa	act	cca	2535
I	H	L	E	R	A	Y	N	Y	Q	Q	T	P	845
cca	cct	cct	caa	tgg	gac	ggc	gta	tgg	aca	att	ttc	aca	2574
P	P	P	Q	W	D	G	V	W	T	I	F	T	858
aag	tag												2580
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. Lipkin, D., Cook, W. H. & Markham, R. (1959) Adenosine-3': 5'-phosphoric Acid: A Proof of Structure, *J Am Chem Soc.* 81, 6198-6203.
3. 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.
4. Bender, A. T. & Beavo, J. A. (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use, *Pharmacol Rev.* 58, 488-520.
5. Krebs, E. G. & Beavo, J. A. (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes, *Annu Rev Biochem.* 48, 923-59.
6. Finn, J. T., Grunwald, M. E. & Yau, K. W. (1996) Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions, *Annu Rev Physiol.* 58, 395-426.
7. Diamond, J. (1978) Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction, *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 9, 327-40.
8. Fung, B. K., Hurley, J. B. & Stryer, L. (1981) Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78, 152-6.
9. Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L. & Clapham, D. E. (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility, *Nature.* 413, 603-9.
10. Dugan, L. L., Kim, J. S., Zhang, Y., Bart, R. D., Sun, Y., Holtzman, D. M. & Gutmann, D. H. (1999) Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf, *J Biol Chem.* 274, 25842-8.
11. 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.
12. 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.
13. Richter, W. (2002) 3',5' Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: members, structure, and catalytic mechanism, *Proteins.* 46, 278-86.
14. Jin, S. L., Swinnen, J. V. & Conti, M. (1992) Characterization of the structure of a low Km, rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase. Mapping of the catalytic domain, *J Biol Chem.* 267, 18929-39.

15. Turko, I. V., Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1998) Hydropathic analysis and mutagenesis of the catalytic domain of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). cGMP versus cAMP substrate selectivity, *Biochemistry*. 37, 4200-5.
16. 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.
17. Omori, K. & Kotera, J. (2007) Overview of PDEs and their regulation, *Circ Res*. 100, 309-27.
18. Corbin, J. D. & Francis, S. H. (1999) Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil, *J Biol Chem*. 274, 13729-32.
19. Ballard, S. A., Gingell, C. J., Tang, K., Turner, L. A., Price, M. E. & Naylor, A. M. (1998) Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes, *J Urol*. 159, 2164-71.
20. Rosen, R. C. & Kostis, J. B. (2003) Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction, *Am J Cardiol*. 92, 9M-18M.
21. Corbin, J. D. (2004) Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction, *Int J Impot Res*. 16 Suppl 1, S4-7.
22. 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.
23. Carson, C. C. & Lue, T. F. (2005) Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction, *BJU Int*. 96, 257-80.
24. Ghofrani, H. A., Wiedemann, R., Rose, F., Schermuly, R. T., Olschewski, H., Weissmann, N., Gunther, A., Walmrath, D., Seeger, W. & Grimminger, F. (2002) Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial, *Lancet*. 360, 895-900.
25. Lewis, G. D. & Semigran, M. J. (2004) Type 5 phosphodiesterase inhibition in heart failure and pulmonary hypertension, *Curr Heart Fail Rep*. 1, 183-9.
26. Lipworth, B. J. (2005) Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Lancet*. 365, 167-75.
27. Timmer, W., Leclerc, V., Birraux, G., Neuhauser, M., Hatzelmann, A., Bethke, T. & Wurst, W. (2002) The new phosphodiesterase 4 inhibitor roflumilast is efficacious in exercise-induced asthma and leads to suppression of LPS-stimulated TNF-alpha ex vivo, *J Clin Pharmacol*. 42, 297-303.
28. Antoniu, S. A. (2006) Roflumilast for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease, *Curr Opin Investig Drugs*. 7, 412-7.

