



Institut für Biologische Informationsverarbeitung

*Klonierung, Lokalisierung und funktionelle
Charakterisierung eines zyklisch
Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
aus dem Riechepithel der Ratte*

Mike Reinhard Meyer

***Klonierung, Lokalisierung und funktionelle
Charakterisierung eines zyklisch
Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
aus dem Riechepithel der Ratte***

Mike Reinhard Meyer

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3691

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3691

D 38 (Diss. Univ. Köln, 1999)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

I Inhalt

I	Inhalt	I
II	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle	1
1.2	Funktion und physiologische Bedeutung von CNG-Kanälen	3
1.2.1	Signaltransduktion in Sehzellen von Wirbeltieren	3
1.2.2	Signaltransduktion in Riechzellen von Wirbeltieren	5
1.3	Zielsetzung der Arbeit	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.2	<i>E.coli</i> -Zellkultur	9
2.2.1	Verwendeter Bakterienstamm und Plasmidvektoren	9
2.2.2	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E.coli</i>	10
2.2.3	Anzucht von <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen	10
2.2.3.1	Anzucht von <i>E.coli</i> -Zellen zur Plasmidpräparation	10
2.2.3.2	Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA	10
2.2.3.3	Herstellung von „Mg ²⁺ -Zellen“ zur Infektion mit λ -ZAPII-Phagen-DNA	11
2.2.3.4	Anzucht von <i>E.coli</i> zur Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen	11
2.3	Plasmid-DNA-Präparationen	11
2.3.1	Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)	11
2.3.2	Alkalische LiCl-Minipräparation	12
2.3.3	Alkalische LiCl-Präparation im großen Maßstab	12
2.4	Arbeiten mit λ -ZAPII-Phagen-cDNA-Bibliotheken	13
2.4.1	Titerbestimmung einer λ -ZAPII-Phagen-cDNA-Bibliothek	13
2.4.2	Ausplattieren von λ -ZAPII-Phagen	13
2.4.3	Isolierung von λ -ZAPII-Phagen	14
2.5	Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren	14
2.5.1	Phenol/ Chloroformextraktion	14

2.5.2	Ethanolpräzipitation	14
2.5.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	14
2.5.3.1	Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen	14
2.5.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	15
2.5.4	Trennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	15
2.5.5	DNA-Größen- und Mengenstandard	15
2.5.6	Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen	15
2.6	Manipulation von Nukleinsäuren	16
2.6.1	Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen	16
2.6.2	Modifizierung von DNA-Fragmenten	16
2.6.2.1	Glätten überhängender Einzelstrang-Enden	16
2.6.2.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA	17
2.6.2.3	Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren	17
2.6.3	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	17
2.6.3.1	Ligation	17
2.6.3.2	Transformation von Ligationsprodukten	17
2.7	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren	18
2.7.1	Nachweis von DNA	18
2.7.1.1	Transfer und Immobilisierung von DNA auf Nylonmembranen („Southernblot“)	18
2.7.1.2	Transfer und Immobilisierung von λ -ZAPII-Phagen-DNA	18
2.7.1.3	Transfer von <i>E.coli</i> -DNA auf Membranen	19
2.7.1.4	Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden	19
2.7.1.5	Hybridisierung von immobilisierter DNA mit DNA-Sonden und Autoradiographie	19
2.7.2	Nachweis von RNA	20
2.7.2.1	Trennung von RNA durch Gelelektrophorese	20
2.7.2.2	Transfer von RNA auf Membranen („Northernblot“)	20
2.7.2.3	Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden	21
2.7.2.4	Hybridisierung immobilisierter RNA mit RNA-Sonden	21
2.8	Isolierung von polyadenylierter RNA aus nativen Geweben der Ratte	21
2.9	Synthese von komplementärer DNA (cDNA) mit polyadenylierter RNA als Matrize	22
2.10	Polymerase-Ketten-Reaktion („PCR“)	22

2.10.1	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	22
2.10.2	Bedingungen für die PCR	23
2.10.2.1	PCR mit Plasmid-DNA als Matrize	23
2.10.2.2	Verschachtelte PCR („nested PCR“) mit cDNA als Matrize	23
2.10.2.3	PCR zur Anreicherung seltener 5′-Enden von cDNA („5′-RACE-PCR“)	24
2.10.2.4	Reinigung der PCR-Produkte	25
2.11	DNA-Sequenzierung	25
2.11.1	Sequenzierreaktion	25
2.11.2	PCR zur Sequenzierung	26
2.11.3	Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung	26
2.12	Herstellung und Reinigung von polyklonalen Antikörpern	27
2.12.1	Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen	27
2.12.2	Reinigung von MBP und MBP-Fusionsproteinen durch Amylose-Affinitätschromatographie	27
2.12.3	Reinigung von Domänen aus MBP-Fusionsproteinen durch präparative Spaltung	28
2.12.4	Immunisierung von Kaninchen	28
2.12.5	Reinigung von polyklonalen Antikörpern durch Affinitätschromatographie	28
2.12.6	Test gereinigter Antikörper auf Antigenerkennung	29
2.13	Präparation von heterolog exprimierten Membranproteinen aus HEK 293-Zellen	30
2.14	Präparation von Membranproteinen aus nativen Geweben	30
2.15	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	31
2.15.1	Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)	31
2.15.2	Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz	31
2.16	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	32
2.16.1	Verwendete Proteinmarker für die SDS-PAGE	32
2.16.2	Färben von SDS-PAGE-Gelen mit der Coomassie-Blaufärbung	32
2.17	Transfer von Proteinen auf Membranen und immunologischer Nachweis („Westernblot“)	33
2.18	Immunzytochemische Methoden	33
2.18.1	Präparation von Rinder- und Rattenretinae	33
2.18.2	Präparation von olfaktorischem Epithel	34
2.18.3	Immunzytochemische Färbungen	34

2.19	Heterologe Genexpression in HEK 293-Zellen	35
2.19.1	Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen	35
2.19.2	Transiente Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen	36
2.20	Immunzytochemie an HEK 293-Zellen	37
2.21	Elektrophysiologische Messungen	37
2.22	Fluoreszenzoptischer Nachweis der Ca^{2+} -Aufnahme in HEK 293-Zellen	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Klonierung der $\text{CNC}\alpha 2$ -Untereinheit der Ratte ($\text{rCNC}\alpha 2$)	40
3.1.1	Amplifikation von cDNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion	41
3.1.2	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit	48
3.1.3	Modifizierung der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Sequenz für die heterologe Expression in HEK 293-Zellen	53
3.1.4	Herstellung eines Antikörpers gegen den C-Terminus der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit	58
3.2	Lokalisierung der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit	60
3.2.1	Westernblot-Analysen	60
3.2.2	Immunzytochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten	63
3.3	Funktionelle Charakterisierung der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit	66
3.3.1	Heterologe Expression in HEK 293-Zellen	66
3.3.2	Elektrophysiologische Charakterisierung von $\text{rCNC}\alpha 2$ -Kanälen	68
3.3.2.1	Ligandensensitivität	68
3.3.2.2	Ionenselektivität	71
3.3.2.3	Modulation durch Calmodulin	72
3.3.3	Fluoreszenzoptischer Nachweis der Ca^{2+} -Aufnahme in HEK 293-Zellen nach Transfektion mit pcDNA- $\text{rCNC}\alpha 2\Delta\text{NT}$	74
4	Diskussion und Ausblick	76
4.1	Klonierung der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit	76
4.2	Eigenschaften der heterolog exprimierten $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheiten	79
4.3	Lokalisierung der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit im Riechepithel: Gibt es eine Sub- population von Riechzellen, die cGMP als sekundären Botenstoff verwenden? 81	

5	Zusammenfassung	84
6	Literatur	85
7	Anhang	96
7.1	Hybridisierungsbereiche und Sequenzen der verwendeten Primer	96
7.1.1	Sequenz der rCNC α 2-Untereinheit (rCNC α 2b)	96
7.1.2	Anfangsbereich der „rCNGgust“-Sequenz (Misaka et al., 1997)	99
7.1.3	Sequenzierprimer	99
7.1.4	Primer für die 5'-RACE-PCR	99
7.2	Vergleich der Aminosäuresequenzen von CNC α -Untereinheiten	100

II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bCNC α	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem Rind („ <u>b</u> ovine“)
bCNC β	β -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem Rind („ <u>b</u> ovine“)
BES	N, N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
B(p)	Basen(paare)
BSA	Rinderserum-Albumin
ca.	circa
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CCD	Restlichtverstärker („ <u>C</u> harge- <u>c</u> oupled- <u>d</u> evice“)
cCNC α	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem Huhn („ <u>c</u> hicken“)
cDNA	revers transkribierte DNA („ <u>c</u> omplementary DNA“)
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
Ci	Curie
CNC	Untereinheit eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
CNC α	α -Untereinheit eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
CNC β	β -Untereinheit eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals
CNG-Kanal	Zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
cNMP-Bindestelle	Bindestelle für zyklische Nukleotide
cpm	Zählereignisse pro minute („ <u>c</u> ounts per <u>m</u> inute“)
C-Terminus	Carboxyterminus einer Polypeptidkette
CTP	Cytidintriphosphat
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraacetat
g	Gramm, bzw. Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
h	Stunde(n)
hCNC α	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem Menschen („human“)
HEK 293-Zellen	Zellen der menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie 293
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
I	Strom
I_e	Intensität des emittierten Lichtes
IC ₅₀ -Wert	Ligandenkonzentration, die zu halbmaximalem Effekt führt
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactosid
I_{rel}	relativer, normierter Strom
$K_{1/2}$	Ligandenkonzentration, die zu halbmaximalem Strom führt
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
M	$\text{mol} \times \text{l}^{-1}$
MBP	Maltose-Bindeprotein
min	Minute(n)
MOE	olfaktorisches Epithel („main olfactory epithelium“)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
M_r	relatives Molekulargewicht
mRNA	Botenribonukleinsäure („messenger RNA“)
n	Hill-Koeffizient bzw. variable Zahl
NMG	N, N-Dimethylglucamin
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
OD _n	Extinktion bei der als Index n angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
Oligo-dA	Oligo-Desoxyadenylyl
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidyl
OSN	Olfaktorisch-sensorisches Neuronen
³² P	radioaktives Phosphorisotop

p.A.	pro analysi
PA	Paraformaldehyd
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> ele <u>e</u> ktrophorese
pcCNC α	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus dem <u>P</u> inealorgan des Huhns („ <u>c</u> hicken“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction“)
PDE	Phosphodiesterase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
5'-RACE	„ <u>R</u> apid- <u>a</u> mplification of 5'- <u>c</u> DNA- <u>e</u> nds“
rCNC α	α -Untereinheit eines CNG-Kanals aus der Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Stäbchenaußensegmente („ <u>R</u> od <u>o</u> uter <u>s</u> egments“)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S1-S6	Transmembranale Segmente 1-6
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
t	Zeit
TEMED	N, N, N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Enzym-Einheit („Unit“)
ü.N.	über Nacht
ÜNK	„Über-Nacht-Kultur“
UV	Ultraviolett
V _m	Membranspannung
VNO	vomeronasales Organ
V _{rev}	Umkehrpotential

Es wurden die üblichen Abkürzungen des „Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch die Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin und T: Thymin).

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1 Einleitung

Ionenkanäle kontrollieren den Ionenfluß über Membranen. Sie sind integrale Membranproteine und bilden hydrophile Poren in der Lipidmembran, die den passiven Fluß von elektrisch geladenen Ionen ermöglichen. Diese Funktion ist entscheidend für die Entstehung und Weiterleitung elektrischer Signale, z.B. in sensorischen Zellen, Nervenzellen und Muskelzellen. Ionenkanäle unterscheiden sich in ihrer Ionenselektivität und im Aktivierungsmechanismus.

Viele Ionenkanäle werden durch Änderung der Membranspannung aktiviert (Übersicht: Terlau & Stühmer, 1998; Armstrong & Hille, 1998). Einige Ionenkanäle werden durch mechanische Kräfte beeinflusst (Übersicht: Ghazi et al., 1998). Eine große Gruppe von Ionenkanälen wird durch die Bindung von Liganden aktiviert. Einige Liganden binden extrazellulär („Neurotransmitter“; Übersicht: Barnard et al., 1996), andere binden intrazellulär (z.B. zyklische Nukleotide).

1.1 Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle („CNG-Kanäle“) gehören funktionell zur Gruppe der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Sie bilden eine Familie von Kationenkanälen und werden durch die intrazelluläre, kooperative Bindung der zyklischen Nukleotide cGMP bzw. cAMP geöffnet (Übersicht: Zufall et al., 1994; Kaupp, 1995). Aufgrund gemeinsamer struktureller Merkmale gehören CNG-Kanäle zur gleichen genetischen Superfamilie wie die spannungsabhängigen Ionenkanäle (Jan & Jan, 1990; Guy et al., 1991; Goulding et al., 1992; Bönigk et al., 1993). Sie werden jedoch nicht durch Spannungsänderung aktiviert und sind nur schwach spannungsabhängig (Kaupp, 1989; Yau & Baylor, 1989; Lynch & Lindemann, 1994). Viele CNG-Kanäle sind molekularbiologisch und elektrophysiologisch charakterisiert worden (Übersicht: Kaupp, 1995; Finn, 1996; Zagotta & Siegelbaum, 1996; Wei et al., 1998). CNG-Kanäle gehören zur Gruppe der nicht-selektiven Kationenkanäle, da sie verschiedene monovalente Kationen schlecht unterscheiden können (Frings et al., 1992; Torre & Menini, 1994; Haynes, 1995a). Sie leiten auch divalente Kationen. Diese blockieren dabei den Strom, der durch monovalente Kationen getragen wird (Übersicht: Yau & Baylor, 1989; Kaupp & Altenhofen, 1992; Sesti et al., 1994; Frings et al., 1995; Haynes, 1995b; Seifert et al., 1999; Dzeja et al., 1999).

CNG-Kanäle wurden erstmals in sensorischen Zellen von Wirbeltieren identifiziert (Sehstäbchen: Fesenko et al., 1985; Sehzapfen: Haynes & Yau, 1985; Riechzellen: Nakamura & Gold, 1987). CNG-Kanäle bestehen aus verschiedenen homologen Untereinheiten. Die Stöchiometrie der Untereinheiten ist unklar. CNG-Kanaluntereinheiten werden als CNC α und CNC β bezeichnet. Der CNG-Kanal in Sehstäbchen wird durch eine CNC α 1-Untereinheit (Kaupp et al., 1989) und eine CNC β 1a-Untereinheit (Chen et al., 1994; Körschen et al., 1995) gebildet. In Sehzapfen ist eine weitere, als CNC α 2 bezeichnete, α -Untereinheit (Bönigk et al., 1993; Weyand et al., 1994) gefunden worden. Eine β -Untereinheit ist in Sehzapfen bislang nicht nachgewiesen worden. Der CNG-Kanal in Riechzellen besteht aus den Untereinheiten CNC α 3 (Dhallan et al., 1990; Ludwig et al., 1990), CNC α 4 (Bradley et al., 1994; Liman & Buck, 1994) und CNC β 1b (Sautter et al., 1998; Bönigk et al., 1999).

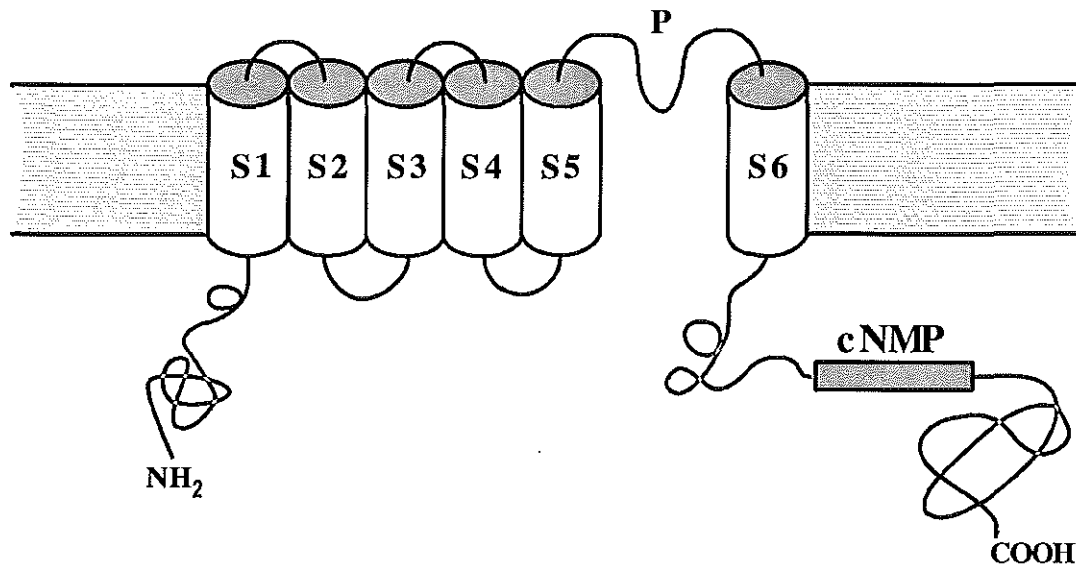


Abb.1.1: Modell der transmembranalen Topologie einer α -Untereinheit der zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle nach Henn et al. (1995). Dargestellt sind die transmembranalen Segmente S1-S6, die Porenregion (P) und die cNMP-Bindestelle (cNMP). Das N-terminale Ende des Proteins ist mit NH₂ bezeichnet, das C-terminale Ende mit COOH. N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär. Im N-Terminus einiger α -Untereinheiten befindet sich eine Bindestelle für Calmodulin (Erläuterung im Text).

Die transmembranale Topologie einer α -Untereinheit ist in Abb. 1.1 dargestellt. CNG-Kanäle ähneln in ihrer Struktur den spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen. Sie besitzen sechs transmembranale Segmente (S1-S6; Henn et al., 1995). Zwischen dem fünften und sechsten Segment befindet sich ein Bereich, der homolog zur Porenregion spannungsabhängiger Kanäle ist (Guy et al., 1991; Goulding et al., 1992; Heginbotham et al., 1992; Bönigk et al., 1993). Dieser Bereich ist auch in CNG-Kanälen an der Ausbildung der Pore beteiligt

(Goulding et al., 1993; Root & MacKinnon, 1993; Eismann et al., 1994; Rho & Park, 1998). Im transmembranalen Segment S4 befindet sich ein Sequenzmotiv, das dem „Spannungsfühler“-Motiv der spannungsabhängigen Ionenkanäle ähnelt. Dieser Proteinbereich vermittelt möglicherweise die schwache Spannungsabhängigkeit der CNG-Kanäle. N- und C-Terminus der CNG-Kanäle befinden sich intrazellulär (Cook et al., 1989; Molday et al., 1991). Im N-Terminus einiger α -Untereinheiten befindet sich eine funktionelle Calmodulinbindestelle (CNC α 3: Liu et al., 1994; CNC α 2: Bönigk et al., 1996) bzw. ein homologes Motiv. Im C-Terminus befindet sich die Bindestelle für zyklische Nukleotide („cNMP-Bindestelle“). Die Bindestelle wurde durch Sequenzvergleich mit cAMP- bzw. cGMP-abhängigen Proteinkinasen (Weber et al., 1987 und 1989) identifiziert (Kaupp et al., 1989; Kumar & Weber, 1992). Durch die Bindung der zyklischen Nukleotide erfolgt vermutlich eine Konformationsänderung der Bindestelle. Diese wird dann auf andere Proteinbereiche übertragen und führt zur Öffnung der Kanäle (Goulding et al., 1994; Gordon & Zagotta, 1995). Der genaue Mechanismus der Aktivierung ist jedoch unklar (Brown et al., 1998). Wahrscheinlich spielt dabei der Bereich zwischen dem sechsten transmembranalen Segment und der cNMP-Bindestelle eine wichtige Rolle (Paoletti et al., 1999).

1.2 Funktion und physiologische Bedeutung von CNG-Kanälen

1.2.1 Signaltransduktion in Sehzellen von Wirbeltieren

Licht wird bei Wirbeltieren in den Sehstäbchen und Sehzapfen der Netzhaut absorbiert und durch eine Enzymkaskade („Sehkaskade“) in ein elektrisches Signal umgewandelt („Phototransduktion“; Überblick: Stryer, 1991; Yau, 1994; Müller & Kaupp, 1998). Sehstäbchen ermöglichen das Sehen bei schwachem Licht. Sehzapfen ermöglichen das Farbsehen bei Tageslicht. Beide Zelltypen (Abb. 1.2.1A) sind morphologisch in ein äußeres und ein inneres Segment unterteilt. Das Außensegment enthält alle molekularen Komponenten, die an der Phototransduktion beteiligt sind. Das Außensegment der Sehstäbchen besitzt Membranstapel („Disks“), in denen das Sehpigment Rhodopsin eingelagert ist. Sehzapfen besitzen keine isolierten Membranstapel: ihre Plasmamembran ist jedoch vielfach gefaltet und verleiht dem Zapfenaußensegment ebenfalls eine stapelförmige Struktur. Das Sehpigment der Sehzapfen befindet sich in der Plasmamembran.

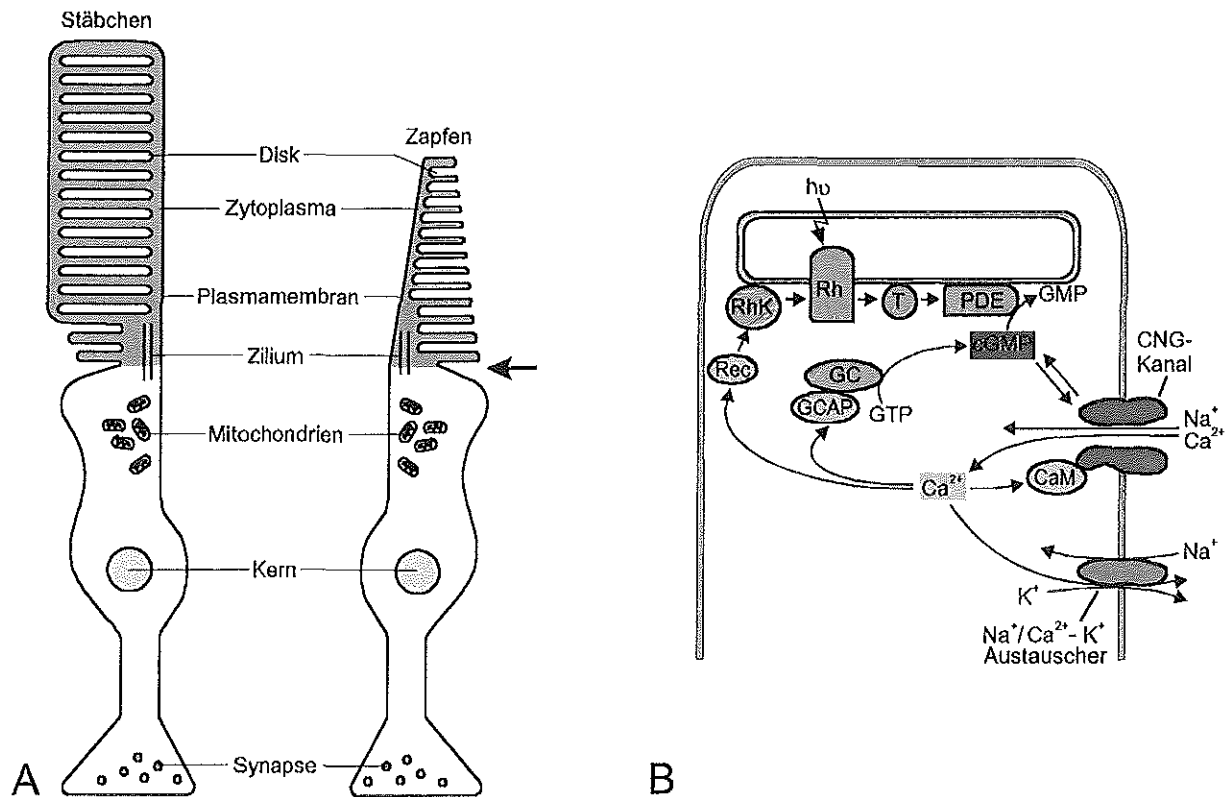


Abb. 1.2.1: Schematische Darstellung der Phototransduktion in Sehzapfen und Sehzellen. A: Sehzapfen- und Sehzellen (Die morphologische Grenze zwischen Außen- und Innensegment ist durch einen Pfeil rechts neben der Zapfenzelle gekennzeichnet/ Erläuterung im Text). **B:** Schematische Darstellung der Phototransduktion in Sehzellen (Erläuterung im Text); Verwendete Abkürzungen: CaM: Calmodulin, PDE: cGMP-Phosphodiesterase, Rec: Recoverin, GC: Guanylylzyklase, Rh: Rhodopsin, RhK: Rhodopsinkinase, T: Transducin.

Die molekularen Vorgänge der Phototransduktion sollen hier am Beispiel der Sehzellen beschrieben werden (Abb. 1.2.1B). Im Dunkelzustand werden die CNG-Kanäle der Sehzelle durch eine erhöhte cGMP-Gleichgewichtskonzentration offen gehalten. Sie leiten Na⁺- und Ca²⁺-Ionen in die Zelle, die dadurch depolarisiert wird. Durch die Aktivität des Na⁺/Ca²⁺-K⁺ Austauschers stellt sich eine Ca²⁺-Gleichgewichtskonzentration von ca. 220-550 nM ein (Ratto et al., 1988; Gray-Keller & Detwiler, 1994).

Bei Belichtung induziert die Absorption eines Lichtquants eine Konformationsänderung in einem Rhodopsinmolekül. Durch das angeregte Rhodopsin wird das G-Protein Transducin aktiviert. Dieses aktiviert seinerseits die cGMP-Phosphodiesterase. Die aktive Phosphodiesterase hydrolysiert cGMP. Wenn die cGMP-Konzentration abnimmt, schließen die CNG-Kanäle (1.1) in der Plasmamembran. Durch das Schließen der CNG-Kanäle im Außensegment und die permanente Aktivität eines, hier nicht näher beschriebenen, Kaliumkanals im Innensegment wird die Gesamtzelle hyperpolarisiert. Als Folge wird die Freisetzung des Transmitters Glutamat an der Synapse vermindert und die Aktivität nachgeschalteter

Neuronen verändert. Gleichzeitig sinkt die Ca^{2+} -Gleichgewichtskonzentration der Sehzelle aufgrund der Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ Austauschers.