29. Rennard, S. I., Schachter, N., Streck, M., Rickard, K. & Amit, O. (2006) Cilomilast for COPD: results of a 6-month, placebo-controlled study of a potent, selective inhibitor of phosphodiesterase 4, *Chest*. 129, 56-66.
30. Laguna, M. S., Kornblihtt, L. I., Marta, R. F., Michiels, J. J. & Molinas, F. C. (2000) Effectiveness of anagrelide in the treatment of symptomatic patients with essential thrombocythemia, *Clin Appl Thromb Hemost*. 6, 157-61.
31. Meanwell, N. A., Pearce, B. C., Roth, H. R., Smith, E. C., Wedding, D. L., Wright, J. J., Buchanan, J. O., Baryla, U. M., Gamberdella, M., Gillespie, E. & et al. (1992) Inhibitors of blood platelet cAMP phosphodiesterase. 2. Structure-activity relationships associated with 1,3-dihydro-2H-imidazo[4,5-b]quinolin-2-ones substituted with functionalized side chains, *J Med Chem*. 35, 2672-87.
32. Torras-Llort, M. & Azorin, F. (2003) Functional characterization of the human phosphodiesterase 7A1 promoter, *Biochem J*. 373, 835-43.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Shakur, Y., Holst, L. S., Landstrom, T. R., Movsesian, M., Degerman, E. & Manganiello, V. (2001) Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 66, 241-77.
39. Huston, E., Beard, M., McCallum, F., Pyne, N. J., Vandenabeele, P., Scotland, G. & Houslay, M. D. (2000) The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 is cleaved downstream of its SH3 interaction domain by caspase-3. Consequences for altered intracellular distribution, *J Biol Chem*. 275, 28063-74.
40. 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.

41. 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.
42. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nussbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., LeHoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature.* 409, 860-921.
43. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001) The sequence of the human genome, *Science.* 291, 1304-51.
44. 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.
45. Yuasa, K., Kotera, J., Fujishige, K., Michibata, H., Sasaki, T. & Omori, K. (2000) Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression, *J Biol Chem.* 275, 31469-79.
46. Makhlof, A., Kshirsagar, A. & Niederberger, C. (2006) Phosphodiesterase 11: a brief review of structure, expression and function, *Int J Impot Res.* 18, 501-9.
47. 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.

48. Wayman, C., Phillips, S., Lunny, C., Webb, T., Fawcett, L., Baxendale, R. & Burgess, G. (2005) Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology, *Int J Impot Res.* *17*, 216-23.
49. Yuasa, K., Ohgaru, T., Asahina, M. & Omori, K. (2001) Identification of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A (PDE11A): comparison of rat and human PDE11A splicing variants, *Eur J Biochem.* *268*, 4440-8.
50. D'Andrea, M. R. Q., Y. Haynes-Johnson, D. Bhattacharjee, S. Kraft, P. and Lundeen, S. (2005) Expression of PDE11A in normal and malignant human tissues, *J Histochem Cytochem.* *53*, 895-903.
51. Loughney, K., Taylor, J. & Florio, V. A. (2005) 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues, *Int J Impot Res.* *17*, 320-5.
52. Baxendale, R. W., Wayman, C. P., Turner, L. & Phillips, S. C. (2001) Cellular localization of phosphodiesterase type 11 (PDE11) in human corpus cavernosum and the contribution of PDE11 inhibition on the nerve stimulated relaxation, *J Urol.* *165(Suppl)*, 340.
53. Uckert, S., Oelke, M., Stief, C. G., Andersson, K. E., Jonas, U. & Hedlund, P. (2006) Immunohistochemical distribution of cAMP- and cGMP-phosphodiesterase (PDE) isoenzymes in the human prostate, *Eur Urol.* *49*, 740-5.
54. Baxendale, R. W., Burslem, F. & Phillips, S. C. (2001) Phosphodiesterase type 11 (PDE11) cellular localization: progress towards defining a physiological role in testis and/or reproduction, *J Urol.* *165 (Suppl)*, 340.
55. Uckert, S., Oelke, M., Hedlund, P. Z., Ellinghaus, P., Stief, C., Bischoff, E. & Jonas, U. (2004) Detection of phosphodiesterase isozymes 1, 2, 10 and 11 in the human clitoris by means of molecular biology and immunohistochemistry, *Eur Urol Suppl.* *3(2)*, 64.
56. Horvath, A., Boikos, S., Giatzakis, C., Robinson-White, A., Groussin, L., Griffin, K. J., Stein, E., Levine, E., Delimpasi, G., Hsiao, H. P., Keil, M., Heyerdahl, S., Matyakhina, L., Libe, R., Fratticci, A., Kirschner, L. S., Cramer, K., Gaillard, R. C., Bertagna, X., Carney, J. A., Bertherat, J., Bossis, I. & Stratakis, C. A. (2006) A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia, *Nat Genet.* *38*, 794-800.
57. Tinel, H., Stelte-Ludwig, B., Hutter, J. & Sandner, P. (2006) Pre-clinical evidence for the use of phosphodiesterase-5 inhibitors for treating benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms, *BJU Int.* *98*, 1259-63.
58. Wong, M. L., Whelan, F., Deloukas, P., Whittaker, P., Delgado, M., Cantor, R. M., McCann, S. M. & Licinio, J. (2006) Phosphodiesterase genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant treatment response, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *103*, 15124-9.
59. Aravind, L. & Ponting, C. P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins, *Trends Biochem Sci.* *22*, 458-9.