Die Erholungsphase nach der Belichtung und die Adaptation der Phototransduktionskaskade an unterschiedliche Lichtintensitäten (Übersicht: Kaupp & Koch, 1992; Koch, 1995; Koutalos & Yau, 1996; Polans et al., 1996; Detwiler & Gray-Keller, 1996; Palczewski & Saari, 1997; Müller & Kaupp, 1998) sollen hier nur kurz umrissen werden. Dabei wirken Ca^{2+} -Bindungsproteine als Ca^{2+} -Sensoren und steuern die Aktivität von Zielproteinen (Abb.1.2.1B). Wenn die Ca^{2+} -Konzentration nach Belichtung einen Wert von $< 100 \text{ nM}$ erreicht, beschleunigt die Guanylylzyklase der Sehzellen die Synthese von cGMP. Dies wird durch ein Ca^{2+} -Bindungsprotein namens GCAP („guanylyl-cyclase-activating-protein“) vermittelt. Bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration verliert GCAP gebundenes Ca^{2+} , wird dadurch aktiviert, und stimuliert die Guanylylzyklase. Durch die steigende cGMP-Konzentration werden die CNG-Kanäle wieder geöffnet. Die Ca^{2+} -Konzentration erreicht wieder ihren Ruhewert, so daß GCAP wieder inaktiviert wird. Die Adaptation an unterschiedliche Lichtintensitäten wird durch zwei Ca^{2+} -Bindungsproteine, Recoverin und Calmodulin, vermittelt. Im Dunkeln, wenn die Ca^{2+} -Konzentration hoch ist, inhibiert Recoverin die Phosphorylierung des Rhodopsins durch die Rhodopsinkinase. Dadurch wird die Lebensdauer des aktivierten Rhodopsins verlängert. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen, wie sie bei Belichtung der Sehzelle auftreten, verläuft die Rhodopsin-Phosphorylierung durch die Rhodopsinkinase schneller, da sie nicht durch Recoverin inhibiert wird. Die Lichtantwort fällt kleiner und kürzer aus. Auch der CNG-Kanal wird durch Ca^{2+} moduliert. Calmodulin erniedrigt in der Ca^{2+} -gebundenen Form die Ligandenempfindlichkeit des CNG-Kanals um den Faktor 1,5-2. Ungeklärt ist bislang, ob diesem schwachen Effekt eine physiologische Rolle *in vivo* zukommt.

1.2.2 Signaltransduktion in Riechzellen von Wirbeltieren

Die Geruchsdetektion wird bei Wirbeltieren durch Riechzellen („olfaktorisch-sensorische Neuronen/OSNs“) vermittelt. Der Duftstoffreiz wird durch eine Signaltransduktionskaskade („Riechkaskade“) in ein elektrisches Signal umgewandelt („Olfaktion“). Die Riechzellen (Abb.1.2.2A) besitzen Zilien, die von einem Riechknöpfchen ausgehen. Die Zilien sind in einer Schleimschicht (*Mucus*) eingebettet. Duftstoffe durchdringen den *Mucus* und binden an Duftstoffrezeptoren, die sich in der Zellmembran der Zilien befinden (Übersicht: Buck &

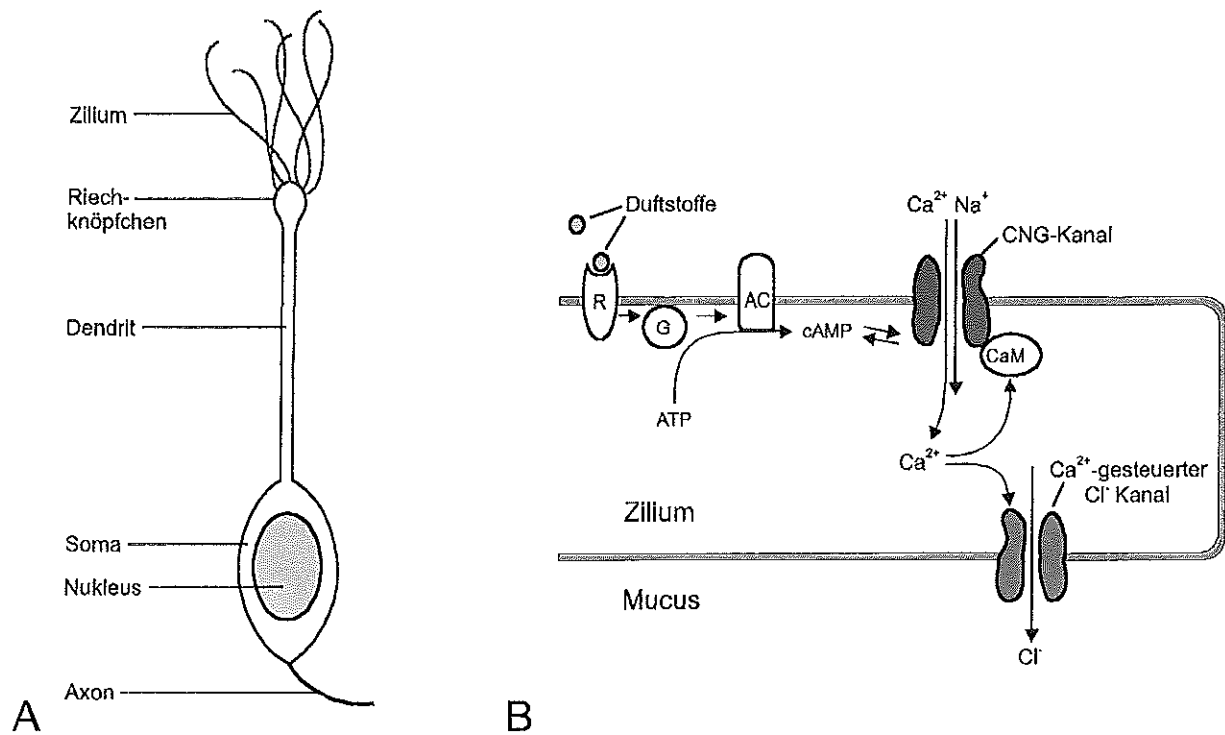


Abb. 1.2.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion in Riechzellen. A: Riechzelle (Erläuterung im Text). B: Signaltransduktion in Riechzellen (Erläuterung im Text); Verwendete Abkürzungen: AC: Adenylzyklase III, CaM: Calmodulin, G: G-Protein (G_{olf}), R: Duftstoffrezeptor.

Axel, 1991; Breer et al., 1996; Freitag et al., 1998). Durch die Bindung des Duftstoffes wird eine Signaltransduktionskaskade (Übersicht: Breer et al., 1994; Zufall et al., 1994; Schild & Restrepo, 1998) ausgelöst (Abb.1.2.2B). Die meisten Duftstoffe induzieren einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Lowe et al., 1989; Bakalyar & Reed, 1990). Der aktivierte Duftstoffrezeptor aktiviert ein stimulatorisches G-Protein („ G_{olf} “; Jones & Reed, 1989). Das aktivierte G-Protein stimuliert seinerseits die membranständige Adenylzyklase (Typ III: Pace et al., 1985; Pfeuffer et al., 1989; Bakalyar & Reed, 1990). Durch die Tätigkeit der Adenylzyklase steigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Die olfaktorischen CNG-Kanäle (1.1) werden durch die steigende cAMP-Konzentration aktiviert (Nakamura & Gold, 1987). Monovalente Kationen und Ca^{2+} strömen vom *Mucus* in das Lumen der Zilien ein (Firestein & Werblin, 1987; Frings et al., 1995), und die ziliäre Ca^{2+} -Konzentration nimmt zu (Leinders-Zufall et al., 1997). Die Zelle wird durch den Kationeneinstrom depolarisiert. Die Depolarisation der Riechzelle wird durch Ca^{2+} -gesteuerte Cl^- -Kanäle verstärkt, die sich öffnen, wenn die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration den mikromolaren Bereich erreicht (Kleene & Gesteland, 1991; Kleene, 1993 und 1997; Hallani et al., 1998).

Durch die Aktivierung der CNG-Kanäle und der Ca^{2+} -gesteuerten Cl^- -Kanäle wird das Duftstoffsignal nicht-linear amplifiziert (Lowe & Gold, 1993b). Der Strom durch die Cl^- -Kanäle

kann bis zu 80 % des Gesamtstroms betragen (Kleene, 1993; Kurahashi & Yau, 1993; Lowe & Gold, 1993b). Die Depolarisation der Riechzelle führt schließlich zur Auslösung eines Aktionspotentials.

Wie bei der Phototransduktion nehmen Ca^{2+} -Ionen auch bei der chemoelektrischen Transduktion eine zentrale, regulatorische Rolle ein, indem sie mit verschiedenen Komponenten der Riechkaskade wechselwirken (Übersicht: Zufall et al., 1994). Die steigende Ca^{2+} -Konzentration aktiviert eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Phosphodiesterase (PDE1C2: Borisov et al., 1992). Dadurch wird die cAMP-Konzentration wieder gesenkt. Ca^{2+} /Calmodulin reguliert aber auch die Aktivität der Adenylzyklase (Anholt & Rivers, 1990) und des CNG-Kanals. Durch Ca^{2+} /Calmodulin wird die Ligandenempfindlichkeit des olfaktorischen CNG-Kanals für cAMP um das 20fache gesenkt (Chen & Yau, 1994; Liu et al., 1994). So trägt die Ca^{2+} /Calmodulin-Modulation des CNG-Kanals zur Abschaltung des Duftstoffsignals und zur Adaptation bei (Chen & Yau, 1994; Kurahashi & Menini, 1997). Die durch das Duftstoffsignal erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wird vermutlich durch einen Na^+ / Ca^{2+} -Austauscher gesenkt (Reisert & Matthews, 1998).

Manche Duftstoffe können die Adenylzyklase nicht aktivieren (Sklar et al., 1986), sondern erhöhen stattdessen die intrazelluläre IP_3 -Konzentration (Breer et al., 1990; Boekhoff et al., 1990; Ronnett et al., 1993). Dieser Anstieg wird vermutlich durch ein G-Protein vom G_0 -Typ vermittelt (Schandar et al., 1998). Es existieren jedoch Untersuchungen, die die Existenz eines Duftstoff-induzierten IP_3 -Signalweges nicht unterstützen (Firestein et al., 1991; Lowe & Gold, 1993a; Kleene et al., 1994; Nakamura et al., 1996). Diese Untersuchungen wurden durch Ergebnisse an „Knock-out“ Mäusen gefestigt, denen die $\text{CNC}\alpha 3$ -Untereinheit des olfaktorischen Kanals fehlt. Diese Mäuse sind nicht mehr in der Lage, Duftstoffe wahrzunehmen (Brunet et al., 1996). Dies gilt auch für Duftstoffe, die den IP_3 -Weg stimulieren sollen. Transgene Mäuse, die das G-Protein G_{olf} nicht mehr exprimieren können, sind ebenfalls nicht in der Lage, Duftstoffe wahrzunehmen (Belluscio et al., 1998). Insgesamt ist die Rolle eines Duftstoff-induzierten IP_3 -Signalweges kritisch zu bewerten. Möglicherweise existiert ein solcher Signalweg nur in bestimmten Riechzellen (Noé & Breer, 1998).

Besonderes Interesse fand die Entdeckung, daß in einer Subpopulation der Riechzellen eine membrangebundene Rezeptor-Guanylylzyklase (GC-D: Fülle et al., 1995) und eine cGMP-abhängige Phosphodiesterase (PDE2: Juilfs et al., 1997) exprimiert werden. In Riechzellen waren bis zu diesem Zeitpunkt eine PDE1C2 (Borisov et al., 1992; Yan et al., 1995) und eine PDE4A (Cherry & Davis, 1995) nachgewiesen worden. Die PDE1C2 ist Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig und für den Abbau des Duftstoff-induzierten cAMPs verantwortlich. Die PDE4A ist

cAMP-spezifisch und wird in den Axonen der Riechzellen exprimiert. Die Funktion dieser Phosphodiesterase ist unklar. In der Subpopulation der Riechzellen, die die GC-D und die PDE2 enthält, ließen sich weder die Adenylylzyklase (Typ III) noch die PDE1C2 bzw. PDE4A nachweisen (Juilfs et al., 1997). Diese Subpopulation könnte einen eigenständigen Signaltransduktionsweg aufweisen. Die GC-D ist homolog zu den Guanylylzyklase-Rezeptoren für natriuretische Peptidhormone bzw. für hitzestabile Enterotoxine (Juilfs et al., 1997). Die GC-D könnte als Rezeptor für einen (bislang unbekannten, möglicherweise peptidartigen) Duftstoff fungieren und cGMP synthetisieren. Das cGMP könnte in diesen Zellen die Rolle des cAMPs als sekundärer Botenstoff ersetzen. Die cGMP-abhängige PDE2 könnte an der Abschaltung des cGMP-Signals beteiligt sein. Sollte cGMP die Funktion des sekundären Botenstoffs in diesen Zellen einnehmen, könnte prinzipiell der bekannte olfaktorische CNG-Kanal Endglied der Signaltransduktionskette sein, da der olfaktorische CNG-Kanal für cAMP und cGMP eine ähnliche Empfindlichkeit aufweist. Wenn in diesen Zellen jedoch zwischen cGMP- und cAMP-Signalen unterschieden werden muß, würden diese Zellen einen CNG-Kanal benötigen, der eine höhere Empfindlichkeit für cGMP als für cAMP aufweist. Solche Eigenschaften besitzen die bekannten CNG-Kanäle aus den Sehzellen. Beispielsweise ist der Zapfen-CNG-Kanal für cGMP ca. 200 mal empfindlicher als für cAMP (Weyand et al., 1994).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Funktion, die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Lokalisierung des olfaktorischen CNG-Kanals (1.1./1.2.2) der Ratte (*Rattus norvegicus*) sind intensiv untersucht worden. Der olfaktorische CNG-Kanal wird durch die Untereinheiten rCNC α 3, rCNC α 4 und rCNC β 1b gebildet (Bönigk et al., 1999). Aufgrund der Existenz einer Riechzell-Subpopulation, die möglicherweise cGMP als sekundären Botenstoff verwendet, ist nicht auszuschließen, daß in dieser Population andere CNG-Kanaluntereinheiten exprimiert werden und spezifische Funktionen übernehmen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob zusätzliche CNC α -Untereinheiten, wie sie beispielsweise in Sehzellen vorkommen, im Riechepithel der Ratte exprimiert werden. Dies sollte mit Hilfe molekularbiologischer und immunzytochemischer Methoden untersucht werden. Mit elektrophysiologischen Methoden sollte dann geklärt werden, welche physiologische Rolle cGMP-sensitive CNG-Kanäle im Riechepithel der Ratte spielen können.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, Sambrook et al. (1989) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

Die in dieser Arbeit benutzten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Appli-Chem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biorad (München), Biozym (Oldendorf), Difco (Detroit/ USA), Invitrogen (Groningen/ Niederlande), Merck (Darmstadt), MWG (Ebersberg), NEB (Schwalbach), Pharmacia (Uppsala/ Schweden), Qiagen (Hilden), Riedel-de Haën (Seelze), Sigma (Deisenhofen), und Serva (Heidelberg) bezogen. Radiochemikalien wurden von Amersham (Little Chalfont/ England) geliefert. Alle Lösungen wurden ausschließlich mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Photometrische Messungen wurden mit einem UV/ VIS-Spektralphotometer („U-1100“, Hitachi) durchgeführt. Die Hersteller aller anderen verwendeten Geräte, Materialien sowie der verwendeten Enzyme und Proteine sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

2.2 *E.coli*-Zellkultur

2.2.1 Verwendeter Bakterienstamm und Plasmidvektoren

E.coli K12 XL1-Blue (Bullock et al., 1987; Stratagene): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [*F*^{*proAB*}, *lacI*^{*ZΔM15*}, Tn10 (*tet*^{*r*})] ; wurde zur Amplifizierung von Plasmid-DNA und zur Infektion mit λZAPII-Phagen verwendet.

pBluescriptSK⁻ (Short et al., 1988; Stratagene): Dieses Plasmid wurde als Vektor für die Klonierung von rekombinanter DNA verwendet.

pMALc2 (NEB): Dieses Plasmid wurde zur Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen eingesetzt.

pcDNAIAmp (Invitrogen): Dieses Plasmid wurde in *E.coli* vermehrt und für die heterologe Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen (2.19.2) verwendet.

2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für *E. coli*

LB (Luria Bertani)- Medium:	LB-Agar-Platten:	NZY-Medium:	NZY-Top-Agar:	NZY-Agarplatten:
1 % Baktotrypton	1,5 % LB-Agar	1 % NZ-Amine	NZY-Medium	NZY-Medium
0,5 % Hefeextrakt		0,5 % Hefeextrakt	0,75 % Agarose	1,5 % Agar
1 % NaCl		0,5 % NaCl		
		0,2 % MgSO ₄ x7H ₂ O		

Die Flüssigmedien wurden autoklaviert (20 min, 121°C) und bei 4°C gelagert. Die Lösungen für die Agarplatten wurden autoklaviert und auf Petrischalen verteilt. Bei Bedarf wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ ml) oder Tetracyclin (Endkonzentration: 10 µg/ ml) kurz vor dem Gießen der Platten in den auf 60°C temperierten Agar gegeben. Die Platten wurden zunächst ü.N. bei RT, danach bei 4°C gelagert. NZY-Top-Agar wurde autoklaviert und aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.3 Anzucht von *E.coli*-Bakterienkulturen

2.2.3.1 Anzucht von *E.coli*-Zellen zur Plasmidpräparation

E.coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden 12 h in 5-500 ml LB-Medium bei 37°C in einem Rotationsinkubator (New Brunswick) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel) vermehrt. Zur Selektion der Plasmidvektoren wurde das Medium mit einem geeigneten Antibiotikum (2.2.2) versetzt.

2.2.3.2 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Kompetente Zellen wurden mit einer modifizierten Form der CaCl₂-Methode nach Mandel & Higa (1970) hergestellt. Eine frisch inokulierte *E.coli*-Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 angezüchtet, auf Eis abgekühlt und nach Zentrifugation (5 min, 3.000 g, 4°C) in einem

1/2 Kulturvolumen eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert, in 1/10 Kulturvolumen eiskalter 100 mM CaCl₂/ 25 % Glycerin-Lösung resuspendiert und für ca. 4 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Herstellung von „Mg²⁺-Zellen“ zur Infektion mit λ-ZAPII-Phagen-DNA

E.coli-Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄, 0,2 % Maltose angezüchtet, zentrifugiert (5 min, 3.000 g, RT) und in 10 mM MgSO₄ resuspendiert, so daß die Lösung eine OD₆₀₀ von 10 aufwies. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.3.4 Anzucht von *E.coli* zur Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen

Es wurden 4 x 250 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ ml) und 0,2 % Glukose mit je 2,5 ml einer ÜNK versetzt, die ein pMALc2-Plasmid (2.2.1) enthielt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5. Die Expression wurde durch Induktion mit IPTG (Endkonzentration: 0,5 mM) gestartet. Die Zellen wurden für ca. 3-6 h inkubiert und in 125 ml Portionen zentrifugiert (10 min, 5.000 g, RT). Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -20°C. Die Reinigung der exprimierten Proteine wird unter 2.12.2 beschrieben.

2.3 Plasmid-DNA-Präparationen

DNA wurde grundsätzlich in TE bzw. TE/ RNase aufgenommen:

TE: 1 mM EDTA, 10 mM Tris/ HCl pH 7,5-8,0

TE/ RNase: TE mit 5 µl/ ml RNasemix (Ambion, Austin/ USA).

2.3.1 Mini-Präparation durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979)

Die Bakterienzellen (1,5 ml einer ÜNK) wurden durch Zentrifugation pelletiert (1 min, 17.000 g, 4°C) und in 50 µl Lösung I resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 60 µl Lösung II lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden mit 75 µl Lösung III gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 17.000 g, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde

gegebenenfalls mit Phenol/ Chloroform extrahiert (2.5.1). Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 550 µl Ethanol und Zentrifugation (10 min, 17.000 g, 4°C) präzipitiert. Nach Zugabe von 500 µl 70 % Ethanol wurde erneut zentrifugiert (2 min, 17.000 g, 4°C) und das getrocknete Pellet in 20 µl TE aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/ HCl pH 8,0

Lösung II: 0,2 M NaOH, 1 % SDS

Lösung III: 3 M KAc pH 4,8

2.3.2 Alkalische LiCl-Minipräparation

Die Bakterienzellen (3 ml einer ÜNK) wurden pelletiert (1 min, 17.000 g, 4°C) und in 150 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 180 µl Lösung II wurden die Zellen lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 225 µl Lösung III präzipitiert. Nach Zentrifugation (5 min, 17.000 g, 4°C) wurde die DNA mit 1,5 ml Ethanol aus dem Überstand präzipitiert (3 min, 17.000 g, 4°C). Das Pellet wurde in 60 µl 30 mM Tris/ HCl pH 8,0 resuspendiert. Durch Zugabe von 100 µl 4 M LiCl und anschließende Zentrifugation (5 min, 17.000 g, 4°C) wurde die RNA abgetrennt. Der Überstand wurde mit 500 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert (5 min, 17.000 g, 4°C). Nach Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet in 20 µl TE/ RNase aufgenommen und 20 min bei 37°C inkubiert.

2.3.3 Alkalische LiCl-Präparation im großen Maßstab

Die DNA wurde aus 250 ml Bakterienkultur präpariert. Die Bakterienzellen wurden pelletiert (10 min, 5.000 g, 4°C), in 20 ml Lösung I resuspendiert und mit 24 ml Lösung II lysiert. Proteine, chromosomale DNA und SDS wurden durch Zugabe von 30 ml Lösung III gefällt und pelletiert (10 min, 5.000 g, 4°C). Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und zentrifugiert (10 min, 5.000 g, 4°C). Anschließend wurden die Nukleinsäuren in 1,45 ml Wasser resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl und 50 µl Tris/ HCl pH 7,5 wurde die RNA gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 5.000 g, 4°C). Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 10 ml Ethanol aus dem Überstand gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 5.000 g, 4°C) wurde das Pellet in 500 µl TE/ RNase resuspendiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch

Phenol/ Chloroformextraktion (2.5.1) und Ethanolpräzipitation (2.5.2) gereinigt. Das Pellet wurde getrocknet und in 300 µl TE aufgenommen.

2.4 Arbeiten mit λ -ZAPII-Phagen-cDNA-Bibliotheken

2.4.1 Titerbestimmung einer λ -ZAPII-Phagen-cDNA-Bibliothek

Es wurden verschiedene Verdünnungen einer Phagensuspension in SM^+ -Puffer hergestellt. Jeweils 1 µl wurde mit 50 µl „ Mg^{2+} -Zellen“ (2.2.3.3) für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Suspensionen wurden mit je 3,5 ml NZY-Topagar (auf 48°C vorgewärmt) gemischt und auf NZY-Agarplatten (Ø 8,6 cm) ausgebracht. Die Platten wurden bei 30°C bis zur Lyse der Bakterien inkubiert (9-14 h). Anhand der gebildeten Plaques wurde der Titer der eingesetzten Phagensuspension bestimmt.

SM^+ -Puffer: 10 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 0,01 % Gelatine in 50 mM Tris/ HCl pH 7,5

2.4.2 Ausplattieren von λ -ZAPII-Phagen

Die λ -ZAPII-Phagen-cDNA-Bibliothek wurde in einer geeigneten Verdünnung (in SM^+ -Puffer) auf NZY-Agarplatten ausplattiert. In der nachfolgenden Tabelle ist die Zahl der plaquebildenden Einheiten, das verwendete Volumen an „ Mg^{2+} -Zellen“ sowie die Größe der verwendeten NZY-Agarplatten für die erste Hybridisierungsrunde („Grobscreen“) und die nachfolgende Vereinzelungsrunde („Feinscreen“) aufgeführt:

Hybridisierungsschritt	Mg^{2+} -Zellen	NZY-Topagar	plaquebildende Einheiten	NZY-Plattengröße
Grobscreen	300 µl	10 ml	30.000 – 50.000	Ø 14,5 cm
Feinscreen	50 µl	3,5 ml	30 - 200	Ø 8,6 cm

Die weiteren Arbeitsschritte zur Identifizierung spezifischer Klone („Plaquelifting“, Immobilisierung auf Nylonmembranen, Hybridisierung mit radioaktiven Sonden und Autoradiographie) werden unter 2.7 beschrieben.

2.4.3 Isolierung von λ -ZAPII-Phagen

Nach der Autoradiographie (2.7.1.5) wurden die Signale auf dem Röntgenfilm den entsprechenden λ -ZAPII-Phagen-Plaques auf den Agarplatten zugeordnet. Die entsprechenden Regionen wurden mit Pasteurpipetten ausgestochen und mit 500 μ l SM⁺-Puffer eluiert. Zur Vereinzelung wurden die eluierten Phagen erneut ausplattiert („Feinscreen“, 2.4.2). Es wurde eine Vereinzelungsrunde durchgeführt.

2.5 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.5.1 Phenol/ Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen und Lipiden wurden durch Phenol/ Chloroformextraktion entfernt. Das Phenol wurde zuvor mit TE pH 8,0 (2.3) gesättigt. DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform gemischt und zur Trennung zentrifugiert (3 min, 15.000 g, RT). Die wäßrige Phase wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.5.2).

2.5.2 Ethanolpräzipitation

Um DNA-Lösungen zu konzentrieren oder umzupuffern, wurden sie nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und dem 2,5-3 fachen Volumen an absolutem Ethanol durch Zentrifugation (10 min, 17.000 g, 4°C) pelletiert. Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE aufgenommen.

2.5.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.5.3.1 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen

Die Menge an DNA, die auf ein Ethidiumbromid-Agarose-Gel (2.5.4) aufgetragen wurde, wurde durch Vergleich mit einem Größen- und Mengenstandard (2.5.5) anhand der Intensität der Banden abgeschätzt.

2.5.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden diese in TE verdünnt und die OD₂₆₀ bestimmt. Ein Wert von 1,0 entspricht 50 µg DNA/ ml bzw. 33 µg Oligonukleotide/ ml oder 40 µg RNA/ ml.