60. 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.
61. Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. & Koonin, E. V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems, *FEMS Microbiol Lett.* 203, 11-21.
62. Galperin, M. Y. (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective, *Environ Microbiol.* 6, 552-67.
63. Korska, I. & Bock, A. (1997) Characterization of *fhlA* mutations resulting in ligand-independent transcriptional activation and ATP hydrolysis, *J Bacteriol.* 179, 41-5.
64. 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.
65. Mateos, J. L., Luppi, J. P., Ogorodnikova, O. B., Sineshchekov, V. A., Yanovsky, M. J., Braslavsky, S. E., Gartner, W. & Casal, J. J. (2006) Functional and biochemical analysis of the N-terminal domain of phytochrome A, *J Biol Chem.* 281, 34421-9.
66. 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.
67. Diaz-Benjumea, R., Laxman, S., Hinds, T. R., Beavo, J. A. & Rascon, A. (2006) Characterization of a novel cAMP-binding, cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase (TcrPDEB1) from *Trypanosoma cruzi*, *Biochem J.* 399, 305-14.
68. Johner, A., Kunz, S., Linder, M., Shakur, Y. & Seebeck, T. (2006) Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of *Leishmania major*, *BMC Microbiol.* 6, 25.
69. Charbonneau, H., Prusti, R. K., LeTrong, H., Sonnenburg, W. K., Mullaney, P. J., Walsh, K. A. & Beavo, J. A. (1990) Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 288-92.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.

74. 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.
75. 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.
76. Okada, D. & Asakawa, S. (2002) Allosteric activation of cGMP-specific, cGMP-binding phosphodiesterase (PDE5) by cGMP, *Biochemistry.* 41, 9672-9.
77. Corbin, J. D., Blount, M. A., Weeks, J. L., 2nd, Beasley, A., Kuhn, K. P., Ho, Y. S., Saidi, L. F., Hurley, J. H., Kotera, J. & Francis, S. H. (2003) [3H]sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP, *Mol Pharmacol.* 63, 1364-72.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. Kobe de Oliveira, S., Hoffmeister, M., Gambaryan, S., Mueller-Esterl, W., Guimaraes, J. A. & Smolenski, A. P. (2007) Phosphodiesterase 2A forms a complex with the CO-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor, *J Biol Chem.* 282, 13637-13647.
82. Levдикov, V. M., Blagova, E., Joseph, P., Sonenshein, A. L. & Wilkinson, A. J. (2006) The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria, *J Biol Chem.* 281, 11366-73.
83. Liu, J., Huang, C., Shin, D. H., Yokota, H., Jancarik, J., Kim, J. S., Adams, P. D., Kim, R. & Kim, S. H. (2005) Crystal structure of a heat-inducible transcriptional repressor HrcA from *Thermotoga maritima*: structural insight into DNA binding and dimerization, *J Mol Biol.* 350, 987-96.
84. Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T. & Vierstra, R. D. (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome, *Nature.* 438, 325-31.
85. Kanacher, T. (2003) *Die Adenylatcyclase Cyb1 aus Anabaena sp. PCC 7120 ist ein cAMP-sensitives Protein.*, Dissertation der Universität Tübingen.

86. Bruder, S. (2006) *cAMP- und cGMP-bindende Tandem-GAF-Domänen – Biochemische Untersuchungen mit einer cyanobakteriellen Adenylatcyclase*, Dissertation der Universität Tübingen.
87. 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.
88. Linder, J. U., Bruder, S., Schultz, A. & Schultz, J. E. (2007) Changes in purine specificity in tandem GAF chimeras from cyanobacterial *cyaB1* adenylate cyclase and rat phosphodiesterase 2, *Febs J.* 274, 1514-23.
89. Hetman, J. M., Robas, N., Baxendale, R., Fidock, M., Phillips, S. C., Soderling, S. H. & Beavo, J. A. (2000) Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 12891-5.
90. Yuasa, K., Kanoh, Y., Okumura, K. & Omori, K. (2001) Genomic organization of the human phosphodiesterase PDE11A gene. Evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains, *Eur J Biochem.* 268, 168-78.
91. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.* 155, 335-50.
92. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1, 263-73.
93. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 5463-7.
94. Tabor, S. & Richardson, C. C. (1995) A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 6339-43.
95. 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.
96. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227, 680-5.
97. 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.
98. Gultekin, H. & Heermann, K. H. (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix, *Anal Biochem.* 172, 320-9.
99. Salomon, Y., Londos, C. & Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay, *Anal Biochem.* 58, 541-8.

100. Charney, J. & Tomarelli, R. M. (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, *J Biol Chem.* 171, 501-5.
101. Durham, D. R. (1990) The unique stability of *Vibrio proteolyticus* neutral protease under alkaline conditions affords a selective step for purification and use in amino acid-coupling reactions, *Appl Environ Microbiol.* 56, 2277-81.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. Nayak, S., Li, L. & Lee, J. (2003) Enhanced TEV Protease extends enzyme stability for long-term activity, *Focus (Invitrogen Journal).* 25, 12-14.
106. Weeks, J. L., Zoraghi, R., Beasley, A., Sekhar, K. R., Francis, S. H. & Corbin, J. D. (2005) High biochemical selectivity of tadalafil, sildenafil and vardenafil for human phosphodiesterase 5A1 (PDE5) over PDE11A4 suggests the absence of PDE11A4 cross-reaction in patients, *Int J Impot Res.* 17, 5-9.
107. D'Argenio, D. A. & Miller, S. I. (2004) Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger, *Microbiology.* 150, 2497-502.
108. Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikam, D., Huggirat, Y., Benziman, M., de Vroom, E., Fidler, A., de Paus, P., Sliedregt, L. A. & et al. (1990) The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives, *J Biol Chem.* 265, 18933-43.
109. 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.
110. 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.
111. Hofbauer, K. Persönliche Kommunikation.
112. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80.
113. 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.*

114. 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.
115. Eisenbach, M. & Giojalas, L. C. (2006) Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 276-85.
116. Visconti, P. E. & Kopf, G. S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation, *Biol Reprod.* 59, 1-6.
117. Matsumoto, M., Solzin, J., Helbig, A., Hagen, V., Ueno, S., Kawase, O., Maruyama, Y., Ogiso, M., Godde, M., Minakata, H., Kaupp, U. B., Hoshi, M. & Weyand, I. (2003) A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm, *Dev Biol.* 260, 314-24.
118. Bentley, J. K., Tubb, D. J. & Garbers, D. L. (1986) Receptor-mediated activation of spermatozoan guanylate cyclase, *J Biol Chem.* 261, 14859-62.
119. Gresser, U. & Gleiter, C. H. (2002) Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil--review of the literature, *Eur J Med Res.* 7, 435-46.
120. Mostafa, T. (2007) Tadalafil as an in vitro sperm motility stimulant, *Andrologia.* 39, 12-5.
121. Adolfsson, P. I., Ahlstrand, C., Varenhorst, E. & Svensson, S. P. (2002) Lysophosphatidic acid stimulates proliferation of cultured smooth muscle cells from human BPH tissue: sildenafil and papaverin generate inhibition, *Prostate.* 51, 50-8.
122. Cook, A. L. & Haynes, J. M. (2004) Protein kinase G II-mediated proliferative effects in human cultured prostatic stromal cells, *Cell Signal.* 16, 253-61.
123. Guh, J. H., Hwang, T. L., Ko, F. N., Chueh, S. C., Lai, M. K. & Teng, C. M. (1998) Antiproliferative effect in human prostatic smooth muscle cells by nitric oxide donor, *Mol Pharmacol.* 53, 467-74.
124. Yu, S. M., Hung, L. M. & Lin, C. C. (1997) cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway, *Circulation.* 95, 1269-77.
125. Waldkirch, E. S., Uckert, S., Langnase, K., Richter, K., Jonas, U., Wolf, G., Andersson, K. E., Stief, C. G. & Hedlund, P. (2007) Immunohistochemical Distribution of Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase-1 in Human Prostate Tissue, *Eur Urol*, Published online ahead of print on February 12, 2007.
126. Sun, Y., Eichelbaum, E. J., Wang, H. & Vesely, D. L. (2006) Atrial natriuretic peptide and long acting natriuretic peptide inhibit ERK 1/2 in prostate cancer cells, *Anticancer Res.* 26, 4143-8.
127. 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.