2.5.4 Trennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Es wurden Gele mit einer Konzentration von 0,75-2 % Agarose eingesetzt. Die Agarose wurde in 1 x TAE aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf 60°C wurde die Gellösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ ml) versetzt und das Gel gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Proben in 1 x TAE-Probenpuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Elektrophorese wurde 10-20 min bei 90-120 V durchgeführt. Aufgrund der Interkalierung von Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) sichtbar gemacht werden.

50 x TAE pH 7,5: 2 M Tris, 50 mM EDTA

10 x TAE-Probenpuffer: 0,25 % Xylencyanol, 50 % Glycerin, 10 x TAE

2.5.5 DNA-Größen- und Mengenstandard

λ -DNA mit EcoRI/ Hind III geschnitten (MBI Fermentas, Vilnius/ Litauen). Fragmentgrößen: 21.226, 5.148, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564, 125 Bp. Die Konzentration betrug 67 ng/ µl.

2.5.6 Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte durch Zentrifugation nach Heery et al. (1990) oder durch Adsorption an „QIAEX II“-Material. Die „Qiaex II“-Methode wurde in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden) mit den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Das ausgeschnittene Gelstück wurde zerkleinert und mit 300 µl QX1-Puffer pro 100 mg Gelmaterial versetzt und gemischt, bis die Gelstücke vollständig gelöst

waren. Nach Zugabe von 10 µl „QIAEX II“-Suspension wurde die Lösung für 10 min bei 50°C inkubiert. Durch Zentrifugation (30 sek, 12.000 g, RT) wurde das „QIAEX II“-Material mit der daran gebundenen DNA pelletiert und je zweimal mit 500 µl QX2-Puffer und 500 µl QX3-Puffer gewaschen. Nach 5-10 min Trocknung bei 37°C wurde die DNA mit 20 µl 0,5 × TE in 10 min bei 37°C eluiert.

2.6 Manipulation von Nukleinsäuren

2.6.1 Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim) und NEB (Schwalbach) bezogen. Die DNA wurde in 1 x Inkubationspuffer (jeweils vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Restriktionen mit mehreren Enzymen wurden, soweit möglich, in einem Ansatz durchgeführt. Gegebenenfalls wurde der Reaktionsansatz nach der ersten Restriktion mit Hilfe einer Ethanolpräzipitation (2.5.2) umgepuffert. Pro µg DNA wurden 2 U Enzym eingesetzt. Dabei wurden maximal 10 Volumenprozent Enzymlösung eingesetzt. Analytische Ansätze mit DNA aus Minipräparationen (2.3) hatten ein Volumen von 15 µl und enthielten 0,1 µl RNasemix (Ambion, Austin/ USA). Das Volumen präparativer Ansätze betrug 30-40 µl.

2.6.2 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.6.2.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden

Überhängende 5'-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I (Boehringer, Mannheim) durch die 5'→3'-Polymeraseaktivität aufgefüllt. Durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Pro µg DNA wurden 2 U Klenow-Enzym in Restriktionspuffer A (Boehringer, Mannheim) mit 100 µmol dNTPs eingesetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde danach 10 min bei 68°C inaktiviert.

2.6.2.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA

PCR-Fragmente (2.10) weisen keine endständigen 5'-Phosphatgruppen auf und müssen vor der Ligation (2.6.3.1) phosphoryliert werden. Die Fragmente wurden mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase (NEB, Schwalbach) für 30 min bei 37°C in Kinasepuffer des Enzymherstellers mit 0,1 mM ATP inkubiert. Die Kinase wurde 10 min bei 68°C inaktiviert.

2.6.2.3 Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren

Die glatten Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim) dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Dazu wurden 0,5-1 µg geschnittene Vektor-DNA, 5 µl 10 × Phosphatasepuffer des Herstellers und 0,04 U alkalische Phosphatase in einem Endvolumen von 50 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,1 M EGTA gestoppt und das Enzym 10 min bei 68°C inaktiviert. Die DNA wurde mit Phenol/ Chloroform extrahiert (2.5.1) und aus einem Agarose-Gel gereinigt (2.5.6).

2.6.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

2.6.3.1 Ligation

Bei der Ligation wurden geschnittener bzw. dephosphorylierter Plasmidvektor und ein 3-5 facher molarer Überschuß an Fragment in 1 x Ligasepuffer gemischt. Wenn die Fragmente komplementäre überhängende Einzelstrang-Enden aufwiesen, wurde mit 0,5 U T4-DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim) 30 min bei 22°C ligiert. Zur Ligation von glatten Enden wurde mit 3,1 U T4-DNA-Ligase (Pharmacia, Uppsala/ Schweden) ü.N. bei 16°C inkubiert. In beiden Fällen betrug das Volumen der Ligationsansätze 15 µl. Dabei wurde der 10 x Ligasepuffer von Boehringer (Mannheim) verwendet.

2.6.3.2 Transformation von Ligationsprodukten

7,5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 10 µl 10 x CM-Puffer gemischt und mit Wasser

auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde auf Eis gekühlt und mit 100 µl kompetenten Zellen (2.2.3.2) gemischt. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeimpuls (1 min, 42°C) und einer Abkühlungsphase (20 min auf Eis) wurden 300 µl LB-Medium (2.2.2) zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase, die der Ausprägung der Antibiotika-Resistenz dient, wurden die Zellen auf LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum (2.2.2) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

10x CM: 100 mM CaCl₂, 400 mM MgCl₂

2.7 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren

2.7.1 Nachweis von DNA

2.7.1.1 Transfer und Immobilisierung von DNA auf Nylonmembranen („Southernblot“)

DNA, die auf die Nylonmembran übertragen werden sollte, wurde in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.5.4). Das Gel wurde 15 min in Denaturierungslösung und 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Die DNA wurde durch gerichtete Diffusion mit 20 x SSC in 1 bis 12 h auf eine Nylonmembran („Qiabran“ von Qiagen, Hilden) transferiert. Die Nukleinsäuren wurden auf den Nylonmembranen in einem „Stratalinker“ (Stratagene, Heidelberg) durch UV-Licht ($\lambda=254$ nm, 0,12 J/ cm²) immobilisiert.

<u>Denaturierungslösung:</u>	<u>Neutralisierungslösung:</u>	<u>20 x SSC:</u>
0,5 M NaOH	0,5 M Tris/ HCl pH 7,5	0,3 M NaCitrat pH 7,0
1,5 M NaCl	1,5 M NaCl	3 M NaCl

2.7.1.2 Transfer und Immobilisierung von λ -ZAPII-Phagen-DNA

Die λ -Phagen-DNA wurde durch „Plaquelifting“ nach Benton und Davis (1977) von Agarplatten auf Nylonmembranen („Qiabran“ von Qiagen, Hilden) überführt. Die Orientierung der Filter auf den Agarplatten wurde durch Einstiche in den Agar markiert. Die Filter wurden nach 5 min von den Platten abgezogen, 5 min denaturiert und 5 min neutralisiert (2.7.1.1).

2.7.1.3 Transfer von *E.coli*-DNA auf Membranen

Von den Kulturplatten wurden Filterabzüge angelegt und behandelt, wie unter 2.7.1.2 beschrieben. Die so hergestellten Filter wurden mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (2.7.1.4) inkubiert („Kolonie-Hybridisierung“) und positive Klone isoliert.

2.7.1.4 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden

Nukleinsäuren wurden durch spezifische DNA-Sonden nachgewiesen, die mit der „Random priming“-Methode nach Feinberg & Vogelstein (1983) radioaktiv markiert wurden. Die Markierung wurde mit dem „Megaprime DNA Labelling Kit“ (Amersham Life Science, Little Chalfont/ England) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Radionuklid diente [α - ^{32}P]-dCTP (spezifische Aktivität > 6.000 Ci/ mM). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit Sephadex G75 (Pharmacia, Uppsala/ Schweden) abgetrennt. Die Markierungseffizienz wurde in einem Szintillationszähler („Tricarb 2000 CA“, Packart) bestimmt.

2.7.1.5 Hybridisierung von immobilisierter DNA mit DNA-Sonden und Autoradiographie

Die Bedingungen für die Hybridisierung von „Southernblots“ (2.7.1.1), immobilisierter λ -ZAPII-Phagen-DNA (2.7.1.2) oder immobilisierter *E.coli*-DNA (2.7.1.3) mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (2.7.1.4) sind hier zusammengefaßt. Es wurde mit hoher Stringenz hybridisiert (65°C).

<u>Prähybridisierung:</u> In 5 x SET, 5 x Denhardt's Reagents, 0,1 % SDS, 0,1 mg/ ml Heringssperma-DNA für 1-4 h
<u>Hybridisierung:</u> In Prähybridisierungslösung mit ^{32}P -markierter DNA-Sonde (1×10^6 cpm/ ml) für 2-14 h
<u>Waschen (2 x):</u> 1 x SET, 0,1 % SDS für 20 min

1 x SET: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris/ HCl pH 7,4

1 x Denhardt's Reagents: je 0,02 % Rinderserum-Albumin, Ficoll 400, und Polyvinylpyrrolidon

1 x SET kann dabei durch 1 x SSC (2.7.1.1) ersetzt werden. Spezifische Hybride, die aus Nukleinsäuren und radioaktiv markierten DNA-Sonden bestanden, wurden durch Autoradiographie mit einem „XAR5“-Röntgenfilm (Kodak) unter Verwendung von Verstärkungsfolien nachgewiesen (1-24 h bei -80°C).

2.7.2 Nachweis von RNA

2.7.2.1 Trennung von RNA durch Gelelektrophorese

Die RNA (2.8) wurde in 4,2 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Davon wurden 0,4 µl zur Konzentrationsbestimmung photometrisch vermessen (2.5.3.2). Die restliche Probe wurde jeweils mit 12,9 µl RNA-Denaturierungspuffer versetzt und 15 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden 3,4 µl 10 x RNA-Probenpuffer zugesetzt. Die Proben wurden auf ein denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel gegeben (1,1 % Formaldehyd, 1,2 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer). Zusätzlich wurde 3,75 µl RNA-Standard mit 3,4 µl 10 x RNA-Probenpuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ ml) vermischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 50-55 V für 4 h. Danach wurde das Gel zweimal mit DEPC-Wasser gespült und die RNA auf eine Membran transferiert (2.7.2.2). DEPC-Wasser wurde durch Rühren (ü.N.) mit 0,01 % DEPC und Autoklavieren (60 min, 121 °C) hergestellt.

Verwendeter RNA-Standard (in kB): 9,49, 7,49, 4,40, 2,37, 1,35, 0,24 (1 µg/ µl; GIBCO BRL, Eggenstein).

<u>1 x MOPS-Puffer:</u>	<u>10 x RNA-Probenpuffer:</u>	<u>RNA-Denaturierungspuffer:</u>
20 mM MOPS pH 7,0	50 % Glycerin	1,29 x MOPS-Puffer
1 mM EDTA	10 x TAE-Puffer	8,36 % Formaldehyd
5 mM Natriumacetat	0,25 % Bromphenolblau	64,5 % Formamid
	0,25 % Xylencyanol	

2.7.2.2 Transfer von RNA auf Membranen („Northernblot“)

Der Transfer von RNA auf Membranen („Northernblot“) wurde durchgeführt, wie von Meinkoth & Wahl (1984) beschrieben. Das denaturierende Formaldehydgel (2.7.2.1)

wurde, wie in 2.7.1.1 für DNA beschrieben, durch gerichtete Diffusion mit 20 x SSC auf eine Membran transferiert, immobilisiert und anschließend für 1 h bei 80°C inkubiert. Die immobilisierte RNA wurde zur Hybridisierung eingesetzt (2.7.2.4).

2.7.2.3 Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden

Radioaktive RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Das zu transkribierende Plasmid wurde linearisiert und die interessierende Sequenz durch T7-RNA-Polymerase in RNA transkribiert. Es wurden die *in vitro*-Transkriptions-Chemikalien von Promega (Heidelberg) verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Die Transkription wurde zunächst in einem Volumen von 10 µl durchgeführt und der Ansatz auf ein nicht-denaturierendes Agarose-Gel (2.5.4) aufgetragen. Bei effektiver Transkription wurde eine *in vitro*-Transkription mit einem Volumen von 40 µl mit 10 µl [α -³²P]-CTP (Spezifische Aktivität: 800 Ci/ mmol) angesetzt. Danach wurde die Matrizen-DNA durch 7 U RNasefreie DNase (Boehringer, Mannheim) für 30 min bei 37°C abgebaut. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Ultrafiltration in einem „Centricon 10“-Konzentrator (Amicon, Witten) durch Waschen mit DEPC-Wasser (2.7.2.1) entfernt.

2.7.2.4 Hybridisierung immobilisierter RNA mit RNA-Sonden

Die Hybridisierung von RNA-Sonden mit immobilisierter RNA (2.7.2.2) erfolgte ähnlich wie für immobilisierte DNA beschrieben (2.7.1.5). Die Prähybridisierungslösung enthielt jedoch zusätzlich 50 % Formamid. Die Prähybridisierung erfolgte für 2 h bei 65°C. Die immobilisierte RNA wurde mit der radioaktiv markierten Sonde (1×10^6 cpm/ ml) ü.N. bei 65°C hybridisiert. Die Membran wurde danach zweimal für 30 min bei 65°C mit 0,5 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen und spezifische RNA-RNA-Hybride durch Autoradiographie nachgewiesen (2.7.1.5).

2.8 Isolierung von polyadenylierter RNA aus nativen Geweben der Ratte

Es wurde das „Fast Track 2.0“-Kit (Invitrogen, Groningen/ Niederlande) verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Die polyadenylierte RNA wird durch Bindung an

Oligo-dT-Zellulose gereinigt. Die RNA wurde nach der Elution vom Chromatographiematerial mit Ethanol gefällt und bei -80°C aufbewahrt. Aus dem Riechepithel bzw. den Augen von 10 Ratten konnten ca. 35 μg polyadenylierte RNA isoliert werden. Aus dem Hoden einer Ratte konnte ca. 200 μg polyadenylierte RNA isoliert werden. Die RNA wurde für cDNA-Synthesen (2.9) bzw. Northernblots (2.7.2.2) verwendet.

2.9 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) mit polyadenylierter RNA als Matrize

Komplementäre DNA (cDNA) wurde mit ca. 1,5 μg polyadenylierter RNA als Matrize wahlweise durch zwei Methoden hergestellt. Zum einen wurde genspezifische cDNA durch die Verwendung eines genspezifischen Oligonukleotids hergestellt und nach Reinigung und Modifikation bei der 5'-RACE-PCR eingesetzt (2.10.2.3). Dabei wurden Enzyme und Puffer des „5'-RACE-Kits“ (Boehringer, Mannheim) verwendet. Außerdem wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Zum anderen wurde die gesamte RNA durch die Verwendung hexamerer Oligonukleotide in cDNA („random priming“) umgeschrieben. Dabei wurde das „cDNA-Synthesis-Kit“ (GIBCO BRL, Eggenstein) verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt.

2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion („PCR“)

Mit der PCR (Mullis et al., 1986) können DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Matrizen-DNA („Template“) wird durch Hitze denaturiert und mit geeigneten Oligonukleotiden („Primern“) hybridisiert. Die Primer werden mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase verlängert. Das PCR-Fragment kann über Schnittstellen oder nach Klenow-Reaktion (2.6.2.1) und Phosphorylierung (2.6.2.2) in einen Vektor kloniert werden (2.6.3.1).

2.10.1 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit einem DNA-Synthesegerät („Synthesizer 391“, Applied Biosystems) hergestellt. Die Oligonukleotide wurden ü.N. durch Inkubation in 32 %iger Ammoniaklösung bei 55°C vom Material der Synthesesäule abgespalten. Nach dem Abdampfen des Ammoniaks erfolgte die Reinigung durch Ethanolpräzipitation (2.5.2).

2.10.2 Bedingungen für die PCR

Die PCR wurde in einem „DNA Thermal Cycler“ (Perkin Elmer) oder in einem „TRIO-Thermoblock“ (Biometra) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde zu Beginn bei 94°C für 3 min denaturiert und bei verschiedenen Temperaturen (15-40 Zyklen) inkubiert. Die DNA wurde dabei jeweils bei 94°C für 45 sek denaturiert. Bei der niedrigsten Schmelztemperatur (T_m) eines der beiden eingesetzten Oligonukleotide wurde die Matrizen-DNA mit den spezifischen Primern für ca. 45 sek hybridisiert. Die Schmelztemperatur T_m ist die Temperatur, bei der (kleinere) Oligonukleotide (noch) an eine komplementäre DNA-Matrize binden. Sie wird nach folgender Formel bestimmt (Fehlpaarungen im 5'-Bereich des Primers bleiben bei der Berechnung unberücksichtigt):

$$T_m = (\text{Anzahl der G/ C-Nukleotide}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl der A/ T-Nukleotide}) \times 2^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$$

Zur Verlängerung der hybridisierten Primer durch die Polymerase wurde der PCR-Ansatz bei 72°C inkubiert. Die Zeitspanne dieser Inkubation richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (1 min für 1 kbp). Es wurden folgende Polymerasen mit dem Puffer des jeweiligen Herstellers verwendet: Taq-Polymerase und „High expand fidelity“-Polymerase von Boehringer (Mannheim) und „Primezyme“-Polymerase von Biometra.

2.10.2.1 PCR mit Plasmid-DNA als Matrize

Ein 100 µl PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

20-50 ng Matrizen-DNA

je 300 ng spezifischer Primer

10 µl 10 x PCR-Puffer für die jeweilige Polymerase

1 µl 20 mM dNTPs

1-2,5 U hitzestabile Polymerase

Es wurden maximal 15 Zyklen durchgeführt.

2.10.2.2 Verschachtelte PCR („nested PCR“) mit cDNA als Matrize

Diese PCR-Variante wurde zur Amplifizierung seltener Sequenzen aus cDNA (2.9) eingesetzt. Es wurden zwei Oligonukleotidpaare verwendet. Das zweite „innere“ Oligonukleotidpaar hybridisiert innerhalb der Nukleinsäuresequenz, die durch das erste „äußere“ Oligonukleotidpaar amplifiziert wird. Man führt eine erste PCR (40 Zyklen) mit dem „äußeren“

Oligonukleotidpaar durch. Danach wird mit 1/10 des ersten Ansatzes eine zweite PCR (40 Zyklen) durchgeführt, bei der die beiden „inneren“ Oligonukleotide eingesetzt werden.

2.10.2.3 PCR zur Anreicherung seltener 5'-Enden von cDNA („5'-RACE-PCR“)

Für die 5'-RACE-PCR wurde das „5'-RACE-Kit“ von Boehringer (Mannheim) verwendet. Die 5'-RACE-PCR wurde in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers (nach Frohman et al., 1988; Ohara et al., 1989) durchgeführt. Diese Methode ist in Abb. 2.10.2.3 schematisch dargestellt. 1,5 µg polyadenylierte RNA (2.8) wurden mit Hilfe eines genspezifischen Primers (#2193) in cDNA umgeschrieben (2.9). Die cDNA wurde durch Verwendung eines „High pure PCR product purification“-Kits (Boehringer, Mannheim) gereinigt. Danach wurde mit Hilfe Terminaler Transferase eine Folge von Desoxyadenylnukleotiden („Oligo-dA“) an das 3'-Ende der synthetisierten cDNA angehängt. Mit der modifizierten cDNA als Matrize wurde

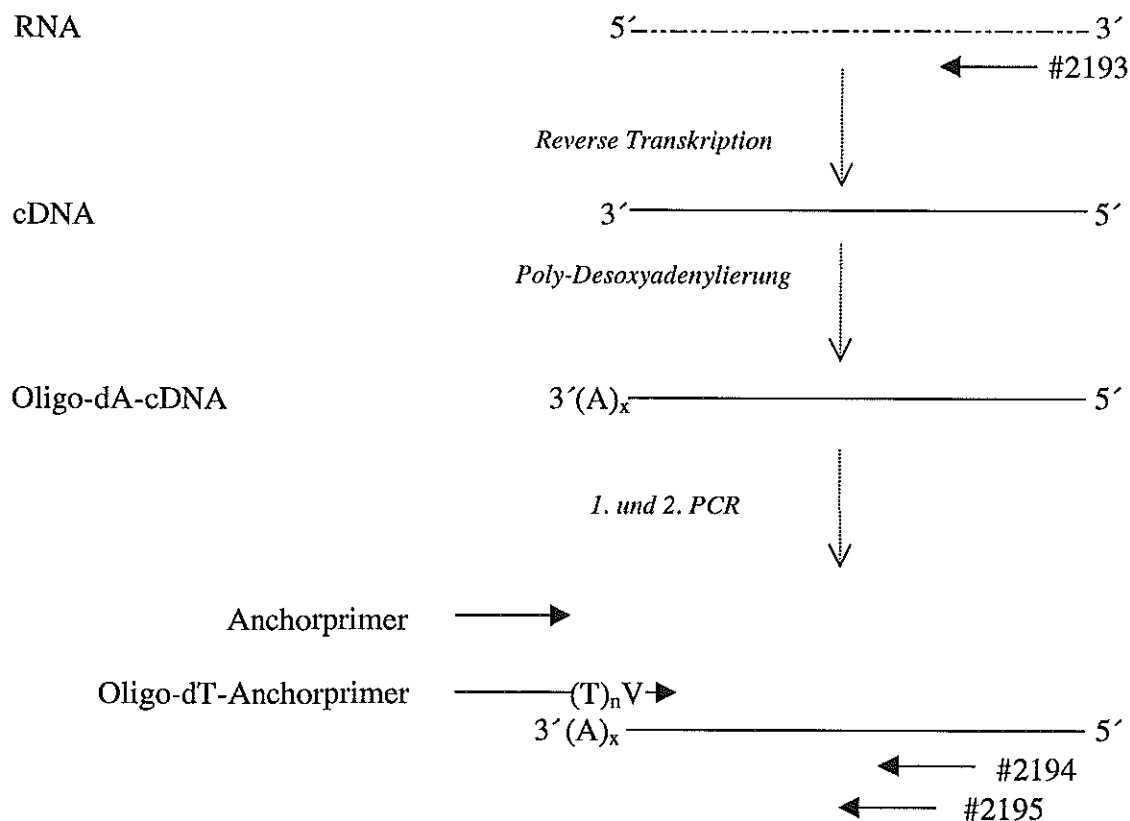


Abb. 2.10.2.3: Schematische Darstellung der 5'-RACE-PCR (Erläuterung im Text). Im oberen Teil der Abbildung ist die cDNA-Synthese und die Modifizierung der cDNA dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist die relative Position der bei den PCRs verwendeten Primer dargestellt (siehe auch 7.1.1). Gestrichelte Pfeile verdeutlichen experimentelle Schritte, Pfeile mit durchgezogenen Linien repräsentieren Primer. Verwendete Abkürzungen und Indizes: n: 16, V: (A, C oder G) und x: ca. 20-30.

dann eine PCR mit einem genspezifischen Primer (#2194) und einem „Oligo-dT-Anchor“-Primer (bindet an die Oligo-dA-Sequenz der modifizierten cDNA) durchgeführt. PCR-Bedingungen der ersten PCR: 94°C für 3 min, danach 10 Zyklen (94°C für 45 sek, 37°C für 45 sek, 72°C für 1 min), 72°C für 3 min, danach 30 Zyklen (94°C für 45 sek, geeigneter T_m für 45 sek und 72°C für 1 min) und abschließend 3 min bei 72°C. 1/10 des ersten PCR-Ansatzes wurde bei einer zweiten PCR eingesetzt. Bei dieser zweiten PCR wurde ein „Anchor“-Oligonukleotid (hybridisiert mit dem „Anchor“-Bereich der „Oligo-dT-Anchor“-Nukleotidfolge im PCR-Produkt der ersten PCR) und ein drittes genspezifisches Oligonukleotid verwendet (#2195). PCR-Bedingungen der zweiten PCR: 94°C für 3 min, danach 40 Zyklen (94°C für 45 sek, geeigneter T_m für 45 sek, 72°C für 1 min) und abschließend 3 min bei 72°C.

2.10.2.4 Reinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden durch Phenol/ Chloroformextraktion (2.5.1) und Ethanolpräzipitation (2.5.2) gereinigt. Die DNA wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen (2.5.4) und die Fragmente aus dem Gel gereinigt (2.5.6).

2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit einem Sequenziergerät („LICOR DNA Sequencer Long ReadIR 4200“ von MWG-Biotech/ Ebersberg). Die Sequenziermethode beruhte auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977). Die DNA-Markierung erfolgte durch eine PCR (2.10) mit IRD800-Fluorophor-markierten Oligonukleotiden (2.11.2). Zur Sequenzauswertung wurde die Software des Geräteherstellers, sowie die Programme PCGene und PCSupp (Dr. W. Bönigk, IBI 1/ Forschungszentrum Jülich) eingesetzt.

2.11.1 Sequenzierreaktion

Es wurde das „Thermo Sequenase“-Kit von Amersham (Little Chalfont/ England) verwendet. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Pro kbp der zu sequenzierenden DNA wurden ca. 65 ng DNA eingesetzt. 1,2 pmol IRD800-Fluorophor-markierter Primer wurden zugefügt.

Zur Relaxation der Matrizen-DNA wurde der Ansatz mit 0,7 µl 50 % DMSO versetzt. Anschließend wurde der Ansatz mit Wasser auf ein Endvolumen von 7 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zu je 1,5 µl auf vier PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Je 0,75 µl der vier Terminationsmische wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und jeweils zu einem der vier 1,5 µl-Aliquots gegeben. Die Ansätze wurden mit 20 µl „Chill-out 14 Liquid“-Wachs (MJ Research) überschichtet und bei der PCR (2.11.2) eingesetzt.

2.11.2 PCR zur Sequenzierung

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2 min 94 °C, 32 Zyklen (40 sek bei 94 °C, 40 sek bei der T_m des Sequenzieroligonukleotids und 1 min bei 70°C). Nach der PCR wurden die Ansätze mit 3 µl Stoppuffer gemischt. Es wurde der Stoppuffer des Sequenzierkits (2.11.1) benutzt, dem Xylencyanol in einer Endkonzentration von 0,2 % zugesetzt worden war. Die Proben wurden auf ein Sequenziergel (2.11.3) aufgetragen.

2.11.3 Acrylamid-Gelelektrophorese zur Sequenzierung

Es wurden 60 ml einer 4,6 % Gellösung (mit 35 % Harnstoff) mit 350 µl 10 % APS und 50 µl TEMED versetzt. Die Gellösung wurde mit Hilfe einer Plastikspritze zwischen die Gelplatten gegeben, und dabei durch einen Sterilfilter gedrückt. Mit Hilfe eines Plastikkamms wurde eine glatte Gel-Oberfläche erzeugt. Nach 1 h war die Polymerisation der Gellösung abgeschlossen. Nach dem Befestigen des Gels in der Kammer des LICOR-Gerätes wurden die Pufferkammern mit 1 x TBE gefüllt. Nach einem Vorlauf (1 h) wurden je 1,6 µl der PCR-Ansätze (2.11.2) mit Hilfe eines „Haifischzahn“-Kamms aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte ü.N. bei 45 W und 45°C. Die Leseweiten betrugen zwischen 600-1.000 Bp.

10 x TBE pH 8,5 (50°C): 1,34 M Tris, 25 mM EDTA, 450 mM Borsäure

4,6 % Gellösung (60 ml): 21 g Harnstoff, 5 ml 10 x TBE, 0,5 ml DMSO, 30,5 ml Wasser und 5,6 ml Acrylamid („Rapid Gel XL“ von USB, Bad Homburg)

2.12 Herstellung und Reinigung von polyklonalen Antikörpern

2.12.1 Expression von Maltose-Bindeprotein (MBP) und MBP-Fusionsproteinen

Die hier beschriebenen Methoden wurden in Anlehnung an Riggs (1994) modifiziert. Für die Expression wurde der Expressionsvektor pMALc2 (2.2.1) verwendet. Aufgrund der Konstruktion dieses Vektors bestehen die gebildeten Fusionsproteine aus einem N-terminalen Maltose-Bindeprotein (MBP) und einem C-terminalen Antigenanteil. Die Fusionsproteine weisen eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa zwischen MBP und dem Antigenanteil auf. Die Anzucht der Bakterien wurde unter 2.2.3.4 beschrieben. Die eingefrorenen Bakterienpellets wurden in 5 ml AAC-Puffer mit Proteaseinhibitoren (2.12.2) aufgenommen und mit einem Sonifikator („B-12“, Branson) für 10 x 30 sek bei ca. 90 W und bei 4°C aufgeschlossen. Die unlösliche Fraktion des Lysates wurde durch Zentrifugation abgetrennt (20 min, 15.000 g, 4°C). Der lösliche Überstand mit den Fusionsproteinen wurde für die Amylose-Affinitätschromatographie (2.12.2) verwendet. Die Ausbeuten schwanken je nach Antigenanteil (1-50 mg/ l Bakterienkultur). MBP ohne Fusionsproteinanteil wird gut exprimiert (ca. 15 mg/ l Bakterienkultur).

2.12.2 Reinigung von MBP und MBP-Fusionsproteinen durch Amylose-Affinitätschromatographie

MBP bindet an die repetitiven Maltosereste von Amylose. Daher können MBP-Fusionsproteine bzw. MBP durch Amylose-Affinitätschromatographie in Anlehnung an Kellerman & Ferenci (1982) gereinigt werden. Als Affinitätsmaterial wurde eine Amylose-Agarose (NEB, Schwalbach) verwendet. Der Überstand des Bakterienlysates (2.12.1) wurde 1 : 5 in AAC-Puffer verdünnt und auf Amylosesäulen (Volumen: 15 ml von Biorad, München) aufgetragen. Danach wurden die Säulen mit 20 Volumen AAC-Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch 20 mM Maltose in AAC-Puffer eluiert. Das Eluat wurde direkt zur Immunisierung von Kaninchen (2.12.4) oder nach Dialyse gegen PBS (2.17) zur Kopplung für die Antikörperreinigung (2.12.5) verwendet.

AAC-Puffer: 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris/ HCl pH 7,4

AAC-Puffer mit Proteaseinhibitoren: AAC-Puffer mit PMSF (500 µg/ ml), Leupeptin (1 µg/ ml), Pepstatin (1 µg/ ml) und Benzamidin (1 mM)

2.12.3 Reinigung von Domänen aus MBP-Fusionsproteinen durch präparative Spaltung

Es wurden 4 mg MBP-Fusionsprotein mit der Protease Faktor Xa ü.N. gespalten, wie unter 2.12.6 beschrieben. Der Ansatz wurde auf ein präparatives SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und ü.N. durch Gelelektrophorese (2.16) aufgetrennt. Die Proteine wurden reversibel mit 0,3 M CuSO₄ gefärbt. Das vom MBP abgespaltene Antigen wurde mit der Gelmatrix ausgeschnitten, in 0,5 M (NH₄)HCO₃, 0,5 x SDS-Laufpuffer (2.16) aufgenommen und ü.N. gegen 0,5 x SDS-Laufpuffer dialysiert. Das Protein wurde danach gegen 5 mM EDTA in PBS (2.17) dialysiert. Die verdünnte Proteinlösung wurde durch Filtration in einem „Centricon 10“-Konzentrator (Amicon, Witten) eingeeengt und die Reinheit durch Gelelektrophorese überprüft. Die Ausbeute betrug 40 %.

2.12.4 Immunisierung von Kaninchen

Polyklonale Antikörper wurden durch Injektion von MBP-Fusionsproteinen in Kaninchen (Rasse: *Weißer Neuseeländer*) erzeugt. Dafür wurden 0,5-1 mg Antigen (in 0,5 ml PBS) mit 0,5 ml Adjuvans („ABM 3“, RIBI ImmunoChemResearch) gemischt und in den Nackenbereich des Kaninchens injiziert. Dem Kaninchen wurde in Abständen von 14 Tagen dreimal 1 mg MBP-Fusionsprotein injiziert. Nach weiteren 14 Tagen wurde dem Kaninchen 1 mg gereinigtes Antigen (2.12.3) injiziert. Nach der dritten und vierten Injektion war der Antikörperspiegel im Blut der Kaninchen ausreichend hoch, so daß polyklonale Seren aus dem Blut der Kaninchen gewonnen werden konnten. Dazu wurde Blut aus der Ohrarterie bzw. durch „Ausbluten“ gewonnen. Nach der Gerinnung des Blutes (4 h bei RT oder ü.N. bei 4°C) wurde das Serum durch Zentrifugation (30 min, 3.000 g, 4°C) vom Blutkuchen getrennt. Die Lagerung der aliquotierten Seren erfolgte bei -80°C.

2.12.5 Reinigung von polyklonalen Antikörpern durch Affinitätschromatographie

Die Reinigung erfolgte in Anlehnung an Campbell et al. (1951). Für die Affinitätsreinigung wurde gereinigtes MBP und gereinigtes MBP-Fusionsprotein (2.12.2) eingesetzt. Als

Säulenmatrix wurde CH-Sepharose-4B (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Die Kopplung der Proteine an die Säulenmatrix wurde bei RT in Anlehnung an das Kopplungsprotokoll von Pharmacia (Uppsala/ Schweden) in Chromatographiesäulen (Volumen: 15 ml von Biorad, München) durchgeführt. Es wurden 6,5 mg MBP und 11 mg MBP-Fusionsprotein an jeweils 0,4 g CH-Sepharose-4B (Volumen 0,8 ml) mit einer Effizienz von 90-100 % gekoppelt. Die Reinigung der Antikörper erfolgte in zwei Schritten. Antikörper gegen MBP wurden über eine MBP-Sepharose entfernt. Die verbliebenen Antikörper wurden dann über die MBP-Fusionsprotein-Sepharose gegeben.

Zunächst wurden 1,5 ml Serum 1:10 in 10 mM Tris/ HCl pH 7,5 verdünnt und dreimal über die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte MBP-Sepharose gegeben. Der Durchfluß dieser Säule wurde auf die ebenso äquilibrierte MBP-Fusionsprotein-Sepharose gegeben. Beide Säulen wurden mit 20 ml 10 mM Tris/ HCl pH 7,5 und mit 20 ml 500 mM NaCl, 10 mM Tris/ HCl pH 7,5 gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die gebundenen Antikörper mit 8 ml 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert. Anschließend wurden die verbliebenen Antikörper mit 8 ml 100 mM Triethylamin pH 11,5 eluiert. Saure und basische Eluate wurden sofort mit 0,8 ml 1 M Tris/ HCl pH 8,0 neutralisiert. Die neutralisierten Eluate wurden bei -80°C gelagert und nach einem Test (2.12.6) verwendet (2.17, 2.18.3, 2.20).

2.12.6 Test gereinigter Antikörper auf Antigenerkennung

MBP-Fusionsprotein wurde mit der Protease Faktor Xa (NEB, Schwalbach) in MBP und Fusionsproteinanteil gespalten. Das Gewichtsverhältnis betrug dabei 1 µg Faktor Xa auf 65 µg Fusionsprotein. Die Spaltung erfolgte für 1 h bei 4°C. Der Spaltungsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.16) und die Proteine auf eine Membran transferiert (2.17). Die gereinigten Antikörper (2.12.5) wurden zum immunologischen Nachweis eingesetzt (2.17). Die von der MBP-Säule eluierten Antikörper detektierten ausschließlich MBP, nicht den Antigenanteil. Die von der MBP-Fusionsproteinsäule eluierten Antikörper detektierten ausschließlich den Antigenanteil, nicht das MBP. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß jeweils über 95 % der gebundenen Antikörper bei der sauren Elution von der Affinitätssäule gelöst wurden.

2.13 Präparation von heterolog exprimierten Membranproteinen aus HEK 293-Zellen

Für die heterologe Expression in HEK 293-Zellen wurde das Plasmid pcDNAIamp (Invitrogen, Groningen/ Niederlande) eingesetzt (2.2.1). Die Zellen von vier Ø 9 cm Schalen wurden am 2. Tag nach der Transfektion mit jeweils 5 ml PBS (2.17) gewaschen, mit einem Gummispatel abgeschabt und zentrifugiert (10 min, 300 g, 4°C). Die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in insgesamt 2 ml Puffer A resuspendiert und in einem Teflon-Glas-Homogenisator lysiert. Zellreste und Zellkerne wurden durch Zentrifugation entfernt (15 min, 150 g, 4°C). Der lösliche Überstand wurde ultrazentrifugiert (20 min, 50.000 g, 4°C). Das Pellet dieser Zentrifugation wurde erneut in 2 ml Puffer A resuspendiert, homogenisiert und ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde zum hypertonischen Waschen in 2 ml Puffer B resuspendiert, ultrazentrifugiert und in ca. 300 µl Puffer C aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration an Protein wurde durch die Amidoschwarz-Methode (2.15.2) bestimmt. Die Ausbeuten betrugen 100-150 µg Protein pro Ø 9 cm Schale.

<u>Puffer A (hypotonisch):</u> 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1mM DTT in 20 mM HEPES/ NaOH pH 7,4 mit Proteaseinhibitoren (siehe AAC-Puffer/ 2.12.2)
<u>Puffer B (hypertonisch):</u> wie Puffer A, jedoch 500 mM NaCl
<u>Puffer C (isotonisch):</u> wie Puffer A, jedoch 150 mM NaCl

2.14 Präparation von Membranproteinen aus nativen Geweben

Membranproteine aus nativen Geweben wurden wie unter 2.13 präpariert. Die Menge der eingesetzten Puffer richtete sich nach Volumen und Gewicht des homogenisierten Gewebes (ca. 2 ml Puffer A und B pro g Gewebe). Die Membranfraktion aus dem Riechepithel von 10 Ratten wurde in 2 ml, die Membranfraktion aus den Retinae von 10 Ratten wurde in 800 µl Puffer C resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Amidoschwarz-Methode bestimmt (2.15.2). Aus dem Riechepithel von 10 Ratten ließ sich ca. 9 mg Protein, aus den Retinae von 10 Ratten ließ sich ca. 1 mg Protein reinigen.

2.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.15.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976)

Es wurde das „Protein Assay“-Farbreagens von BioRad (München) verwendet. Die zu vermessende Proteinprobe wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagens vermischt. Danach wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit BSA (NEB, Schwalbach) erstellt. Im linearen Bereich der Eichkurve (1- 10 µg Protein) entspricht eine OD₅₉₅ von 0,06 ca. 1 µg Protein.

2.15.2 Konzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

Die Konzentration von Proteinlösungen, die Detergentien oder Lipide enthalten, kann nicht durch die Methode nach Bradford (2.15.1) bestimmt werden. Die Protein-Konzentration solcher Proben wurde mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. Dabei wurde der „Amidoschwarz 10B“-Farbstoff von Merck (Darmstadt) verwendet. Die zu vermessende Probe wurde mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt und mit 20 µl 10 % SDS vermischt, um Proteine zu solubilisieren. Danach wurden 30 µl 1 % SDS, 1 M Tris/ HCl pH 7,5 hinzugegeben. Nach dem Mischen wurden 60 µl 104 % (w/ v) TCA zur Fällung der Proteine hinzugegeben und der Ansatz nochmals gemischt. Die Proben wurden 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einen Membranfilter (Porendurchmesser: 22 µm/ Millipore, Eschborn) aufgetragen. Die Filter wurden mit 2 ml 6 % TCA gewaschen und für 3 min mit Färbelösung gefärbt. Danach wurden die Filter kurz mit Wasser gespült und dreimal für 1 min in Entfärbelösung gelegt. Aus den getrockneten Filtern wurden die gefärbten Filterbereiche ausgeschnitten. Danach wurden die Filterstücke in je 1 ml Elutionslösung für 20 min bei RT geschüttelt. Es wurde die OD₆₃₀ bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit BSA (NEB, Schwalbach) erstellt. Im linearen Bereich der Eichkurve (1-15µg Protein) entspricht eine OD₆₃₀ von 0,03 ca. 1 µg Protein.

Färbelösung:

0,5 % Amidoschwarz B10
45 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärbelösung:

90 % Methanol
2 % Essigsäure

Elutionslösung:

50 % Ethanol
25 mM NaOH
50 µM EDTA

2.16 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Modifikation nach Laemmli (1970) getrennt. Für den analytischen Maßstab wurden „Minigel Twin“-Elektrophorese-Kammern (Gelmaße: 0,15 x 8 x 10 cm) von Biometra verwendet. Für den präparativen Maßstab (2.12.3) wurde eine „Studier“-Elektrophorese-Kammer (Gelmaße: 0,2 x 14 x 15 cm) von Hoefer eingesetzt. Die Trennung erfolgte im analytischen Maßstab mit 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel und dauerte ca. 90 min. Es wurden 7,5-16,5 %ige Trenngele und 5,2 %ige Sammelgele verwendet. Im präparativen Maßstab wurde die Elektrophorese ü.N. mit 60 V durchgeführt. Proteinproben wurden in 1 x SDS-Probenpuffer aufgetragen.

4 x SDS-Probenpuffer: 0,01 % Bromphenolblau, 4 % β -Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 6,4 % SDS, 200 mM Tris/ HCl pH 7,5

10x SDS-Laufpuffer: 1,92 M Glycin, 250 mM Tris, 1 % SDS

2.16.1 Verwendete Proteinmarker für die SDS-PAGE

Es wurden Marker für niederen („LMW: Low molecular weight calibration kit“) und hohen („HMW: High molecular weight calibration kit“) Molekulargewichtsbereich von Pharmacia (Uppsala/ Schweden) verwendet:

Niederer Molekulargewichtsbereich: 94, 67, 43, 30, 20 und 14,4 kDa

Hoher Molekulargewichtsbereich: 212, 170, 116, 76 und 53 kDa.

2.16.2 Färben von SDS-PAGE-Gelen mit der Coomassie-Blaufärbung

Das Färben von SDS-PAGE-Gelen wurde in Anlehnung an Meyer & Lamberts (1965) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff Coomassie Blue R 250 von Serva (Heidelberg) verwendet. Die Gele wurden für 1-2 h oder ü.N. in Färbelösung gelegt. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärbelösung gelegt und auf Whatman-Papier getrocknet.

Färbelösung: 0,2 % SERVA Blue R, 30 % Ethanol (vergällt), 10 % Essigsäure

Entfärbelösung: 30 % Ethanol (vergällt), 10 % Essigsäure

2.17 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen („Westernblot“)

Die Proteine wurden in SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt (2.16) und in Anlehnung an Towbin et al. (1979) auf PVDF-Membranen („Immobilon P“ von Millipore, Eschborn) transferiert. Der Transfer wurde bei $2,5 \text{ mA/cm}^2$ in einem „Milliblot-Graphit-Elektroblot“-System von Millipore (Eschborn) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Erfolgreicher Transfer wurde durch reversible Färbung mit 0,2 % Ponceau S (Sigma, Deisenhofen) in 2 % Essigsäure überprüft. Gegebenenfalls wurde die Blotmembran in Streifen geschnitten. Die (Membran-) Streifen wurden 1 h oder ü.N. bei 4°C mit 0,5 % Magermilchpulver (Marke: „Glücksklee“) in PBS abgesättigt. Danach wurden die Streifen zweimal für jeweils 3-5 min mit 0,02 % Tween-20 (Sigma, Deisenhofen)/ PBS gewaschen und für 1 h mit geeigneten Antikörperverdünnungen in 0,02 % Tween-20/ PBS inkubiert. Die Membranstreifen wurden zweimal gewaschen und in geeigneten Verdünnungen des Zweit-Antikörpers (meist 1:5.000) in 0,02 % Tween-20/ PBS für 30 min inkubiert. Abschließend wurde zweimal 3-5 min mit 0,02 % Tween-20/ PBS und zweimal 3-5 min mit PBS gewaschen. Alle Schritte wurden (bis auf das Absättigen der Blotmembran) bei RT durchgeführt. Die eingesetzten sekundären Antikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die sekundären Antikörper wurden von Amersham (Little Chalfont/ England) bezogen. Der Nachweis der spezifischen Komplexe aus Erst- und Zweitantikörper erfolgte mit dem „ECL-Western Blotting analysis“-System von Amersham (Little Chalfont/ England) nach Herstellerangaben. Für den photographischen Nachweis der Lumineszenzsignale wurde „ECL Hyperfilm“ des gleichen Herstellers verwendet. Immobilisierte Proteine wurden nachträglich durch Amidoschwarz gefärbt (analog zu 2.15.2).

PBS (pH 7,4-7,5): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4

2.18 Immunzytochemische Methoden

2.18.1 Präparation von Rinder- und Rattenretinae

Die Rinderaugen stammten aus dem Jülicher Schlachthof und wurden auf Eis ins Labor transportiert. Bei Raumlicht wurden die Augen hinter dem Ziliarkörper, an der Ora serrata, parallel zur Linse aufgeschnitten und Cornea, Linse sowie Glaskörper entfernt. Der hintere Augenbecher mit der Retina wurde für 1 h in 4 % Paraformaldehyd (PA)/ 0,1 M

Phosphatpuffer (PP) immersionsfixiert. Anschließend wurden Retinastücke freipräpariert, in PP gewaschen und durch Inkubationen in 10 % Saccharose/ PP (2 h) und 30 % Saccharose/ PP über Nacht kryoprotektiert. Die Stücke wurden in Einbettmedium (Tissue Tek, OCT compound, Miles Scientific) flach eingebettet und eingefroren. In einem Cryostaten (Reichert-Jung) wurden 16 µm dicke Vertikalschnitte (senkrecht zu den retinalen Schichten) angefertigt und auf gelatinisierten Objektträgern aufgenommen.

Adulte Ratten (*Sprague Dawley*) wurden mit Isofluran tief narkotisiert und dekapitiert. Die Augen wurden entnommen, durch einen Einschnitt an der Ora serrata zu einem Drittel geöffnet und in 4 % PA für 15 min fixiert. Danach wurden die Augen ganz aufgeschnitten und der hintere Augenbecher mit der Retina für 45 min weiterfixiert. Anschließend wurden die Augen wie oben beschrieben gewaschen, kryoprotektiert, eingebettet und geschnitten.

PP-Puffer (0,1 M Phosphatpuffer): 19 mM Na₂HPO₄, 81 mM NaH₂PO₄ pH 7,4

2.18.2 Präparation von olfaktorischem Epithel

Drei Wochen alte Ratten (*Sprague Dawley*) wurden mit Isofluran tief narkotisiert und dekapitiert. Der vordere Teil des Schädels mit dem Riechepithel wurde freipräpariert und in 4 % PA inkubiert. Der Schädel wurde in der PA-Lösung in einem Exsiccator für eine Minute Unterdruck ausgesetzt, um die Luft aus der Nasenhöhle zu entfernen und das Eindringen der PA-Lösung zu ermöglichen. Das Gewebe wurde für 1 h fixiert, danach in PP (2.18.1) gewaschen und wie für die Retinae beschrieben kryoprotektiert, eingebettet und eingefroren. In einem Cryostaten wurden 20 µm dicke Coronalschnitte durch die ganze Nasenhöhle angefertigt und auf gelatinisierten Objektträgern aufgenommen.

2.18.3 Immunzytochemische Färbungen

Die Schnitte wurden für 5 min angetrocknet, 5 min mit 4 % PA anfixiert, zwei Mal 10 min in PP (2.18.1) gewaschen und dann für 1 h in einer Lösung aus 10 % normalem Ziegsenserum (NGS), 0,5 % Triton-X 100 in PP inkubiert. Die Erstantikörper wurden in einer Lösung aus 5 % NGS, 0,5 % Triton-X 100, 0,05 % NaN₃/ PP verdünnt und die Schnitte darin über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zwei Mal 10 min in PP gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (anti-Kaninchen-Biotin, Sigma, 1:1.000) erfolgte in 5 % NGS, 0,5 % Triton-X 100/ PP für 1,5 h. Nach Waschen in PP wurden die Schnitte mit einem

Extravidin-Meerrettichperoxidase Konjugat (Sigma, 1:300 in PP) für 1,5 h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für je 10 min in PP erfolgte unter Zugabe von Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB: 0,05 %) und H_2O_2 (0,01 %) in PP der Nachweis des Erstantikörpers. Die Farbreaktion verlief unter Sichtkontrolle und wurde durch Abziehen der Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung und Zugabe von PP gestoppt. Die Schnitte wurden gewaschen, in Mowiolösung (Hoechst) eingedeckt und unter dem Mikroskop mit Differentialinterferenzkontrastoptik ausgewertet. Zur Dokumentation wurden Photographien mit einer Nikon F3 Kamera und Ilford Delta 100 Filmen angefertigt.

2.19 Heterologe Genexpression in HEK 293-Zellen

2.19.1 Kulturbedingungen für HEK 293-Zellen

Für die heterologe Expression von cDNA wurde die menschliche, embryonale Nierenzelllinie HEK 293 verwendet. Diese Zellen sind stabil mit einem Adenovirus transformiert. Die Zellen wurden in „M10“-Nährmedium von GIBCO BRL (Eggenstein) bei 37°C, 5 % CO_2 und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit auf Plastischalen ($\varnothing$ 5-9 cm) kultiviert. Die Verdopplungszeit der HEK 293-Zellen betrug ca. 24 h. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Bei einer Dichte von ca. 10^7 Zellen/ $\varnothing$ 9 cm Schale wurden die Zellen abgelöst und auf neue Schalen verteilt. Dazu wurden die Zellen mit 5 ml PBS (2.17) gewaschen und mit 1 ml 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA von GIBCO BRL (Eggenstein) bei 37°C abgelöst und zentrifugiert (10 min, 100 g, RT). Die Zellen wurden in ca. 10 ml „M10“-Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde für die Zellerhaltung in einer Dichte von ca. $1,5 \times 10^5$ auf $\varnothing$ 9 cm-Schalen ausgesät. Die restlichen Zellen wurden für die Transfektion zu 2×10^5 Zellen auf $\varnothing$ 5 cm Schalen oder zu 9×10^5 Zellen auf $\varnothing$ 9 cm Schalen plattiert. Nach 25 Zyklen wurden die HEK 293-Zellen verworfen und eine neue Zyklenrunde mit einem frischen Aliquot tiefgefrorener Zellen begonnen. Für die Langzeitlagerung wurden HEK 293-Zellen geerntet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (60-70 % Konfluenz). Sie wurden zu 2×10^6 Zellen/ ml in „M10“-Medium/ 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei Gebrauch wurden sie bei 37°C aufgetaut und mit 10 ml „M10“-Medium gemischt und zentrifugiert (10 min, 100 g, RT). Danach wurden die Zellen in ca. 5 ml „M10“-Medium resuspendiert und zu 5×10^5 -Zellen auf $\varnothing$ 9 cm-Schalen ausgesät.

2.19.2 Transiente Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen

Für die Transfektion der Zellen wurde der Vektor pcDNAIamp (2.2.1) verwendet. Die Transfektion wurde mit der Calciumphosphat-Methode nach Chen & Okayama (1987) durchgeführt. Für immunzytochemische (2.20) und elektrophysiologische (2.21) Untersuchungen wurden 4×10^5 Zellen ($\varnothing$ 5 cm Schale), für die Präparation von Membranproteinen (2.13) ca. 2×10^6 Zellen transfiziert. Die Transfektionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

$\varnothing$ 5 cm Schale:

4-12 μ g Plasmid-DNA/ 124 μ l Wasser

41 μ l 1 M CaCl_2

165 μ l 2 x BBS pH 6,95

$\varnothing$ 9 cm Schale:

13-39 μ g Plasmid-DNA/ 372 μ l Wasser

123 μ l 1 M CaCl_2

495 μ l 2 x BBS pH 6,95

2 x BBS pH 6,95: 50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4

Die Transfektionsansätze wurden 20 min bei RT inkubiert und auf Schalen mit logarithmisch wachsenden Zellen (2.19.1) ausgesät. Die DNA präzipitierte für ca. 22 h bei 35°C, 3 % CO_2 und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit. Zellen, die für die Zellpräparation vorgesehen waren, wurden mit PBS (2.17) gewaschen und mit frischem Medium 22 h bei 37°C, 5 % CO_2 und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Gegebenenfalls wurde Natriumbutyrat zur Steigerung der Expressionsrate in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Zellen, die immunzytochemisch oder elektrophysiologisch untersucht werden sollten, wurden in „Multiwell-Platten“ umgesetzt. Dazu wurden die Zellen mit 3 ml PBS und 2 ml 0,5 % EDTA/ PBS (2.17) gewaschen und mit 300 μ l 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA (2.19.1) bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden nach Zentrifugation (10 min, 100 g, 37°C) in 4,7 ml „M10“-Medium resuspendiert und auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen in Multiwellschalen gegeben (je 250 μ l). Die Glasplättchen wurden zuvor in Multiwellschalen mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ ml) für 2 h inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit 200 μ l „M10“-Medium überschichtet. Poly-L-Lysin wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Zellen wurden 22 h bei 37°C, 5 % CO_2 und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Gegebenenfalls wurde Natriumbutyrat zur Steigerung der Expressionsrate in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben.