128. 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.
129. Takimoto, E., Champion, H. C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E. R., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Wang, Y. & Kass, D. A. (2005) Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy, *Nat Med.* 11, 214-22.
130. Barad, M., Bourtchouladze, R., Winder, D. G., Golan, H. & Kandel, E. (1998) Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 15020-5.
131. Rose, G. M., Hopper, A., De Vivo, M. & Tehim, A. (2005) Phosphodiesterase inhibitors for cognitive enhancement, *Curr Pharm Des.* 11, 3329-34.
132. Millar, J. K., Pickard, B. S., Mackie, S., James, R., Christie, S., Buchanan, S. R., Malloy, M. P., Chubb, J. E., Huston, E., Baillie, G. S., Thomson, P. A., Hill, E. V., Brandon, N. J., Rain, J. C., Camargo, L. M., Whiting, P. J., Houslay, M. D., Blackwood, D. H., Muir, W. J. & Porteous, D. J. (2005) DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling, *Science.* 310, 1187-91.
133. O'Donnell, J. M. & Zhang, H. T. (2004) Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4), *Trends Pharmacol Sci.* 25, 158-63.
134. Card, G. L., Blasdel, L., England, B. P., Zhang, C., Suzuki, Y., Gillette, S., Fong, D., Ibrahim, P. N., Artis, D. R., Bollag, G., Milburn, M. V., Kim, S. H., Schlessinger, J. & Zhang, K. Y. (2005) A family of phosphodiesterase inhibitors discovered by cocrystallography and scaffold-based drug design, *Nat Biotechnol.* 23, 201-7.
135. Siuciak, J. A., Chapin, D. S., Harms, J. F., Lebel, L. A., McCarthy, S. A., Chambers, L., Shrikhande, A., Wong, S., Menniti, F. S. & Schmidt, C. J. (2006) Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis, *Neuropharmacology.* 51, 386-96.
136. Wunder, F., Tersteegen, A., Rebmann, A., Erb, C., Fahrig, T. & Hendrix, M. (2005) Characterization of the first potent and selective PDE9 inhibitor using a cGMP reporter cell line, *Mol Pharmacol.* 68, 1775-81.
137. Bairoch, A., Bucher, P. & Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997, *Nucleic Acids Res.* 25, 217-21.

Meine akademischen Lehrer in Freiburg waren die Damen und Herren Privatdozenten und Professoren

K. Aktories	Pharmakologie und Toxikologie
A. Bechthold	Pharmazeutische Biologie
A. W. Frahm	Pharmazeutische Chemie
P. Gräber	Physikalische Chemie
R. Jackisch	Pharmakologie und Toxikologie
M. Kist	Medizinische Mikrobiologie
M. Kohlhardt	Anatomie und Physiologie
I. Merfort	Pharmazeutische Biologie
D. Meyer	Pharmakologie und Toxikologie
R. Peschka-Süß	Pharmazeutische Technologie
M. Plehn	Geschichte der Pharmazie
H. Rimpler	Pharmazeutische Biologie
Ch. Rücker	Organische Chemie
T. Schirmeister	Pharmazeutische Chemie
V. Schmidt	Physik
R. Schubert	Pharmazeutische Technologie
G. Schulz	Biochemie
K. Starke	Pharmakologie und Toxikologie
B. Szabo	Pharmakologie und Toxikologie
H. Vahrenkamp	Allgemeine und anorganische Chemie
B. Wünsch	Pharmazeutische Chemie

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marco Groß-Langenhoff

Geburtstag: 06.02.1978

Geburtsort: Bocholt, Westfalen

Ausbildung

1984-1988	Ludgeri-Grundschule, Dingden
1988-1997	St. Josefs-Gymnasium, Bocholt
02.06.1997	Abitur
09/1997 – 06/1998	Grundwehrdienst in der Schill-Kaserne, Wesel
10/1998 – 10/2002	Pharmaziestudium an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.
22.03.2001	1. Staatsexamen
14.10.2002	2. Staatsexamen
11/2002 – 04/2003	Pharmaziepraktikum in der Urban Apotheke, Freiburg i. Br.
05/2003 – 10/2003	Pharmaziepraktikum bei F. Hoffmann-La Roche, Basel
09.12.2003	3. Staatsexamen
19.12. 2003	Approbation als Apotheker
02/2004 – 03/2007	Durchführung des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit „Biochemische Charakterisierung der Funktion der GAF-Domänen der Phosphodiesterase 11A4“ am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. J. E. Schultz