2.20 Immunzytochemie an HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen, die transient heterologe Proteine exprimieren (2.19.2), können mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) bei RT gefärbt werden. Die Zellen werden am zweiten Tag nach der Transfektion mit 500 µl PBS (2.17) pro „Multiwell“ gewaschen und 15 min mit 500 µl 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 500 µl PBS gewaschen, in 0,05 % NaN₃/ PBS aufgenommen und bei 4°C gelagert. Vor der Färbung wurden die Zellen mit 200 µl 10 % NGS, 0,5 % Triton X-100 in PBS für 30 min inkubiert. NGS und Triton X-100 wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Danach wurde der Erstantikörper in Verdünnungen von 1:100-400 in 200 µl 5 % NGS, 0,5 % Triton X-100/ PBS für 1 h zugegeben. Danach wurden die Zellen dreimal für 15 min mit PBS gewaschen und der Zweitantikörper in 5 % NGS, 0,5 % Triton X-100/ PBS für 30 min in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben. Nach drei Waschgängen mit PBS erfolgte die Färbung der Antikörperkomplexe über die kovalent gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) des Zweitantikörpers. Es wurden 200 µl 0,05 % DAB, 0,01 % Wasserstoffperoxid in PBS zugegeben und die Farbreaktion durch 500 µl PBS gestoppt. Bei der Oxidation des DAB durch die gekoppelte HRP entsteht ein braunes, unlösliches Reaktionsprodukt, das die Zellen färbt. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen für photographische Aufnahmen in 30 % Mowiol (Hoechst) in 75 % Glycerin, Tris/ HCl pH 8,5 auf Objektträgern eingebettet und photographiert.

2.21 Elektrophysiologische Messungen

Die rCNC α 2-Kanäle (3.1) wurden von A. Angele (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) elektrophysiologisch charakterisiert (3.3). Die Proteine wurden dazu in HEK 293-Zellen heterolog exprimiert. Die Messungen wurden nach der „Patch clamp“-Technik (Hamill et al., 1981) in der „inside out-patch“-Konfiguration durchgeführt. Dazu wurde ein Membranstück („patch“) mit einer Meßpipette so von der HEK 293-Zelle abgezogen, daß die zytoplasmatische Seite des Patches zur Inkubationslösung gerichtet war. Der Pipettenwiderstand betrug ca. 5 M Ω . Der Widerstand nach dem Abziehen des Patches von der Zelle war ≥ 2 G Ω („Seal“-Widerstand). Die elektrophysiologischen Messungen wurden bei definierter Spannung (Spannungsklemme) durchgeführt (EPC7, Liszt). Der Membranstrom wurde durch

einen Tiefpaßfilter (1 kHz, 8-Pol Bessel Filter, Frequency Devices, Massachusetts/ USA) gefiltert. Die Meßwerte wurden gespeichert (A/ D-Wandler und Software: pClamp 6.0.3, Axon Instruments, Burlingame/ USA). Die Patche wurden aus parallel angeordneten Quarz-Kunststoff-Kapillaren mit den Testlösungen perfundiert. Für die Messung der cGMP- bzw. cAMP-induzierten Ströme (3.3.2.1) wurde die Pipette mit SIS („Standard inside solution“) gefüllt und die Membranstücke mit $x \mu\text{M}$ cGMP bzw. cAMP in SIS (SIS: 100 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES/ KOH pH: 7,4) perfundiert.

Für die Messung der Ionenselektivität (3.3.2.2) wurden die Membranstücke mit 1mM cGMP, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES/ NMG pH: 7,4 und 100 mM XCl ($X = \text{Li}^+, \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Rb}^+, \text{Cs}^+, \text{NH}_4^+$) perfundiert. Die Pipette enthielt bei diesen Messungen 100 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES/ NMG pH: 7,4.

Die Modulation durch Calmodulin (3.3.2.3) wurde durch zeitlich aufeinanderfolgende Perfusion der Membranstücke mit unterschiedlichen Lösungen untersucht. Die Abfolge der Lösungen war folgendermaßen: 1) 10 mM EGTA, 2) 100 μM cGMP, 3) 0 μM cGMP, 4) 3 μM cGMP, 5) 3 μM cGMP + 1 μM Calmodulin, 6) 100 μM cGMP, 7) 10 mM EGTA, 8) 3 μM cGMP, 9) 3 μM cGMP + 1 μM Calmodulin, 10) 10 mM EGTA, 11) 3 μM cGMP und 12) 100 μM cGMP. Die Abb. 3.3.2.3 zeigt einen Ausschnitt eines solchen Experiments. Die Lösungen hatten mit Ausnahme von EGTA (in SIS) folgende Zusammensetzung: 0, 3 oder 100 μM cGMP, 100 mM KCl, 10 mM HEPES/ KOH pH: 7,4 sowie 0,8 mM CaCl_2 / 2 mM NTA (ergibt eine „freie“ Ca^{2+} -Konzentration von ca. 50 μM Ca^{2+}). Die Pipette enthielt bei diesen Experimenten SIS-Lösung.

2.22 Fluoreszenzoptischer Nachweis der Ca^{2+} -Aufnahme in HEK 293-Zellen

Die cGMP-induzierte Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen in HEK 293-Zellen durch heterolog exprimierte CNG-Kanäle wurde von D. Reuter (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) durch Fluoreszenz-Spektroskopie nachgewiesen („ Ca^{2+} -Imaging“). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wird mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenz-Farbstoffs Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985; Van den Bergh et al., 1995) und einem „ Ca^{2+} -Imaging“- System (Applied Imaging, Großbritannien) quantitativ analysiert. Hierbei wird das Fura-2 mit UV-Licht der Wellenlängen $\lambda = 340 \text{ nm}$ und 380 nm angeregt und jeweils die Intensität (I_e) des emittierten Fluoreszenz-Lichts bei $\lambda = 510 \text{ nm}$ bestimmt. Der Quotient $I_e(340 \text{ nm}) / I_e(380 \text{ nm})$ ist ein Maß für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Das emittierte Licht wird von einer

CCD-Kamera aufgezeichnet. Aus der Intensität des emittierten Lichts werden die verschiedenen $[Ca^{2+}]_i$ berechnet und einer Falschfarbenskala zugeordnet. Die Skala reicht von blau (niedrige $[Ca^{2+}]_i$) über 256 Farbabstufungen bis hin zu rot (hohe $[Ca^{2+}]_i$). In den HEK 293-Zellen kann mit dieser Methode die $[Ca^{2+}]_i$ bis zu etwa 5 μM detektiert und farbkodiert auf Fotos dokumentiert werden. Um die Zellen mit Fura-2 zu beladen, wurde das membrangängige Fura-2-Derivat „Fura-2/ AM“ (Molecular Probes, Leiden/ Niederlande) eingesetzt. Dieses Derivat trägt Estergruppen, die intrazellulär durch unspezifische Esterasen abgespalten werden. Das dabei freiwerdende Fura-2 ist nicht membranpermeabel und verbleibt in den Zellen. Die

Zellen wurden in Multiwell-Schalen mit 4 μM Fura-2/ AM und 0,02 % Pluronic F-125 (Molecular Probes, Leiden/ Niederlande) in ES-Puffer mit 1 mM $CaCl_2$ und 2 mM $MgCl_2$ für 1 h bei 37°C unter Normalbedingungen (2.19) inkubiert. Anschließend wurden die mit Fura-2 beladenen HEK 293-Zellen in ES-Puffer mit 3 mM $CaCl_2$, sowie 3 mM 8-Bromo-cGMP überführt. Das 8-Bromo-cGMP ist ein Derivat des cGMPs, das membrangängig ist, und nicht durch Phosphodiesterasen hydrolysiert wird. Dadurch akkumuliert sich innerhalb von 30-100 sek eine 8-Bromo-cGMP-Menge in den Zellen, die ausreicht, um die cGMP-Kanäle zu öffnen. Dies führt zu einer Aufnahme von Ca^{2+} und damit zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ von ≤ 100 nM auf ≥ 800 nM. Die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen wurde durch eine Serie von Momentaufnahmen im zeitlichen Abstand von 10-20 sek mit dem Ca^{2+} -Imaging System dokumentiert.

ES-Puffer: 120 mM NaCl, 3 mM KCl, 50 mM Glukose in 10 mM HEPES/ NaOH pH 7,2

3 Ergebnisse

Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle sind die Endglieder der Signaltransduktion bei der Photorezeption und der Olfaktion. Der olfaktorische CNG-Kanal der Ratte wird durch die Untereinheiten rCNC α 3, rCNC α 4 und rCNC β 1b gebildet (Bönigk et al., 1999). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß in einer Subpopulation von Riechzellen CNG-Kanäle aus anderen Untereinheiten gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob zusätzliche CNC α -Untereinheiten, wie sie beispielsweise in Sehzellen vorkommen, im Riechepithel der Ratte exprimiert werden. Dabei wurde eine Untereinheit aus dem Riechepithel, dem Auge und dem Hoden der Ratte kloniert, die als „rCNC α 2“ bezeichnet wurde. Von dieser Untereinheit existieren zwei Spleißvarianten, die als „rCNC α 2a“ bzw. „rCNC α 2b“ bezeichnet wurden. Im Auge ließ sich ausschließlich die kürzere rCNC α 2a-Spleißvariante nachweisen. Im Riechepithel und im Hoden existieren beide Spleißvarianten. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von rCNC α 2a und rCNC α 2b mit anderen CNC α -Untereinheiten ist im Anhang aufgeführt (7.2).

Das Kapitel „Ergebnisse“ gliedert sich in drei Teile. Zunächst wird die Klonierung der rCNC α 2-Untereinheit beschrieben. Im gleichen Teil wird die Modifizierung der Nukleotidsequenz (für die heterologe Expression) und die Herstellung eines Antikörpers gegen diese Untereinheit erläutert. Alle dabei verwendeten Oligonukleotide („Primer“) und deren Hybridisierungsbereiche sind im Anhang aufgeführt (7.1). Die in der Arbeit angegebenen Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäurepositionen beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, auf die rCNC α 2b-Spleißvariante. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse zur Expression *in situ* und zur zellulären Lokalisierung der rCNC α 2-Untereinheit beschrieben. Im dritten Teil wird die heterologe Expression und die Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften der rCNC α 2a- und rCNC α 2b-Kanäle dargestellt.

3.1 Klonierung der CNC α 2-Untereinheit der Ratte (rCNC α 2)

CNC α 2-Untereinheiten wurden aus mehreren Spezies kloniert. Die CNC α 2-Untereinheiten des Huhns (cCNC α 2: Bönigk et al., 1993) und des Menschen (hCNC α 2: Yu et al., 1996; Wissinger et al., 1997) wurden aus der Retina kloniert. Die CNC α 2-Untereinheit wird in der Retina ausschließlich in Zapfenzellen exprimiert. Beim Rind wurde die CNC α 2-Untereinheit

aus dem Hoden kloniert und in Zapfenzellen der Retina nachgewiesen (bCNC α 2: Weyand et al., 1994). Beim Huhn konnten außerdem zwei Spleißvarianten der CNC α 2-Untereinheit aus dem Pinealorgan kloniert werden (pcCNC α 2a und pcCNC α 2b: Bönigk et al., 1996).

Im Riechepithel der Ratte gibt es eine Subpopulation von Riechzellen, die möglicherweise cGMP als sekundären Botenstoff verwenden (Juilfs et al., 1997). Daher konnte vermutet werden, daß eine cGMP-sensitive CNC-Untereinheit, z.B. eine CNC α 2-Untereinheit, auch in Riechzellen der Ratte exprimiert wird. Die Sequenz der CNC α 2-Untereinheit der Ratte war zu Beginn meiner Arbeit nicht bekannt. Allerdings wurde aus dem Zungenepithel der Ratte eine Nukleotidsequenz kloniert, die für eine, als „rCNGgust“ bezeichnete, CNC-Untereinheit kodiert (Misaka et al., 1997). Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt sehr hohe Ähnlichkeit zu den Aminosäuresequenzen der CNC α 2-Untereinheiten des Rindes und des Menschen (> 80 %). Misaka und Mitarbeiter hatten nicht versucht, die Expression dieser Untereinheit in anderen Geweben, wie z.B. Retina und Hoden, nachzuweisen. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit konnte angenommen werden, daß die „rCNGgust“-Untereinheit der CNC α 2-Untereinheit der Ratte (rCNC α 2) entspricht.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Spleißvarianten der rCNC α 2-Untereinheit aus dem Riechepithel, dem Auge und dem Hoden der Ratte kloniert. Die gefundenen Sequenzen weichen im 5'-Bereich von der publizierten „rCNGgust“-Sequenz ab. Es wurden mehrere cDNA-Fragmente isoliert (3.1.1) und zusammengefügt (3.1.3). Die Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der rCNC α 2-Untereinheit ist in der Abbildung 3.1.2.1 dargestellt.

3.1.1 Amplifikation von cDNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR: 2.10) wurden cDNA-Fragmente amplifiziert. Die Lage der amplifizierten Fragmente relativ zur Gesamtsequenz der rCNC α 2-Untereinheit ist in der Abb. 3.1.1.1 schematisch dargestellt.

Zunächst wurde polyadenylierte RNA aus dem Riechepithel der Ratte isoliert (2.8) und durch reverse Transkription nach der „random priming“-Methode (2.9) in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Matrize bei der PCR. Anhand der Nukleotidsequenz der „rCNGgust“-Untereinheit wurden geeignete Primer synthetisiert (2.10.1). Mit den Primern #2165 und #2166 wurde ein Fragment amplifiziert (Bezeichnung: „Fragment-2165/2166“). Die Enden des PCR-Fragments wurden geglättet (2.6.2.1), das Fragment wurde phosphoryliert (2.6.2.2)

und gereinigt (2.5.6). Danach wurde es in die dephosphorylierte EcoRV-Restriktionsschnittstelle eines pBluescriptSK⁻-Vektors (2.2.1) eingefügt (2.6.3) und sequenziert (2.11). Die Nukleotidsequenz des Fragments (Nukleotide 584-1131) entspricht dem korrespondierenden Bereich der „rCNGgust“-Sequenz. Die Hybridisierungsbereiche der Primer #2165 und #2166 liegen in zwei unterschiedlichen Exonen des Gens (Misaka et al., 1997). Da das amplifizierte Fragment keine Intronsequenzen enthielt, mußte es Teil eines gespleißten Transkripts sein. Damit war sichergestellt, daß die „rCNGgust“-Sequenz im Riechepithel transkribiert wird, und daß die Amplifikation des Fragments nicht auf einer Verunreinigung mit genomischer DNA beruhte.

Die CNC α 2-Untereinheit des Rindes wurde in der Retina und im Hoden nachgewiesen (Weyand et al., 1994). Wenn die „rCNGgust“-Untereinheit der rCNC α 2-Untereinheit entspricht, sollte sich die Transkription dieser Untereinheit auch im Auge und im Hoden der Ratte nachweisen lassen. Daher wurde polyadenylierte RNA auch aus diesen Organen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNAs aus dem Riechepithel, dem Auge und dem Hoden wurden als Matrize für weitere PCR-Experimente verwendet. Zunächst wurde versucht, ein Fragment aus dem 3'-Bereich des Gens zu amplifizieren. Mit den Primern #2168 und #2169 ließ sich aus den verschiedenen cDNAs jeweils ein Fragment gleicher Größe amplifizieren. Die Fragmente wurden, wie für das Fragment-2165/2166 beschrieben, in einen Vektor eingefügt (Bezeichnung: „pBlue-2168/2169“) und sequenziert. Die Sequenzen der Fragmente, die aus den verschiedenen cDNAs amplifiziert wurden, waren identisch. Das jeweils amplifizierte Fragment (Nukleotide 1090-2089; Bezeichnung: „3'-Fragment-2168/2169“) entspricht dem korrespondierenden Bereich der „rCNGgust“-Sequenz. Das Fragment enthält im 3'-Ende das Stopkodon (Nukleotide 2011-2013; TGA) und einen Teil des nicht-kodierenden Bereichs (Nukleotide 2014-2089).

Um Fragmente aus dem 5'-Bereich des Gens zu erhalten, wurden verschachtelte PCR-Experimente (2.10.2.2) mit den Primerpaaren #2191, #2179 und #2192, #2166 durchgeführt. Dabei wurde aus cDNA aus dem Riechepithel, dem Auge und dem Hoden jeweils ein Fragment gleicher Größe amplifiziert. Die Fragmente wurden, wie bereits beschrieben, in einen Vektor eingefügt (Bezeichnung: „pBlue-2192/2166“) und sequenziert. Die Sequenzen der Fragmente, die mit den verschiedenen cDNAs amplifiziert wurden, waren identisch. Das jeweils amplifizierte Fragment (Nukleotide 233-1131; Bezeichnung: „5'-Fragment-2192/2166“) entsprach dem korrespondierenden Bereich der „rCNGgust-Sequenz“ mit Ausnahme eines Nukleotids (3.1.2).

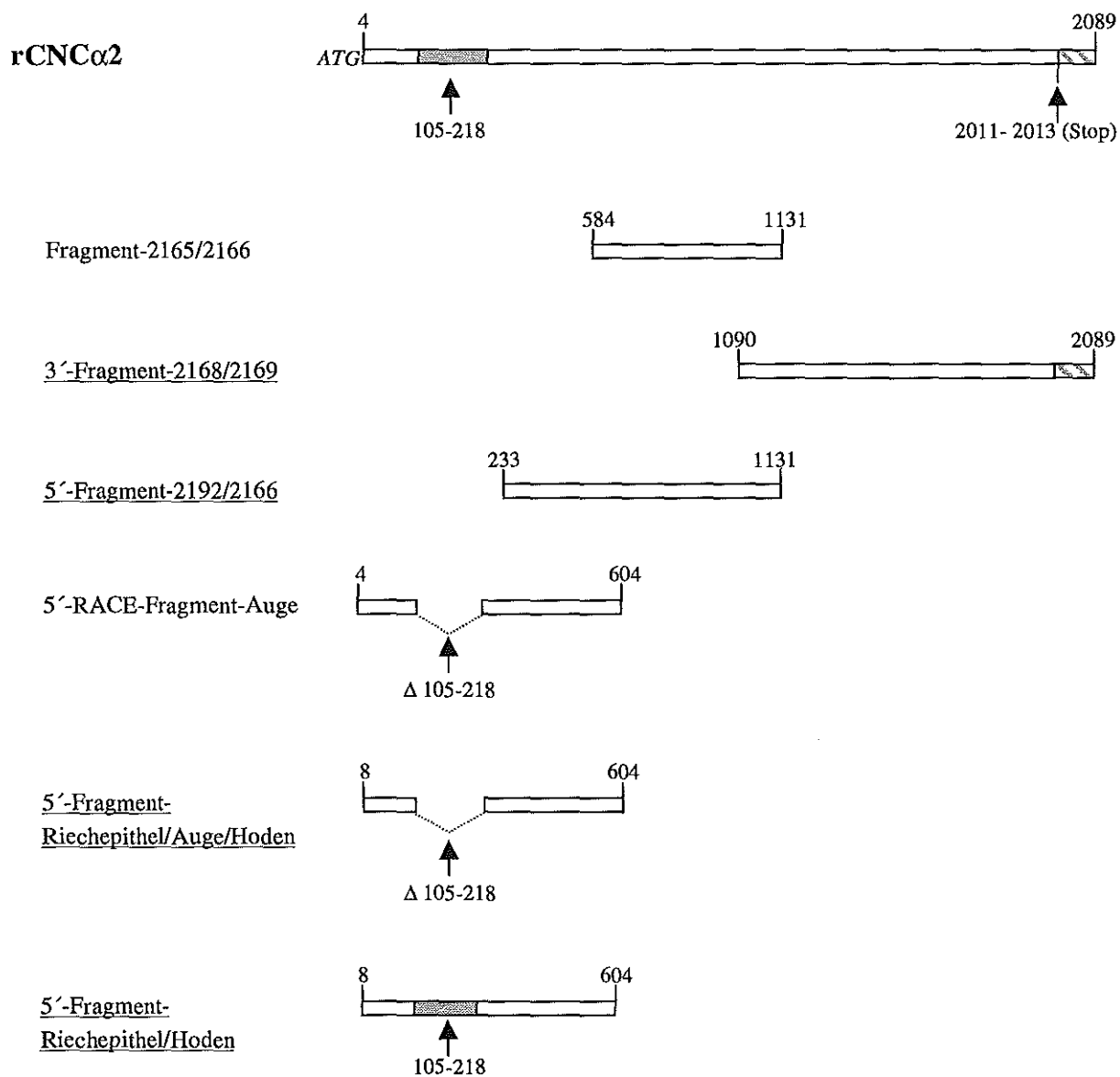


Abb. 3.1.1.1: Lage der amplifizierten Fragmente relativ zur Gesamtsequenz rCNC α 2 (2089 bp). Nukleotidsequenzen sind schematisch als waagerechte Balken dargestellt. Der kodierende Bereich reicht von Nukleotid 1 (Start: Adenyllylnukleotid des ATG-Kodons) bis 2013 (Stop: TGA). Das Segment, das nur in der rCNC α 2b-Spleißvariante vorkommt (Nukleotide 105-218), ist grau dargestellt. Das Fehlen dieses Segments (Δ 105-218) ist durch eine gestrichelte Klammer angedeutet. Der nicht-kodierende 3'-Bereich (Nukleotide 2014-2089) ist schraffiert dargestellt. Nukleotidpositionen sind durch senkrechte Striche markiert. Das ergänzte Startkodon (ATG) ist kursiv geschrieben. Die Bezeichnung der Fragmente ist am linken Bildrand angegeben. Fragmente, deren Bezeichnungen unterstrichen sind, wurden verwendet, um die vollständigen Sequenzen herzustellen (Abb. 3.1.3.1 und 3.1.3.2).

Die amplifizierten 5'- und 3'-Fragmente enthielten keine Intronsequenzen. Dies zeigte, daß das Gen für die „rCNGgust“-Untereinheit im Riechepithel, im Auge und im Hoden der Ratte transkribiert wird. Der Nachweis der Transkription dieser Sequenz im Auge und im Hoden stützte die Annahme, daß es sich bei der „rCNGgust“-Untereinheit um die rCNC α 2-Untereinheit handelt.

Das vollständige 5'-Ende der rCNC α 2-Sequenz sollte durch verschachtelte PCR-Experimente amplifiziert werden. Es wurden Primer synthetisiert, die im nicht-kodierenden 5'-Bereich bzw. im Beginn der „rCNGgust“-Sequenz hybridisieren sollten (7.1.2: #2189 und #2190). Mit den Primerpaaren #2189, #2179 und #2190, #2166 und den verschiedenen cDNAs als Matrize konnte jedoch kein Fragment amplifiziert werden. Daraus muß gefolgert werden, daß das 5'-Ende der rCNC α 2-Untereinheit vom 5'-Ende der publizierten „rCNGgust“-Sequenz abweicht.

Um das 5'-Ende der rCNC α 2-Sequenz zu isolieren, wurde eine „random geprimte“ λ -ZAPII-Phagen-cDNA-Bibliothek durchsucht (2.4, 2.7.1.2, 2.7.1.5). Diese cDNA-Bibliothek wurde mit cDNA aus dem Riechepithel der Ratte hergestellt und mir freundlicherweise von Dr. J. Bradley (Ecole Normale Supérieure, Paris/ Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Bibliothek wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (2.7.1.4, 2.7.1.5) durchsucht. Als Sondenmatrize wurde ein PCR-Fragment (Nukleotide 233-1131) verwendet, das mit den Primern #2192 und #2166 hergestellt worden war. Mit der spezifischen Sonde wurden mehr als 10^6 unabhängige Phagenklone untersucht. Es wurde kein positiver Klon detektiert.

Daher wurde versucht, das 5'-Ende der rCNC α 2-Untereinheit durch die „5'-RACE-PCR“-Methode (2.10.2.3) zu amplifizieren. Aus dem Riechepithel, dem Auge und dem Hoden der Ratte wurde polyadenylierte RNA isoliert (2.8) und als Matrize für die Herstellung genspezifischer cDNA (2.9) verwendet. Für die cDNA-Synthese wurde der Primer #2193 verwendet (Abb. 2.10.2.3). Durch Polyadenylierung wurde die cDNA am 3'-Ende mit einer Folge von Desoxyadenylnukleotiden versehen. Diese modifizierte cDNA wurde als Matrize für die 5'-RACE-PCR verwendet. Eine erste PCR wurde mit dem Oligo-dT-Anchor-Primer und dem Primer #2194 durchgeführt (Abb. 2.10.2.3). Mit den Produkten der ersten PCR als Matrize, dem Anchorprimer und dem Primer #2195 wurde eine zweite PCR durchgeführt (Abb. 2.10.2.3). Die Produkte der zweiten PCR wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt (2.5.4), auf eine Membran übertragen (2.7.1.1) und mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde getestet. Als Sondenmatrize wurde ein PCR-Fragment verwendet, das mit den Primern #2192 und #2166 hergestellt worden war (Nukleotide 233-1131). Die Sonde detektierte keine

distinkten Banden, sondern hybridisierte mit PCR-Produkten, die sich gleichmäßig über einen Größenbereich von ca. 400-2000 bp verteilen. Die PCR-Produkte im Größenbereich von ca. 450-800 bp wurden gereinigt und in die EcoRV-Klonierungsstelle des Vektors pBluescriptSK⁻ eingefügt. *E.coli*-Zellen wurden mit den hergestellten Plasmiden transformiert und anschließend ausplattiert. Diese Zellen wurden mit Hilfe der „Kolonie-Hybridisierung“ (2.7.1.3) untersucht. Die Filterabzüge der Kulturplatten wurden mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Als Sondenmatrize wurde erneut das PCR-Fragment verwendet, das mit den Primern #2192 und #2166 hergestellt worden war (s.o.). Positive Klone wurden isoliert und sequenziert.

Dabei wurde ein 5'-RACE-Fragment gefunden (Nukleotide 4(Δ105-218)-604; Bezeichnung: „5'-RACE-Fragment-Auge“), das die Nukleotide 4-104 enthielt. Den Nukleotiden 4-104 folgte ein Bereich (Nukleotide 219-232), der aus der publizierten „rCNGgust“-Sequenz bekannt war. Dieser Sequenz folgte ein Nukleotidbereich (Nukleotide 233-604), der bereits aus dem Riechepithel, dem Auge und dem Hoden der Ratte kloniert worden war (s.o.). Dem gefundenen 5'-RACE-Fragment fehlte der zu diesem Zeitpunkt unbekannte Sequenzabschnitt, der die Nukleotide 105-218 umfaßte.

Mehrere Fragmente wurden isoliert, die den Übergang der Nukleotide 4(Δ105-218)-232 in bereits klonierte Sequenzbereiche (Nukleotide 233-604) belegten. Es wurde jedoch kein Klon gefunden, der ein Startkodon enthält. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Nukleotide 4-104 mit den N-Termini bekannter CNCo₂-Kanäle legt nahe, daß der gefundenen Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit nur das Startkodon fehlt (Abb. 3.1.1.2). In den Abbildungen 3.1.1.1 und 3.1.2.1 wurde daher ein Startkodon bzw. das abgeleitete Methionin ergänzt und durch kursive Schreibweise markiert. Die 5'-RACE-Fragmente, denen die Nukleotide 105-218 fehlen, wurden aus Ansätzen isoliert, bei denen als Matrize cDNA aus dem Auge verwendet wurde. Um die 5'-Sequenzen aus dem Riechepithel und dem Hoden zu

5'-RACE-Fragment-Auge	- <u>AKVNTQCSQPSPRQLSVKDAADRDLDQVENGLG</u>
bcNCα ₂	<u>MAKISTQYSHPTRTHPSVR</u> -TMDRDLDCI <u>ENGLS</u>
hNCα ₂	<u>MAKINTQYSHPSRTHLEVK</u> -TSDRDLNRA <u>ENGLS</u>
cNCα ₂	<u>MAKINTQHSYPGMHGLSVR</u> -TTDEDIERI <u>ENGFI</u>

Abb. 3.1.1.2: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der 5'-terminalen Nukleotide des isolierten 5'-RACE-Fragments (5'-RACE-Fragment-Auge) mit den N-terminalen Aminosäuresequenzen bekannter CNCo₂-Untereinheiten. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist mit den N-Termini der CNCo₂-Untereinheiten des Rindes (bcNCα₂), des Menschen (hNCα₂; Yu et al., 1996) und des Huhns (cNCα₂) verglichen. Es sind jeweils die ersten 33 Aminosäuren aufgeführt. Aminosäuren, die in allen vier Sequenzen identisch sind, sind fett gedruckt. Aminosäuren, die (maximal) in drei der Sequenzen identisch sind, sind unterstrichen.

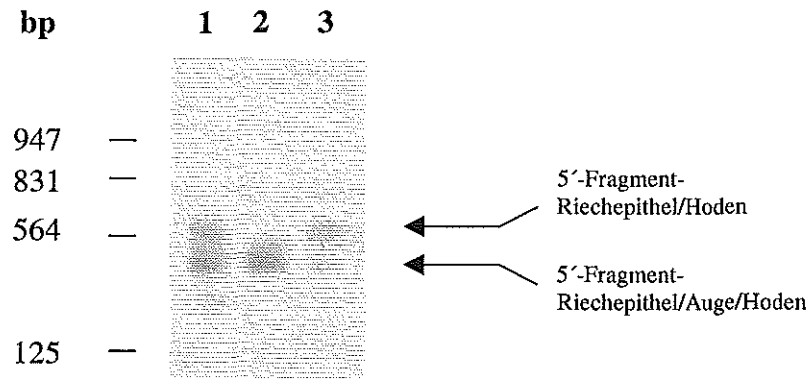


Abb. 3.1.1.3: Southernblot-Analyse der aus cDNA amplifizierten, terminalen 5'-Fragmente (Beschreibung im Text). Als Matrize wurden folgende cDNAs verwendet: Spur 1: Riechepithel, Spur 2: Auge, Spur 3: Hoden. Es wurden jeweils ca. 10 ng DNA auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die DNA wurde auf eine Membran übertragen und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert. Die schwache Bande in Spur 1 bei ca. 220 bp ist wahrscheinlich ein PCR-Artefakt. Als Marker wurde λ -DNA verwendet, die mit EcoRI und HindIII geschnitten worden war (MBI Fermentas/ Litauen).

bestimmen, wurden verschachtelte PCR-Experimente durchgeführt. Als Matrize diente jeweils cDNA aus dem Riechepithel, dem Hoden und dem Auge. Anhand der terminalen 5'-Sequenz (5'-RACE-Fragment-Auge) wurden die Primer #2364 und #2365 synthetisiert. Mit den Primerpaaren #2364, #2194 und #2365, #2195 wurden 5'-Fragmente amplifiziert. Die Produkte der PCR wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran übertragen (2.7.1.1) und mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (Abb. 3.1.1.3). Als Sondenmatrize wurde ein PCR-Fragment verwendet (Nukleotide 227-579), das mit den Primern #2191 und #2206 hergestellt worden war. Aus allen drei cDNAs wurde ein Fragment mit einer Länge von 483 bp amplifiziert. Aus cDNA aus dem Riechepithel und dem Hoden wurde ein zusätzliches, größeres Fragment mit einer Länge von 597 bp amplifiziert. Die Fragmente wurden, wie oben beschrieben, in einen Vektor eingefügt und sequenziert. Die Sequenz des kürzeren Fragments ist identisch zur „5'-RACE-Fragment-Auge“-Sequenz, beginnt jedoch aufgrund des verwendeten Primers #2365 mit dem Nukleotid 8. Dieses Fragment wurde als „5'-Fragment-Riechepithel/Auge/Hoden“ bezeichnet (Nukleotide 8(Δ 105-218)-604). Das größere Fragment, das nur aus cDNA aus dem Riechepithel bzw. dem Hoden amplifiziert wird, wurde als „5'-Fragment-Riechepithel/Hoden“ bezeichnet (Nukleotide 8-604). Es besitzt einen Einschub von 114 Nukleotiden (Nukleotide 105-218). Dieser Einschub zeigt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz sehr große Homologie zu einem Segment aus den N-terminalen Sequenzen bekannter CNC α 2-Untereinheiten (7.2). Die Ergebnisse zur Klonierung der rCNC α 2-Untereinheit sollen hier zusammengefaßt werden: Die rCNC α 2-Untereinheit existiert im Riechepithel und dem Hoden in zwei Varianten,

die sich durch eine Insertion (Nukleotide 105-218) unterscheiden. An den Grenzen der Insertion findet sich jeweils eine Konsensussequenz für einen Exon-Exon-Übergang (AGGN; Mount et al., 1982). Es handelt sich bei den gefundenen Varianten daher sehr wahrscheinlich um Spleißvarianten eines Gens. Im Auge wird ausschließlich die Spleißvariante gefunden, der die Nukleotide 105-218 fehlen. Diese Form der rCNC α 2-Untereinheit wurde als „rCNC α 2a“-Spleißvariante bezeichnet. Die längere Form wurde als „rCNC α 2b“-Spleißvariante bezeichnet. In Abb. 3.1.2.1 ist die Sequenz der rCNC α 2-Untereinheit dargestellt.

3.1.2 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der rCNC α 2-Untereinheit

<u>ATGGCCAAGGTCAATACCCAATGCTCACAGCCCTCCCCGAGACAAC</u> <u>TTTCAGTAAAGGAC</u>	60
<u>M</u> A K V N T Q C S Q P S P R Q L S V K D	20
* *	
GCCGCAGACAGAGACCTCGATCAAGTGGAGAATGGCCTCGGCAG <u>GTCTCACTCACCATGT</u>	120
A A D R D L D Q V E N G L G R S H S P C	40
<u>GAGGAGACATCTTCCACAGTGCATCAGGGGATCGTCATGGAGACCGGAGA</u> <u>ACTGGCTGGA</u>	180
E E T S S T V H Q G I V M E T G E L A G	60
GCCGCACAGAGTTTATTCACAAGCCAGGGGCCAGCCAGGGTGTACGCTTCATCATCTCC	240
A A Q S L F T S Q G P A R V S R F I I S	80
*	
ATTCGTGCGTGGGCCGCCAGGCACTTACACCATGAAGACCCGACGCCTGACTCCTTTTGTG	300
I R A W A A R H L H H E D P T P D S F L	100
GATCGTTTTCATGGAGCTGAGCTTAAGGAAGTATCCAGCCAGGAAAGGAATGCCAGCCC	360
D R F H G A E L K E V S S Q E R N A Q P	120
AACCCAGGAGGACAGGAACCACCAGAGGGAGGGAAAGGCAGGAAGAAGGATCCCATTTGTG	420
N P G G Q E P P E G G K G R K K D P I V	140
S1	
GTGGACCCCTCCAGCAACATCTACTACCGCTGGCTGACTGCCATCGCCCTCCCGGTCTTC	480
V D P S S N I Y Y R W L T A I A L P V F	160
TATAACTGGTGTCTACTTGTGTGCAGGGCCTGTTTTGATGAGCTACAGTCAGAACACCTG	540
Y N W C L L V C R A C F D E L Q S E H L	180
S2	
ACACTGTGGCTGGTCCTGGACTACTCTGCAGATGCCCTGTATGTTGTGGACATGCTGGTT	600
T L W L V L D Y S A D A L Y V V D M L V	200
CGTGCCCGGACAGGTTTCCTTGAACAAGGCCTAATGGTCAGGGATACCAAGAGGCTGTGG	660
R A R T G F L E Q G L M V R D T K R L W	220
*	
S3	
AAACATTACACAAAGACCTTGCACTTCAAGCTGGACATCCTGTCTCTCATCCCCACAGAC	720
K H Y T K T L H F K L D I L S L I P T D	240
S4	
CTGGCTTATTTGAAGTTGGGCATGAACTACCCGGAAGTGAAGTTCAATCGCCTCCTGAGG	780
L A Y L K L G M N Y P E L R F N R L L R	260
TTCTCTCGGCTCTTTGAGTTCTTTGACCGCACGGAGACAAGGACCAACTACCCCAATGTG	840
F S R L F E F F D R T E T R T N Y P N V	280
S5	
TTCAGGATAGGGAAGTTGGTTCTGTACACCCTCATTATCATCCACTGGAACGCCTGCATC	900
F R I G N L V L Y T L I I I H W N A C I	300

TACTTTGCCATTTCCTAAGTTCATCGGTTTGGAAACAGATTCTGGGTCTATCCAAACACC 960
Y F A I S K F I G F G T D S W V Y P N T 320
ψ

TCCAAGCCGGAGTATGGACGCCTCTCCAGGAAGTACATTTACAGCCTCTACTGGTCCACC 1020
S K P E Y G R L S R K Y I Y S L Y W S T 340

Porenregion

TTGACCCTGACCACCATTGGGGAGACCCCGCCCCCGTGAAGGATGAGGAGTATCTCTTT 1080
L T L T T I G E T P P P V K D E E Y L F 360

S6

GTGGTCATAGACTTCCTGGTGGGCGTCTGATCTTCGCCACTATAGTAGGCAATGTGGGC 1140
V V I D F L V G V L I F A T I V G N V G 380

TCCATGATTTCCAACATGAACGCTTCCCGGGCGGAGTTCCAGGCTAAGATAGATTCCATC 1200
S M I S N M N A S R A E F Q A K I D S I 400

AAGCAGTACATGCAGTTCCGGAAGGTAACCAAGGACTTGGAGACTCGGGTTATCCGGTGG 1260
K Q Y M Q F R K V T K D L E T R V I R W 420

TTTGACTATCTGTGGGCTAACAGGAAGACGGTGGATGAAAAGGAAGTGCTCAAAAACCTC 1320
F D Y L W A N R K T V D E K E V L K N L 440

CCAGACAAGCTGAAGGCCGAGATCGCCATCAACGTGCACCTGGACACACTGAAGAAAGTC 1380
P D K L K A E I A I N V H L D T L K K V 460
*

CGAATCTTCCAGGACTGCGAGGCAGGGCTTCTGGTGGAGCTGGTGCTGAAGCTTCGTCCT 1440
R I F Q D C E A G L L V E L V L K L R P 480

GCTGTGTTTCAGCCCTGGGGACTACATTTGCAAAAAGGGGGACATTGGAAGGGAGATGTAC 1500
A V F S P G D Y I C K K G D I G R E M Y 500

cNMP-Bindestelle

ATCATCAAGGAGGGCAAGCTGGCTGTCGTGGCTGACGATGGGGTCACCCAGTTTGTGGTC 1560
I I K E G K L A V V A D D G V T Q F V V 520

CTCAGTGATGGCAGTTACTTTGGGGAGATCAGCATCTTAAACATTAAGGGGAGCAAGTCG 1620
L S D G S Y F G E I S I L N I K G S K S 540

GGGAACCGCAGGACAGCCAACATCAGGAGCATCGGCTACTCGGACCTGTTCTGCCTCTCC 1680
G N R R T A N I R S I G Y S D L F C L S 560

AAGGATGACTTGATGGAGACCCTCACGGAGTACCCGGATGCTAAGAGGGCTCTGGAGGAA 1740
K D D L M E T L T E Y P D A K R A L E E 580

AAGGGTCGGCAGATTCTGATGAAGGACAACCTAATCGATGACGACCTGGTGACGGCCAGG 1800
K G R Q I L M K D N L I D D D L V T A R 600
*

GCAGATGCCAGGAACATCGAGGAGAAGGTGGAGTACCTGGAGTCATCCTTGGACGGCCTG	1860
A D A R N I E E K V E Y L E S S L D G L	620
CAGACGAGGTTTCGCCCCGACTCCTGGCTGAGTACAGTGCCTCCCAGATGAAGCTGAAACAG	1920
Q T R F A R L L A E Y S A S Q M K L K Q	640
CGGCTCAGCCAGCTGGAGAGCCAGATGACCAGGAGGGGTCATGGCTTCTCACCTGACAGG	1980
R L S Q L E S Q M T R R G H G F S P D R	660
	*
GAGAATTCCGAGGATGCTTCAAAGCTGACTGAAAATGCAGGTGGCTCTGCCTCCTGCTT	2040
E N S E D A S K A D -	670
CCCAGGGCCAGCTGCCAGTGAGACACTTTACAGCCTCGTGGTGAAGAGT	2089

Abb. 3.1.2.1: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der rCNC α 2-Untereinheit. Dargestellt ist die rCNC α 2b-Spleißvariante. Die Nukleotide sind in 5'→3'-Richtung numeriert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist unter der Nukleotidsequenz angegeben und ebenfalls numeriert. Die Nukleotide und abgeleiteten Aminosäuren, die der rCNC α 2a-Spleißvariante fehlen (Nukleotide 105-218), sind durch fetten Druck gekennzeichnet. Die Nukleotide dieses Bereichs sind zusätzlich unterstrichen. Das Startkodon (ATG) und das abgeleitete Methionin wurden ergänzt und sind durch kursive Schreibweise markiert. Das Startkodon, das abgeleitete Methionin und das Stopkodon (TGA) sind unterstrichen. Die Lage der putativen transmembranalen Segmente S1-S6, der Porenregion und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) ist durch Balken über der Nukleotidsequenz angegeben. Die Grenzen dieser Bereiche wurden durch Sequenzvergleich mit anderen CNC α 2-Kanälen (Bönigk et al., 1993; Weyand et al., 1994; Bönigk et al., 1996) festgelegt. Exongrenzen, die von Misaka und Mitarbeitern (1997) identifiziert wurden, sind durch (▼) gekennzeichnet. Exongrenzen, die aufgrund der gefundenen Spleißvarianten abgeleitet wurden, sind durch (▽) gekennzeichnet. Potentielle Phosphorylierungsstellen für cAMP/cGMP-abhängige Kinasen (•), Proteinkinase C (*) und eine potentielle Glykosylierungsstelle (ψ) sind ebenfalls gekennzeichnet.

Die cDNA von rCNC α 2a kodiert für ein Protein von 632 Aminosäuren mit einer errechneten Molmasse von 72,5 kDa. Die cDNA von rCNC α 2b weist einen Einschub von 114 bp (Nukleotide 105-218) auf und kodiert für ein Protein von 670 Aminosäuren mit einer errechneten Molmasse von 76,4 kDa. Die Sequenzen sind ab der Nukleotidposition 219 bis auf eine Ausnahme identisch zur publizierten „rCNGgust“-Sequenz (Misaka et al., 1997). An Nukleotidposition 323 wurde ein Thymidyl- anstelle eines Cytidylnukleotids gefunden. Diese Abweichung wurde durch mehrere unabhängige PCR-Experimente bestätigt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz enthält daher an Position 108 ein Leucin anstelle eines Prolins. Alle bekannten CNC α 2-Untereinheiten besitzen an der korrespondierenden Position ein konserviertes Leucin. Daher ist ein Sequenzierfehler durch Misaka und Mitarbeiter (1997) sehr wahrscheinlich.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Spleißvarianten zeigen sehr große Ähnlichkeit zu bekannten CNC α 2-Untereinheiten. Für die rCNC α 2b-Untereinheit ist hier im Vergleich zu anderen CNC α 2-Untereinheiten der Prozentsatz der identischen bzw. der konservativ

substituierten Aminosäuren (in Klammern) angegeben: cCNC α 2 (76,4 % bzw. 11,5 %), bCNC α 2 (82,7 % bzw. 8,2 %) und hCNC α 2 (81,6 % bzw. 8,2 %).

Die Spleißvarianten rCNC α 2a und rCNC α 2b weisen sechs putative transmembranale Segmente (S1-S6), eine Porenregion und eine Bindestelle für zyklische Nukleotide auf. Beiden Spleißvarianten fehlt im Vergleich zu bekannten CNC α 2- und CNC α 1-Untereinheiten ein Bereich N-terminal vom ersten transmembranalen Segment, in dem überdurchschnittlich viele geladene Aminosäuren vorkommen (7.2). Die Funktion dieses hydrophilen Bereichs, der auch in den CNC α 3- und CNC α 4-Untereinheiten (und der pcCNC α 2b-Spleißvariante) fehlt, ist noch unbekannt.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Spleißvarianten unterscheiden sich durch einen Einschub von 38 Aminosäuren im N-Terminus. In diesem Bereich befindet sich in einigen CNC α -Untereinheiten eine Calmodulinbindestelle. Durch den Spleißvorgang werden in diesem Bereich unterschiedliche Nukleotidsequenzen erzeugt, die in der abgeleiteten Aminosäuresequenz unterschiedliche putative Calmodulinbindestellen ergeben. Calmodulinbindestellen bestehen aus ca. 20 Aminosäuren und binden Calmodulin mit nanomolarer Affinität. Sie weisen ein Motiv auf, das als „1-5-8-14“-Motiv bezeichnet wird (O'Neil & DeGrado, 1990; Crivici & Ikura, 1995). An den Positionen 1 und 14 befinden sich häufig aliphatische oder aromatische Aminosäuren. An den Positionen 5 und 8 befinden sich häufig hydrophobe Aminosäuren.

In der Abbildung 3.1.2.2 sind die putativen Calmodulinbindestellen der Spleißvarianten rCNC α 2a und rCNC α 2b und die korrespondierenden Bereiche anderer CNC α -Untereinheiten dargestellt. Am besten untersucht ist die Calmodulinbindestelle der rCNC α 3-Untereinheit, die Calmodulin mit hoher Affinität bindet ($K_D=3,4$ nM; Liu et al., 1994). Die Bindung von

	1	5	8	14	
rCNC α 2a	DQVENGLGRV	<u>S</u> R	<u>F</u> I	IISIRAWAARHLH	(27-52)
rCNC α 2b	FTSQGP-ARV	<u>S</u> R	<u>F</u> I	IISIRAWAARHLH	(66-90)
bCNC α 2	FTSQGP-TRL	<u>S</u> R	<u>L</u> I	IISLRAW SARHLH	(65-89)
cCNC α 2	FTGRGAMARL	<u>S</u> R	<u>F</u> V	VSLRSWATRHLH	(65-90)
rCNC α 3	RRGRGGFQRI	<u>V</u> R	<u>L</u> V	GVIRDWANKNFR	(62-87)

Abb. 3.1.2.2: Vergleich der putativen Calmodulin-Bindestellen der rCNC α 2-Spleißvarianten mit den korrespondierenden Bereichen anderer CNC α -Untereinheiten (Erläuterung im Text). Dargestellt sind Bereiche aus den Spleißvarianten rCNC α 2a und rCNC α 2b, aus den CNC α 2-Untereinheiten des Rindes (bCNC α 2), des Huhns (cCNC α 2), sowie aus der CNC α 3-Untereinheit der Ratte (rCNC α 3). Die Position der Sequenzabschnitte ist jeweils rechts angegeben. Die Aminosäuren, die das „1-5-8-14“-Motiv bilden, sind unterstrichen.

Calmodulin an die rCNC α 3-Untereinheit im olfaktorischen Kanal vermindert die Ligandensensitivität des Kanals für cAMP um einen Faktor von 20 (Chen & Yau, 1994). Die cCNC α 2-Untereinheit enthält an Position 1 des 1-5-8-14-Motivs ein Methionin anstelle eines Phenylalanins. An Position 5 findet man ein Serin anstelle eines Valins. Calmodulin vermindert die Ligandensensitivität des heterolog exprimierten cCNC α 2-Kanals um den Faktor 1,5-2 (Bönigk et al., 1996).

Die putative Calmodulinbindestelle der bCNC α 2-Untereinheit besitzt an der ersten Position des 1-5-8-14-Motivs keine aliphatische oder aromatische Aminosäure. Ein Peptid, das den Bereich der putativen Bindestelle enthält, bindet Calmodulin mit einer Affinität von ca. 120 nM (Dr. K.W. Koch, persönliche Mitteilung). Heterolog exprimierte bCNC α 2-Kanäle werden jedoch nicht durch Calmodulin moduliert (Dr. F. Müller, persönliche Mitteilung).

Die putative Calmodulinbindestelle der rCNC α 2a-Spleißvariante ähnelt im 1-5-8-14-Motiv am meisten der Calmodulinbindestelle der cCNC α 2-Untereinheit. Die beiden CNC α 2-Untereinheiten unterscheiden sich im 1-5-8-14-Motiv an der ersten und der achten Position. An Position 1 findet man ein Leucin anstelle eines Methionins. An Position 8 findet man ein Isoleucin anstelle eines Valins. Die putative Calmodulinbindestelle der rCNC α 2b-Variante ähnelt hingegen mehr der Calmodulinbindestelle der bCNC α 2-Untereinheit, da bei beiden Untereinheiten an der ersten Position des 1-5-8-14-Motivs weder eine aliphatische, noch eine aromatische Aminosäure vorkommt. Aus diesem Grund wurde die erste Position des 1-5-8-14-Motivs dieser beiden Untereinheiten in der Abbildung 3.1.2.2 als „Leerstelle“ angegeben. Ob die Sequenzunterschiede von rCNC α 2a und rCNC α 2b im Bereich der putativen Calmodulinbindestelle funktionelle und physiologische Bedeutung haben, sollte durch heterologe Expression dieser Spleißvarianten in HEK 293-Zellen und Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der gebildeten Kanäle geklärt werden. Die Sequenzen, die für die vollständigen Spleißvarianten kodieren, wurden aus den klonierten Einzelfragmenten (3.1.1) zusammengesetzt und in einen Expressionsvektor eingefügt (3.1.3). Die Spleißvarianten wurden in HEK 293-Zellen heterolog exprimiert und elektrophysiologisch charakterisiert (3.3.2).

3.1.3 Modifizierung der rCNC α 2-Sequenz für die heterologe Expression in HEK 293-Zellen

Die Nukleotidsequenzen, die für die vollständige rCNC α 2a- bzw. die rCNC α 2b-Spleißvariante (3.1.2) kodieren, wurden unter Verwendung der klonierten Fragmente (Abb. 3.1.1.1) zusammengefügt. Die Fragmente fungierten als Matrizen für die PCR-Synthese von Zwischenprodukten. Diese wurden in den Vektor pBluescriptSK⁻ eingefügt und mit Hilfe von Restriktionsschnittstellen zusammengesetzt. Zunächst wurde ein Plasmid hergestellt, das die Nukleotide 235-2013 enthält (Abb. 3.1.3.1; Bezeichnung: „pBlue-rCNC α 2 Δ NT“). Dieser Bereich ist in den Spleißvarianten rCNC α 2a und rCNC α 2b identisch. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz (I79- D670) ergibt sich eine verkürzte rCNC α 2-Untereinheit (Bezeichnung: „rCNC α 2 Δ NT“), der ein Teil des N-Terminus fehlt (7.2). Diese Sequenz wurde in den Vektor pcDNAIamp umkloniert (Abb. 3.1.3.1). Mit dem entstandenen Plasmid (Bezeichnung: „pcDNA-rCNC α 2 Δ NT“) und den terminalen 5'-Fragmenten (Abb. 3.1.1.1: 5'-Fragment-Riechepithel/Auge/Hoden bzw. 5'-Fragment-Riechepithel/Hoden) wurden die Sequenzen, die für die vollständige rCNC α 2a- bzw. die rCNC α 2b-Spleißvariante kodieren, hergestellt (Abb. 3.1.3.2). Die Sequenzen wurden dann jeweils in den Vektor pcDNAIamp Δ Hind (s.u.) eingefügt (Bezeichnung: „pcDNA-rCNC α 2a“ und „pcDNA-rCNC α 2b“). Diese Plasmide und das Plasmid pcDNA-rCNC α 2 Δ NT wurden zur heterologen Expression der vollständigen Spleißvarianten bzw. der N-terminal verkürzten Mutante der rCNC α 2-Untereinheit in HEK 293-Zellen verwendet (3.3).

Hier soll nun zunächst die Herstellung des Plasmids pcDNA-rCNC α 2 Δ NT erläutert werden (Abb.3.1.3.1). Mehrere Zwischenprodukte wurden durch PCR hergestellt. Für die Herstellung eines 3'-Fragments wurde das Plasmid pBlue-2168/2169 als Matrize verwendet, das die Nukleotide 1090-2089 enthält (3.1.1). Die PCR wurde mit den Primern #2168 und #2251 durchgeführt. Durch den Primer #2251 wurde eine XbaI-Restriktionsschnittstelle im Anschluß an das Stopkodon (Nukleotide 2011-2013) in das PCR-Produkt (Bezeichnung: „3'-Fragment-2168/2251“) eingeführt. Für die Herstellung eines 5'-Fragments wurde das Plasmid pBlue-2192/2166 als Matrize verwendet, das die Nukleotide 233-1131 enthält (3.1.1). Die PCR wurde mit den Primern #2250 und #2166 durchgeführt. Durch den Primer #2250 wurde eine ideale ribosomale Bindestelle (Kozak-Sequenz: CCACC; Kozak, 1984) und daran anschließend ein Startkodon (ATG) unmittelbar vor das Nukleotid 235 in das PCR-Produkt (Bezeichnung: „5'-Fragment-2250/2166“) eingeführt.

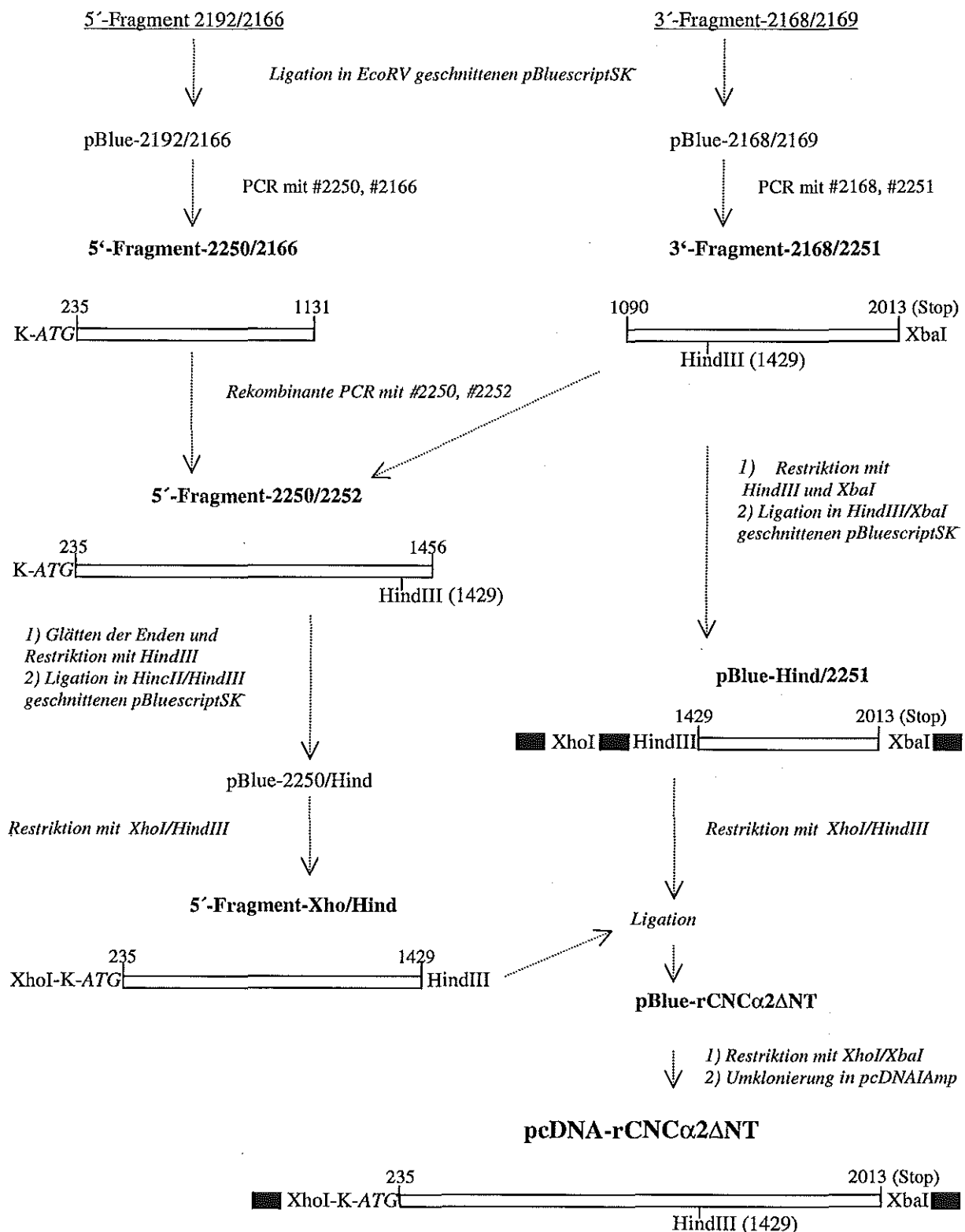


Abb. 3.1.3.1: Schematische Darstellung der Herstellung des pcDNA-rCNCα2ΔNT-Plasmids für die heterologe Expression in HEK 293-Zellen (Erläuterung im Text). Ausgewählte Fragmente bzw. Plasmide sind schematisch dargestellt. Die Fragmente sind als waagerechte Rechtecke, Plasmidsequenzen als schwarze Balken dargestellt. Ausgewählte Restriktionsschnittstellen sind eingetragen. Nukleotidpositionen sind durch senkrechte Striche markiert. Das ergänzte Startkodon ist kursiv geschrieben. Die relative Lage der Ausgangsprodukte 5'-Fragment-2192/2166 und 3'-Fragment-2168/2169 zur Gesamtsequenz rCNCα2 ist in Abb. 3.1.1.1 veranschaulicht. Verwendete Abkürzung: K: Kozak-Sequenz (CCACC).

Das 5'-Fragment-2250/2166 wurde nun durch eine sogenannte „rekombinante“ PCR in 3'-Richtung verlängert. Das Fragment überlappt mit dem 3'-Fragment-2168/2251 (Abb. 3.1.3.1; Nukleotide 1090-1131). Bei einer rekombinanten PCR fungieren zwei Fragmente, die überlappen, wechselseitig als Startpunkt für die Polymerase und als Matrize. Die PCR wurde mit dem 5'- und dem 3'-Fragment und den Primern #2250 und #2252 durchgeführt. Dadurch entstand ein PCR-Produkt (Bezeichnung: „5'-Fragment-2250/2252“), das bis zur Nukleotidposition 1456 verlängert worden war. Das 5'-Fragment-2250/2252 und das 3'-Fragment-2168/2251 weisen einen überlappenden Bereich auf, der die HindIII-Restriktionsschnittstelle (Nukleotid 1429) enthält. Die Enden des 5'-Fragments wurden geglättet. Danach wurde das Fragment mit HindIII geschnitten und in einen HincII und HindIII geschnittenen pBlue-scriptSK-Vektor eingefügt (Bezeichnung: „pBlue-2250/Hind“). Das Plasmid pBlue-2250/Hind wurde dann mit XhoI und HindIII geschnitten. Das dabei entstandene 5'-Fragment (Bezeichnung: „5'-Fragment-Xho/Hind“) wurde weiterverwendet.

Für die Herstellung eines geeigneten 3'-Fragments wurde das 3'-Fragment-2168/2251 mit HindIII und XbaI geschnitten und in einen mit den gleichen Enzymen geschnittenen pBlue-scriptSK-Vektor eingefügt (Bezeichnung: „pBlue-Hind/2251“). Das 5'-Fragment-Xho/Hind (s.o.) wurde anschließend in das mit XhoI und HindIII geschnittene Plasmid pBlue-Hind/2251 eingefügt. Das hergestellte Plasmid (Bezeichnung: „pBlue-rCNC α 2 Δ NT“) enthält die Nukleotide 235-2013 der rCNC α 2-Sequenz. Das Gesamtfragment wurde durch Restriktion mit XhoI und XbaI aus dem Plasmid geschnitten und in einen mit den gleichen Enzymen geschnittenen pcDNAIamp-Vektor eingefügt (Abb. 3.1.3.1; Bezeichnung: „pcDNA-rCNC α 2 Δ NT“). Dieses Plasmid wurde zur heterologen Expression der N-terminal verkürzten Mutante der rCNC α 2-Untereinheit in HEK293-Zellen verwendet (3.3.1).

Das Plasmid diente außerdem als Ausgangsprodukt für die Herstellung von Plasmiden mit den vollständigen rCNC α 2a- und rCNC α 2b-Sequenzen. Die Herstellung dieser Sequenzen soll hier am Beispiel der rCNC α 2b-Spleißvariante dargestellt werden (Abb. 3.1.3.2). Zunächst wurde durch PCR ein Zwischenprodukt mit dem 5'-terminalen Ende der rCNC α 2b-Sequenz hergestellt. Die PCR wurde mit dem 5'-Fragment-Riechepithel/Hoden (Abb. 3.1.1.1) als Matrize und den Primern #2374 und #2206 durchgeführt (Abb. 3.1.3.2). Durch den Primer #2374 wurde eine XhoI-Restriktionsschnittstelle, eine ideale ribosomale Bindestelle (Kozak-Sequenz) und ein Startkodon (ATG) unmittelbar vor das Nukleotid 4 in das PCR-Produkt (Bezeichnung: 5'-Fragment-2374/2206) eingeführt. Die Nukleotide 4-7 wurden anhand der

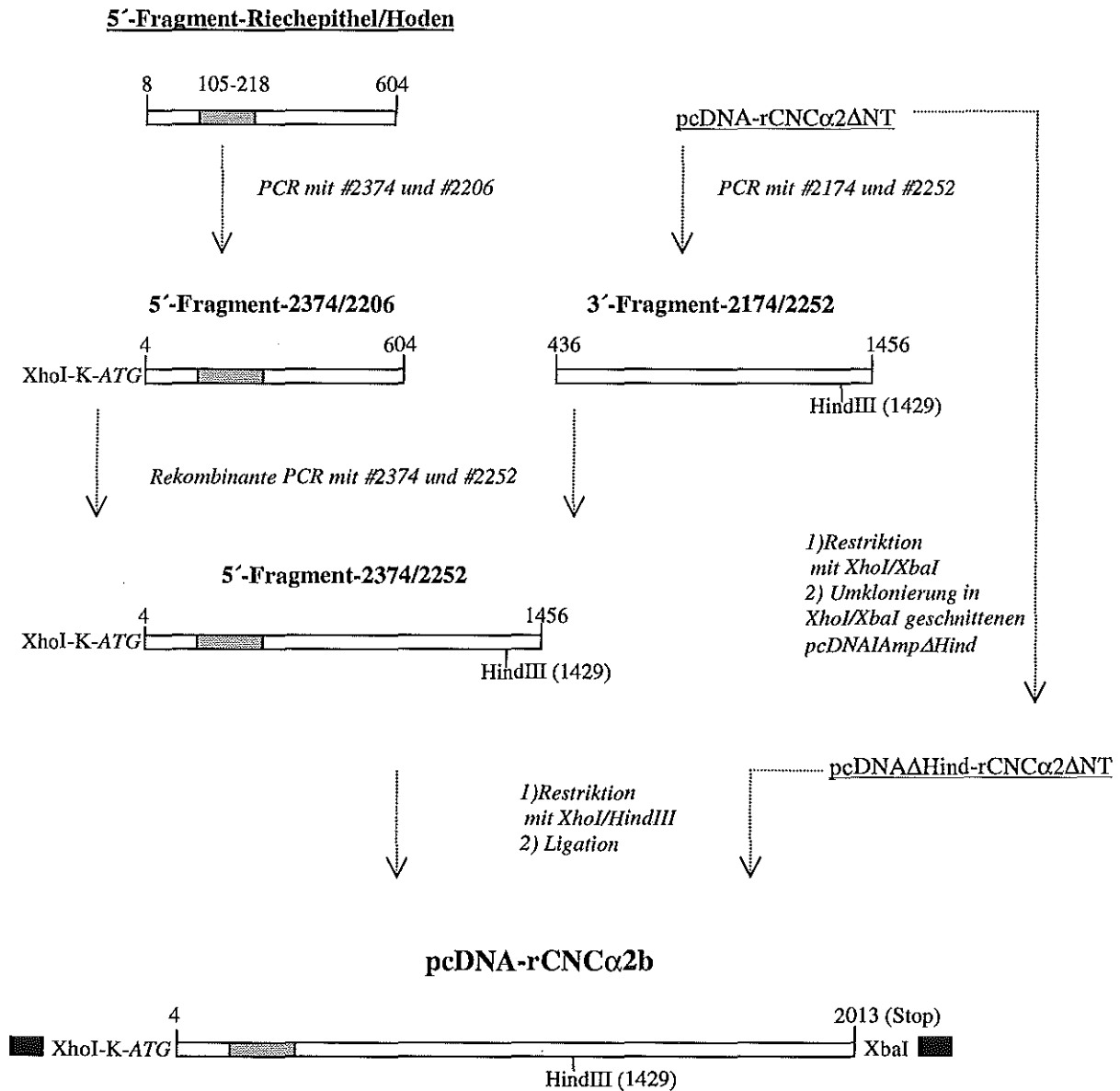


Abb. 3.1.3.2: Schematische Darstellung der Herstellung des pcDNA-rCNCα2b-Plasmids für die heterologe Expression in HEK 293-Zellen (Erläuterung im Text). Der kodierende Bereich beginnt mit dem Adenylatnukleotid des ATG-Kodons). Die Herstellung des Plasmids für die rCNCα2a-Spleißvariante erfolgte auf ähnliche Weise. Als Ausgangsprodukt wurde dabei jedoch nicht das 5'-Fragment-Riechepithel/Hoden, sondern das 5'-Fragment-Riechepithel/Auge/Hoden (Abb. 3.1.1.1) verwendet. Ausgewählte Fragmente bzw. Plasmide sind schematisch dargestellt. Die schematische Darstellung erfolgt, wie in der Abb. 3.1.3.1 angegeben. Die Ausgangsprodukte „5'-Fragment-Riechepithel/Hoden“ und „pcDNA-rCNCα2ΔNT“ sind in der Abb. 3.1.1.1 bzw. 3.1.3.1 schematisch dargestellt. Die Herstellung des Vektors pcDNAΔAmpΔHind ist im Text erläutert. Verwendete Abkürzung: K: Kozak-Sequenz (CCACC).

„5'-RACE-Fragment-Auge“-Sequenz (Abb. 3.1.1.1) ebenfalls durch den Primer #2374 eingeführt. Durch eine rekombinante PCR (s.o.) wurde dieses Fragment in Richtung 3'-Ende verlängert. Dafür mußte zunächst ein geeignetes 3'-Fragment hergestellt werden. Ein 3'-Fragment (Bezeichnung: „3'-Fragment-2174/2252“) wurde durch eine PCR mit dem Plasmid pcDNA-rCNC α 2 Δ NT (s.o.) als Matrize und den Primern #2174 und #2252 hergestellt (Abb. 3.1.3.2). Das PCR-Produkt wurde als „3'-Fragment-2174/2252“ bezeichnet. Dieses Fragment überlappt mit dem 5'-Fragment-2374/2206 (Nukleotide 436-604). Beide Fragmente wurden bei der rekombinanten PCR mit den Primern #2374 und #2252 eingesetzt. Dabei entstand ein verlängertes 5'-Fragment (Bezeichnung: „5'-Fragment-2374/2252“), das die HindIII-Restriktionsschnittstelle (1429) enthält.

In einem (nicht in der Abb. 3.1.3.2 dargestellten) Zwischenschritt wurde ein pcDNAIamp-Vektor hergestellt, dessen HindIII-Restriktionsschnittstelle fehlt (Bezeichnung: „pcDNAIamp Δ Hind“). Dafür wurde ein pcDNAIamp-Vektor mit HindIII geschnitten. Danach wurden die Enden des Vektors aufgefüllt und der Vektor wieder zusammengefügt.

Das im Vektor pcDNA-rCNC α 2 Δ NT (s.o.) enthaltene 3'-Fragment wurde durch Restriktion mit XhoI und XbaI ausgeschnitten und in einen mit den gleichen Enzymen geschnittenen pcDNAIamp Δ Hind-Vektor eingefügt. Das entstandene Plasmid (Bezeichnung: „pcDNA Δ Hind-rCNC α 2 Δ NT“) wurde mit XhoI und HindIII geschnitten. In das geschnittene Plasmid wurde das mit den gleichen Enzymen geschnittene 5'-Fragment-2374/2252 (s.o.) eingefügt. Damit war ein Plasmid mit der vollständigen Sequenz der rCNC α 2b-Spleißvariante (Nukleotide 1-2013) hergestellt worden (Bezeichnung: „pcDNA-rCNC α 2b“). Das Plasmid mit der vollständigen Sequenz der rCNC α 2a-Spleißvariante wurde auf analoge Weise hergestellt (Bezeichnung: „pcDNA-rCNC α 2a“). Als Ausgangsprodukt wurde dabei das 5'-Fragment-Riechepithel/Auge/Hoden (Abb.3.1.1.1) verwendet.

Die hergestellten Plasmide wurden zur heterologen Expression in HEK 293-Zellen verwendet. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der exprimierten Untereinheiten wurden untersucht und verglichen (3.3.2). Die verkürzte Mutante der rCNC α 2-Untereinheit wurde als Zwischenprodukt hergestellt. Außerdem wurde mit dieser Mutante der potentielle Einfluß N-terminaler Bereiche (Varnum & Zagotta, 1997) auf die Eigenschaften des rCNC α 2-Kanals untersucht.

3.1.4 Herstellung eines Antikörpers gegen den C-Terminus der rCNC α 2-Untereinheit

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der rCNC α 2-Spleißvarianten und anderer CNC-Untereinheiten zeigt (7.2), daß N-terminale und C-terminale Aminosäurebereiche geringer konserviert sind als andere Proteinbereiche, wie z.B. die cNMP-Bindestelle. N- und C-terminale Proteinbereiche sollten sich daher eignen, um spezifische Antikörper gegen die rCNC α 2-Untereinheit zu erzeugen. Da der N-Terminus von CNG-Kanälen prozessiert sein kann (Molday et al., 1991), wurde ein polyklonaler Antikörper gegen einen C-terminalen Bereich hergestellt (abgeleitete Aminosäuresequenz: K581-D670). Dieser Proteinbereich wurde als Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und gereinigt. Mit dem gereinigten Protein wurden Kaninchen immunisiert.

Die Nukleotide 1741-2013, die für die 90 C-terminalen Aminosäuren von rCNC α 2 kodieren, wurden durch PCR mit dem Plasmid pBlue-2168/2169 (3.1.1) als Matrize und den Primern #2186 und #2187 amplifiziert. Durch den Primer #2186 wurde dabei am 5'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle unmittelbar vor das Nukleotid 1741 eingeführt. Am 3'-Ende wurde durch den Primer #2187 unmittelbar hinter dem Stopkodon ein zusätzliches Stopkodon (TAA) und eine HindIII-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das PCR-Fragment wurde nach Restriktion mit BamHI und HindIII in einen mit den gleichen Enzymen geschnittenen pMALc2-Vektor (2.2.1) eingefügt (Bezeichnung: „pMAL-rCNC α 2-CT“). Das Fragment wurde dabei im gleichen Leserahmen 3'-wärts von einer Sequenz eingefügt, die für das Maltose-Bindeprotein (MBP) kodiert. Zwischen der MBP-Sequenz und der eingefügten Sequenz befindet sich eine kurze Nukleotidfolge, die für eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa kodiert. So entstand die kodierende Sequenz für ein Fusionsprotein, das N-terminal aus dem MBP und C-terminal aus den 90 C-terminalen Aminosäuren der rCNC α 2-Untereinheit besteht. Das Plasmid pMAL-rCNC α 2-CT wurde in *E.coli* XL1-Zellen transformiert (2.6.3.2). Durch Induktion mit IPTG wurde ein Fusionsprotein (Bezeichnung: „MBP-rCNC α 2-CT“) der erwarteten Größe (53 kDa) exprimiert (2.12.1). Das Fusionsprotein wurde mit Hilfe der Amylose-Affinitätschromatographie (2.12.2) gereinigt. Mit dem gereinigten Fusionsprotein wurden Kaninchen immunisiert (2.12.4).

Zusätzlich wurden die gleichen Kaninchen in einem zeitlichen Abstand mit der gereinigten Domäne immunisiert, die aus den 90 C-terminalen Aminosäuren der rCNC α 2-Untereinheit besteht, um die Effizienz der Antikörperproduktion zu steigern. Diese C-terminale Domäne wurde durch Spaltung des Fusionsproteins MBP-rCNC α 2-CT mit der Protease Faktor Xa

vom MBP getrennt (2.12.3) und durch Gelelektrophorese gereinigt (2.16). Die gereinigte Domäne wurde zur Immunisierung verwendet. Aus einem Kaninchen wurde ein polyklonales Antiserum gewonnen (Bezeichnung: „Antiserum 66“), das Antikörper gegen den C-Terminus der rCNC α 2-Untereinheit enthält.

Der polyklonale Antikörper wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie (2.12.5) aus dem Antiserum 66 gereinigt (Bezeichnung: „Antikörper 66“). Im ersten Schritt wurden die Antikörper gegen das MBP durch Bindung an immobilisiertes MBP entfernt. Im zweiten Schritt wurden die Antikörper gegen die 90 C-terminalen Aminosäuren der rCNC α 2-Untereinheit durch immobilisiertes MBP-rCNC α 2-CT-Fusionsprotein selektiv gebunden und anschließend eluiert. Die Reinigungseffizienz wurde durch Westernblot-Analysen getestet (2.12.6). Dazu wurde das MBP-rCNC α 2-CT-Fusionsprotein mit der Protease Faktor Xa gespalten. Der Spaltungsansatz wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt (2.16), auf eine Membran übertragen und mit dem gereinigten Antikörper 66 immunologisch untersucht (2.17). In einer Verdünnung von 1:100 detektierte der Antikörper noch 20 ng der abgespaltenen C-terminalen Domäne. Das MBP wurde durch den gereinigten Antikörper 66 nicht detektiert.

Der gereinigte Antikörper wurde außerdem auf Kreuzreaktionen mit anderen CNC-Untereinheiten (rCNC α 3, rCNC α 4, bCNC α 1 und bCNC α 2) untersucht. Die Untereinheiten wurden heterolog in HEK 293-Zellen exprimiert (2.19). Aus diesen Zellen wurden Membranproteine isoliert (2.13) und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Membran übertragen und immunologisch mit dem Antikörper 66 untersucht. Der gereinigte Antikörper zeigte Kreuzreaktionen zu folgenden Untereinheiten: rCNC α 3, bCNC α 1 und bCNC α 2 (nicht gezeigt). Aufgrund der Kreuzreaktionen wurde versucht, monoklonale Antikörper gegen die 90 C-terminalen Aminosäuren der rCNC α 2-Untereinheit durch Immunisierung von Mäusen (mit dem Fusionsprotein MBP-rCNC α 2-CT) zu erzeugen. Die Mäuse zeigten jedoch keine Immunreaktion gegen die C-terminale Domäne.

Der Antikörper 66 wurde für Westernblot-Analysen (3.2.1) und für immunzytochemische Untersuchungen am Riechepithel und der Retina der Ratte (und des Rindes) verwendet (3.2.2), um die Expression von CNC α 2-Untereinheiten in diesen Geweben zu untersuchen. Mit dem Antikörper wurde außerdem die Expression von rCNC α 2-Untereinheiten in HEK 293-Zellen überprüft (3.3.1). Der Antikörper ist gegen einen C-terminalen Bereich der rCNC α 2-Untereinheit gerichtet. Das bedeutet, daß der Antikörper 66 nicht zwischen den Spleißvarianten rCNC α 2a und rCNC α 2b unterscheidet.

3.2 Lokalisierung der rCNC α 2-Untereinheit

3.2.1 Westernblot-Analysen

Die Expression der rCNC α 2-Untereinheit in verschiedenen Geweben wurde mit Hilfe der Westernblot-Technik untersucht. Dafür wurden Membranproteine isoliert (2.14), durch Gelelektrophorese aufgetrennt (2.16) und auf eine Membran übertragen (2.17). Die Proteine wurden dann immunologisch untersucht.

In Abbildung 3.2.1.1 ist eine Westernblot-Analyse mit Membranproteinen der Rinder- und der Rattenretina gezeigt. Die Membranproteine wurden mit den Antikörpern 66 und 39 untersucht. Der Antikörper 39 ist gegen die cNMP-Bindestelle der bCNC α 1-Untereinheit gerichtet und wurde mir freundlicherweise von Dr. D. Weitz (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) überlassen. In Spur 1 und 2 sind je 10 μ g Membranprotein aus einer Präparation von gereinigten Stäbchenaußensegmenten des Rindes („ROS“: Schnetkamp & Daemen, 1982) aufgetragen. In einer solchen Präparation sind die Proteine der Stäbchenaußensegmente stark angereichert. Zapfenußensegmente können in solchen Präparationen lediglich in Spuren enthalten sein. Beide Antikörper detektieren eine Bande bei ca. 65 kDa. Diese Bande repräsentiert die bCNC α 1-Untereinheit. Der Antikörper 66 zeigt also eine Kreuzreaktion zur bCNC α 1-Untereinheit. Diese Kreuzreaktion wurde bereits mit heterolog exprimierter

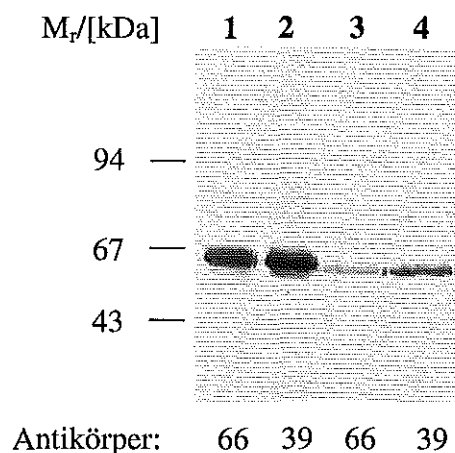


Abb.3.2.1.1: Westernblot-Analyse von Membranproteinen der Rinder- und der Rattenretina. Es wurden jeweils 10 μ g Membranprotein aus den Außensegmenten von Sebstäbchen des Rindes („ROS“; Spur 1 und 2) und jeweils 130 μ g Membranprotein aus der Retina der Ratte (Spur 3 und 4) auf ein 8,5 %iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern 39 (1:1.000) und 66 (1:100). Als Marker wurde der „Low molecular weight marker (LMW)“ (Pharmacia, Uppsala/Schweden) verwendet.

bCNC α 1-Untereinheit nachgewiesen (3.1.4). Die apparente Molmasse dieses Proteins beträgt in der SDS-Gelelektrophorese 63 kDa (Cook et al., 1987). In Bezug auf die hier verwendeten Markerproteine erscheint die apparente Molmasse leicht erhöht.

In Spur 3 und Spur 4 wurden je 130 μ g Membranproteine der Rattenretina aufgetragen und mit den Antikörpern 66 und 39 untersucht. Beide Antikörper detektieren eine Bande bei 63 kDa, die aufgrund der Größe und der Kreuzreaktion mit dem Antikörper 39 vermutlich die rCNC α 1-Untereinheit (Barnstable & Wei, 1995) repräsentiert. Damit zeigt der Antikörper 66 auch eine Kreuzreaktion zur rCNC α 1-Untereinheit. Die rCNC α 1-Untereinheit hat im Vergleich zur bCNC α 1-Untereinheit (Spur 1 und 2) eine etwas geringere apparente Molmasse. In Spur 3 detektiert der Antikörper 66 neben der prominenten Bande bei 63 kDa auch eine sehr schwache Bande bei ca. 71 kDa. Die apparente Molmasse dieser schwachen Bande korreliert gut mit der errechneten Molmasse der rCNC α 2a-Spleißvariante (72,5 kDa). Die schwache Intensität des Signals ist sehr wahrscheinlich auf den geringen Anteil von Zapfenzellen in der Retina (< 3 % aller Photorezeptorzellen) zurückzuführen. Auch in Membranpräparationen von Gesamt-Rinderretina wird ein schwaches Signal detektiert (nicht gezeigt), das im Vergleich allerdings eine leicht erhöhte apparente Molmasse zeigt (ca. 73 kDa). Dieses Signal könnte die bCNC α 2-Untereinheit repräsentieren. In einer Präparation von Stäbchenaußensegmenten des Rindes kann durch den Antikörper 66 hingegen außer der 65 kDa kein weiteres Signal detektiert werden (Spur 1). Da diese Präparation praktisch keine Zapfenaußensegmente enthält, in denen die bCNC α 2-Untereinheit exprimiert wird, konnte dieses Ergebnis erwartet werden.

In Abb. 3.2.1.2 ist eine Westernblot-Analyse mit Membranproteinen aus dem Riechepithel der Ratte dargestellt. In Spur 1 und 2 wurden je 20 μ g Protein aufgetragen und mit den Antikörpern 66 und 60 untersucht. Der Antikörper 60 ist gegen den C-Terminus der rCNC α 3-Untereinheit gerichtet und wurde mir freundlicherweise von Dr. W. Bönigk (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) überlassen. Beide Antikörper detektieren ein Signal bei 75 kDa und ein stärkeres, „verschmiertes“ Signal bei ca. 110-130 kDa (Spur 1 und 2). Die apparenten Molmassen und die Intensität der Signale sind charakteristisch für die rCNC α 3-Untereinheit. Belegt wird dies durch den Antikörper 60, der (ebenfalls) diese Banden detektiert (Spur 2). Durch Deglykosylierung können die beiden Banden in eine Bande bei 74 kDa überführt werden (Bönigk et al., 1999). Dies zeigt, daß die rCNC α 3-Untereinheit in unterschiedlich stark

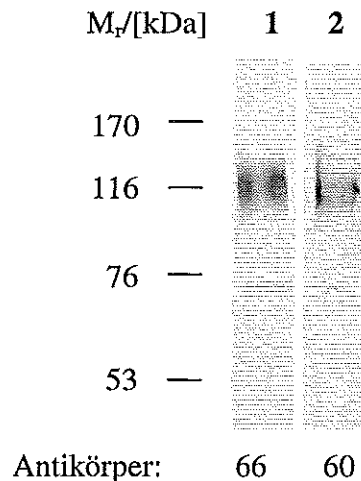


Abb. 3.2.1.2: Westernblot-Analyse von Membranproteinen aus dem Riechepithel der Ratte. Es wurden jeweils 20 µg Membranprotein aus dem Riechepithel (Spur 1 und 2) auf ein 7,5 %iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und auf eine Membran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit den Antikörpern 60 (1 : 250) und 66 (1 : 50). Als Marker wurde der „High molecular weight marker (HMW)“ (Pharmacia, Uppsala/Schweden) verwendet.

glykosylierten Formen existiert. Die Funktion der unterschiedlichen Glykosylierung ist unbekannt. Die in diesem Kapitel beschriebenen Kreuzreaktionen des Antikörpers 66 wurden, bis auf die Kreuzreaktion zur rCNC α 1-Untereinheit, bereits bei Untersuchungen an heterolog exprimierten CNG-Kanaluntereinheiten erkannt (3.1.4).

Die Ergebnisse der Westernblot-Analysen sollen hier zusammengefaßt werden. Der Antikörper 66 detektiert in Membranproteinen der Rattenretina eine schwache Bande bei ca. 71 kDa. Die apparente Molmasse stimmt gut mit der errechneten Molmasse der rCNC α 2a-Spleißvariante überein. In Membranproteinen aus dem Riechepithel der Ratte werden mit dem Antikörper 66 lediglich die charakteristischen Banden der rCNC α 3-Untereinheit aufgrund einer Kreuzreaktion zu dieser Untereinheit nachgewiesen. Vermutlich ist der Anteil an exprimiertem rCNC α 2-Protein im Riechepithel zu gering, um durch Westernblot-Analyse mit dem Antikörper 66 nachgewiesen zu werden. Dies wird im folgenden durch immunzytochemische Färbungen unterstützt (3.2.2).

3.2.2 Immunzytochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten

Die Expression der rCNC α 2-Untereinheit wurde mit Hilfe immunzytochemischer Methoden (2.18) untersucht. Die Gewebeschnitte und die immunzytochemischen Färbungen wurden freundlicherweise von Dr. F. Müller (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) angefertigt.

Die Abbildung 3.2.2.1 zeigt mit dem Antikörper 66 gefärbte Vertikalschnitte durch die Rattenretina (A) und die Rinderretina (B). In beiden Fällen markierte der Antikörper 66 deutlich die Außensegmente der Zapfenzellen (Pfeile). Sie sind kürzer als Außensegmente der Stäbchenzellen und liegen näher an der äußeren nukleären Schicht, die die Zellkörper der Photorezeptorzellen enthält. Die Außensegmente der Stäbchenzellen werden sehr viel schwächer gefärbt. Diese Färbung ist auf die beschriebene Kreuzreaktion des Antikörpers gegen die rCNC α 1- und die bCNC α 1-Untereinheit zurückzuführen (3.2.1). In hoher Verdünnung ist der Antikörper 66 jedoch weitgehend CNC α 2-spezifisch. Die leichten Anfärbungen in den plexiformen Schichten der Retina liegen kaum über dem Hintergrund und sind möglicherweise unspezifische Kreuzreaktionen.

In der Abbildung 3.2.2.2 sind Schnitte durch das Riechepithel der Ratte dargestellt. In A) wurde das Epithel mit einem polyklonalen Antikörper gegen die rCNC α 3-Untereinheit in einer Verdünnung von 1:1.000 angefärbt, der freundlicherweise von Dr. G.V. Ronnett

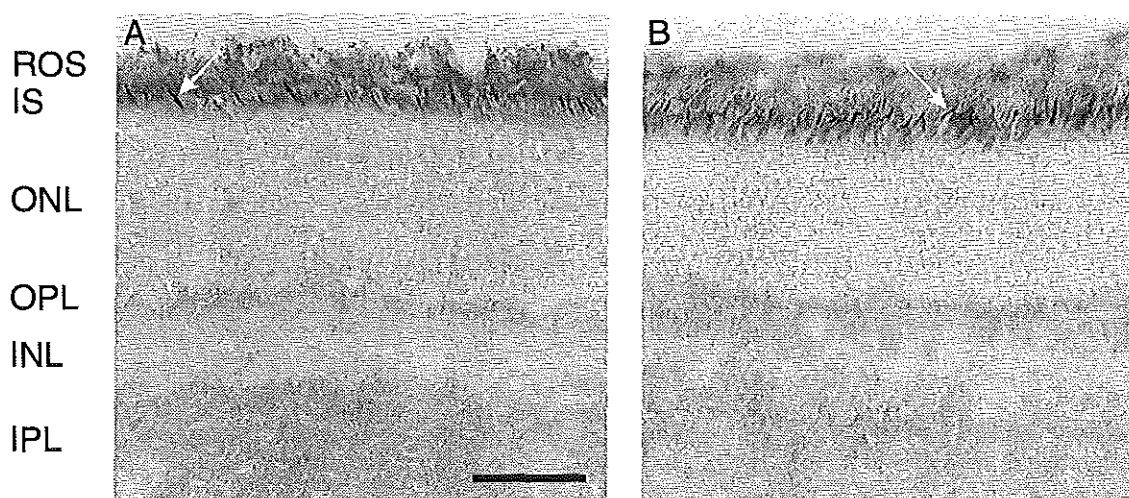


Abb. 3.2.2.1: Immunzytochemische Färbung von Vertikalschnitten durch Rattenretina (A) und Rinderretina (B). Zum immunologischen Nachweis der CNC α 2-Untereinheit wurde der Antikörper 66 in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Zur Verdeutlichung wurde jeweils ein Außensegment einer Zapfenzelle durch einen Pfeil hervorgehoben. Die Schichten der Retina sind links neben A) als Abkürzung angegeben. Der in Abbildungsteil A) eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 50 μ m und bezieht sich auf A) und B). Verwendete Abkürzungen: INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, IS: innere Segmente, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, ROS: Außensegmente der Stäbchenzellen.

(Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore/USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die gesamte Zilienschicht (Z) ist stark markiert. In B) ist ein anderer Schnitt gezeigt, der mit dem Antikörper 66 in einer Konzentration von 1:500 angefärbt wurde. Auch hier wird die ganze Zilienschicht angefärbt. Zusätzlich sind zwei Zellkörper (Pfeile) sehr schwach markiert. Die starke Anfärbung der Zilien ist auf die beschriebene Kreuzreaktion des Antikörpers gegen die rCNC α 3-Untereinheit zurückzuführen (3.2.1). Wählt man eine Verdünnung von 1:2.000, in der der Antikörper 66 in der Retina nur noch Außensegmente der Zapfenzellen färbt, ändert sich das Färbemuster (C). In diesem Fall färbt der Antikörper nur noch Zilien weniger, vereinzelt liegender Zellen an. Das Zilienbüschel der Zelle in C) ist stark markiert, die Zilien benachbarter Zellen dagegen nicht. Der Dendrit und der Zellkörper der Zelle sind ebenfalls leicht angefärbt. Aufgrund des Vergleiches mit der Retina kann vermutet werden, daß der Antikörper 66 auch im olfaktorischen Epithel in hoher Verdünnung nur noch die rCNC α 2-Untereinheit anfärbt. Die markierte Subpopulation würde demnach diese Untereinheit überwiegend in den Zilien exprimieren. Zum Vergleich ist in D) eine Färbung mit dem Antiserum I-055 (Verdünnung: 1:3.000) gegen die Guanylylzyklase-D (GC-D) gezeigt, das freundlicherweise von Dr. D.L. Garbers (University of Texas, Dallas/USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die Guanylylzyklase-D (GC-D: Fülle et al., 1995) wurde in einer Subpopulation von Riechzellen nachgewiesen, die auch die PDE2 enthält (Juilfs et al., 1997). In diesen Zellen lassen sich weder die Adenylylzyklase (TypIII), noch die PDE1C2 bzw. die PDE4A nachweisen (1.2.2). Auch durch das Antiserum I-055 werden nur wenige Zellen gefärbt, meist sind auch hier Zellkörper, Dendrit und Zilienbündel zu erkennen. In beiden Färbungen (C und D) liegt der Anteil der positiven Zellen im olfaktorischen Epithel weit unter einem Prozent. Aufgrund der spezifischen Färbung kann geschlossen werden, daß die Antigene (GC-D, bzw. die rCNC α 2-Untereinheit) nur in einer kleinen Subpopulation von Zellen exprimiert werden, in diesen jedoch in großer Menge. Ob die GC-D und die rCNC α 2-Untereinheit in der gleichen Subpopulation von Zellen exprimiert wird, kann nur durch Doppelfärbungen geklärt werden. Der Antikörper 66 unterscheidet nicht zwischen den Spleißvarianten der rCNC α 2-Untereinheit. Unklar ist, ob beide Varianten gemeinsam in den gleichen Zellen exprimiert werden. Ob die rCNC α 2-Untereinheit in diesen Zellen mit anderen CNG-Kanaluntereinheiten koexprimiert wird, z.B. mit der CNC β 1b-Untereinheit, kann nur durch immunzytochemische Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern geklärt werden. Diese Doppelfärbungen sind jedoch technisch schwierig durchzuführen, da alle umliegenden Zilien anderer Zellen die rCNC α 3-, die rCNC α 4- und die rCNC β 1b-Untereinheit in hoher Dichte exprimieren.

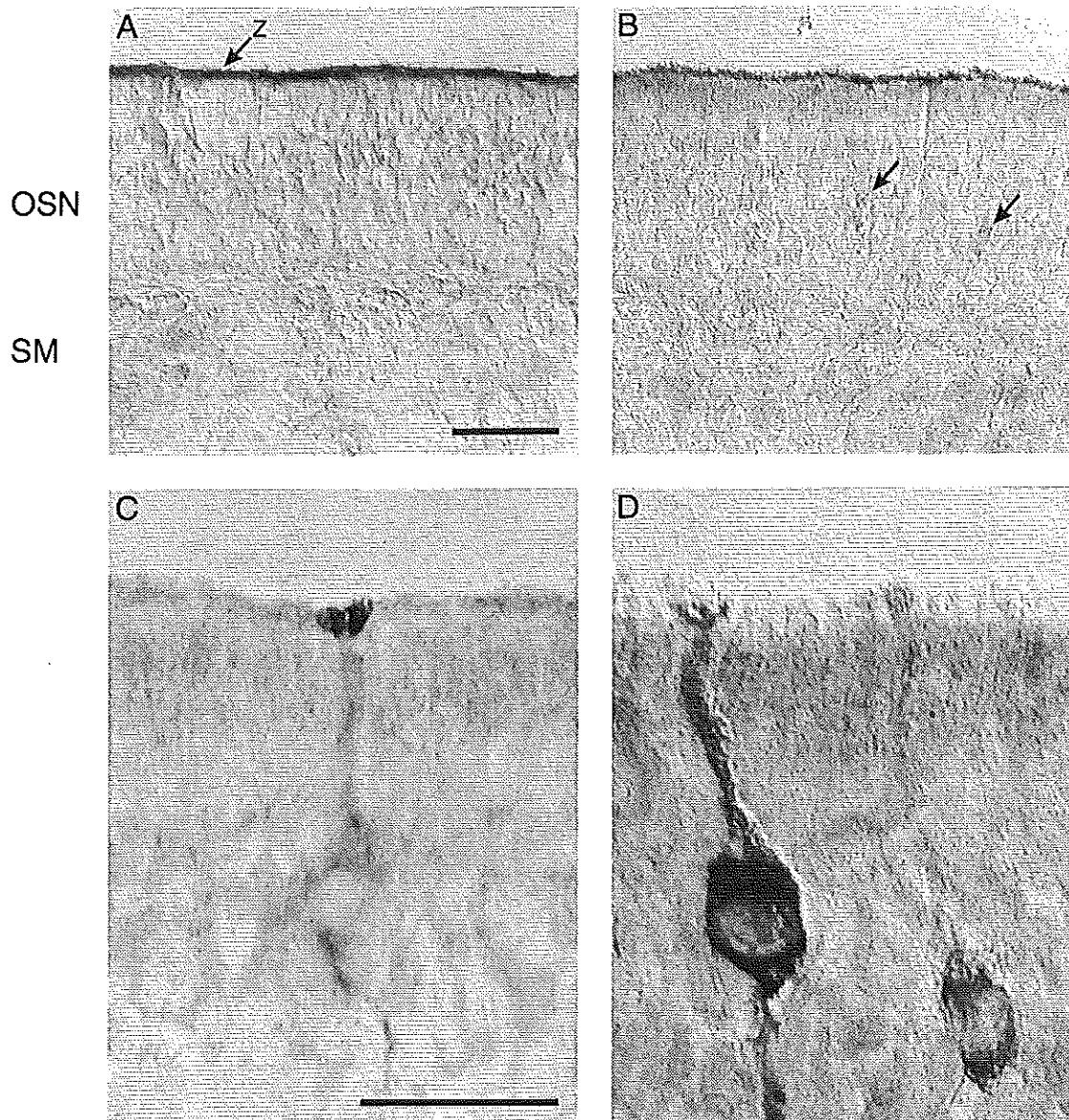


Abb. 3.2.2.2: Immunzytochemische Färbung von Vertikalschnitten des Riechepithels der Ratte. Die Schnitte wurden mit folgenden Antikörpern bzw. Antisera gefärbt: A): Polyklonaler Antikörper gegen die rCNC α 3-Untereinheit in einer Verdünnung von 1:1.000. B): Antikörper 66 in einer Verdünnung von 1:500. C): Antikörper 66 in einer Verdünnung von 1:2.000. D): Antiserum I-055 gegen die GC-D in einer Verdünnung von 1:3.000. Vereinzelte Zellen, die in B) schwach angefärbt wurden, sind zur Verdeutlichung durch Pfeile markiert. Neben Abbildungsteil A) sind die Zellschichten als Abkürzung angegeben. Der in A) eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 50 μ m und bezieht sich auf die Abbildungsteile A) und B). Der in C) eingezeichnete Balken entspricht 20 μ m und bezieht sich auf die Abbildungsteile C) und D). Verwendete Abkürzungen: OSN: olfaktorisch-sensorische Neuronen, SM: Submucosa, Z: Zilien.

3.3. Funktionelle Charakterisierung der rCNC α 2-Untereinheit

3.3.1 Heterologe Expression in HEK 293-Zellen

Um die rCNC α 2-Untereinheit funktionell charakterisieren zu können, wurden HEK 293-Zellen jeweils mit den Plasmiden pcDNA-rCNC α 2a, pcDNA-rCNC α 2b und pcDNA-rCNC α 2 Δ NT (3.1.3) transfiziert (2.19.2). Die heterolog exprimierten Kanalproteine wurden elektrophysiologisch charakterisiert (3.3.2).

Die heterologe Expression der N-terminal verkürzten rCNC α 2 Δ NT-Mutante soll hier exemplarisch gezeigt werden. Transfizierte HEK 293-Zellen wurden am zweiten Tag nach der Transfektion immunologisch untersucht. Dafür wurden Membranproteine aus den HEK 293-Zellen durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die immobilisierten Proteine wurden dann mit dem Antikörper 66 (3.1.4) untersucht (2.16, 2.17). In der Abb. 3.3.1.1 ist die Westernblot-Analyse dargestellt. Der Antikörper 66 detektiert in Membranproteinen transfizierter Zellen (Spur 2) eine Bande bei 65 kDa. Die apparente Molmasse stimmt gut mit der errechneten Molmasse der rCNC α 2 Δ NT-Variante (67 kDa) überein.

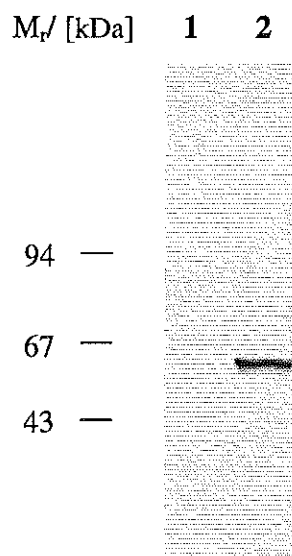


Abb. 3.3.1.1: Westernblot-Analyse von Membranproteinen aus pcDNA-rCNC α 2 Δ NT-transfizierten HEK 293-Zellen (Erläuterung im Text). Jeweils 10 μ g Membranprotein aus nicht-transfizierten (Spur 1) und mit dem Plasmid pcDNA-rCNC α 2 Δ NT transfizierten (Spur 2) HEK 293-Zellen wurden auf ein 8,5 %iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und auf eine Membran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Antikörper 66 in einer Verdünnung von 1:100. Als Marker wurde der „Low molecular weight marker (LMW)“ (Pharmacia, Uppsala/ Schweden) verwendet.

Die transfizierten HEK 293-Zellen wurden außerdem immunzytochemisch mit dem Antikörper 66 behandelt. Der Antikörpernachweis erfolgte mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) (2.20). In Abb. 3.3.1.2 sind nicht-transfizierte (A) und transfizierte (B) HEK 293-Zellen gezeigt. Durch den Antikörper 66 werden im Durchschnitt 10-15 % der transfizierten Zellen stark angefärbt.

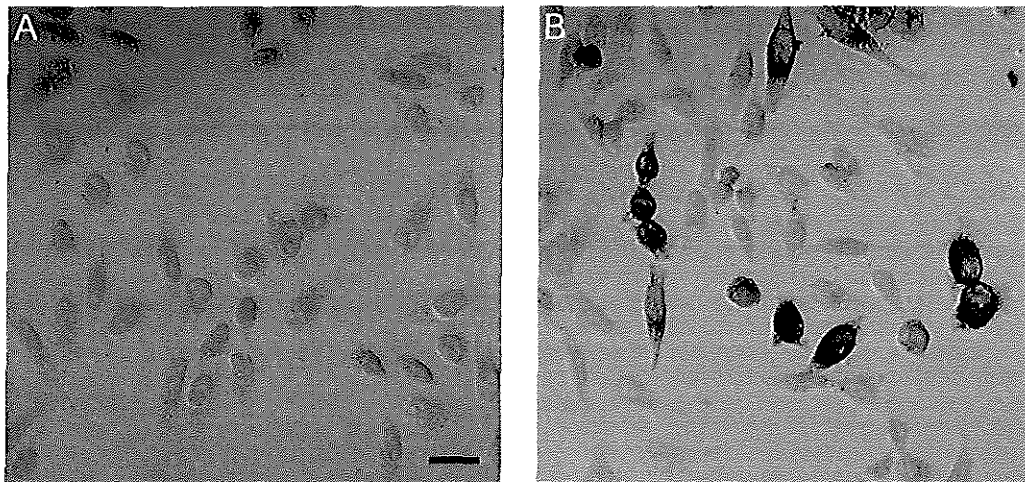


Abb. 3.3.1.2: Immunzytochemische Färbung von nicht-transfizierten bzw. mit pcDNA-rCNC α 2 Δ NT-transfizierten HEK 293-Zellen mit dem Antikörper 66 (Erläuterung im Text). A): Nicht-transfizierte Zellen, B): Transfizierte Zellen. In B) ist eine Häufung gefärbter Zellen gezeigt. Der Anteil gefärbter Zellen lag im Durchschnitt bei ca. 10-15 %. Der Antikörper 66 wurde jeweils in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Der Balken in Abbildungsteil A) entspricht einer Länge von 25 μ m und gilt für die Abbildungsteile für A) und B).

3.3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung von rCNC α 2-Kanälen

Zur funktionellen Charakterisierung der rCNC α 2-Spleißvarianten (rCNC α 2a und rCNC α 2b) und einer N-terminal verkürzten Mutante (rCNC α 2 Δ NT) wurden HEK 293-Zellen jeweils mit den entsprechenden Plasmiden (3.1.3) transfiziert. Die heterolog exprimierten Kanäle wurden freundlicherweise von A. Angele (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) elektrophysiologisch untersucht (2.21). Sämtliche hier dargestellten Ergebnisse wurden mit Hilfe der „Patch clamp“-Technik in der „inside-out“-Konfiguration durchgeführt. Das bedeutet, mit der Meßpipette wird ein Membranstück („patch“) so aus der Zelle entnommen, daß die zytosolische Seite nach außen zeigt und mit verschiedenen Lösungen umspült werden kann. Während der Messung wird die elektrische Membranspannung (V_m) vorgegeben (Spannungsklemme/„clamp“) und der Strom (I) gemessen. Sofern nicht anders angegeben, wurden Spannungsrampen von -80 mV bis +80 mV angelegt.

3.3.2.1 Ligandensensitivität

Abb. 3.3.2.1 A) zeigt Strom-Spannungskurven eines Patches mit rCNC α 2a-Kanälen bei unterschiedlichen cGMP-Konzentrationen. Die Ströme werden mit steigender cGMP-Konzentration größer und sättigen schließlich (bei ca. 5 μ M cGMP bei +80 mV). Die Strom-Spannungsbeziehungen sind nicht linear. Die Auswärtsströme, die bei positiven Spannungen gemessen werden, sind stets größer als die Einwärtsströme, bei der entsprechenden negativen Membranspannung. Der rCNC α 2a-Kanal ist also leicht auswärtsrektifizierend.

In Abb. 3.3.2.1 B) ist an einem anderen Patch (mit Kanälen der gleichen Spleißvariante) ein Experiment mit cAMP gezeigt. Es werden sehr viel größere cAMP-Konzentrationen benötigt, um die Kanäle zu aktivieren.

Die Dosis-Wirkungsabhängigkeit der rCNC α 2-Kanäle kann, wie für ligandengesteuerte Kanäle typisch, durch die Hill-Gleichung beschrieben werden: $I/I_{\max} = c^n / (c^n + K_{1/2}^n)$. Hierbei bezeichnet $K_{1/2}$ die Ligandenkonzentration, die zum halbmaximalen Strom führt, der Hill-Koeffizient n ist ein Maß für die Kooperativität (der Ligandenbindung). Für jede Kanalvariante wurden aus sechs Experimenten die Parameter der Hill-Gleichung bestimmt und gemittelt. In Abb. 3.3.2.1 C) und D) sind die Dosis-Wirkungskurven, die aus diesen Werten berechnet wurden, für die Variante rCNC α 2a bei Membranspannungen von -60 mV

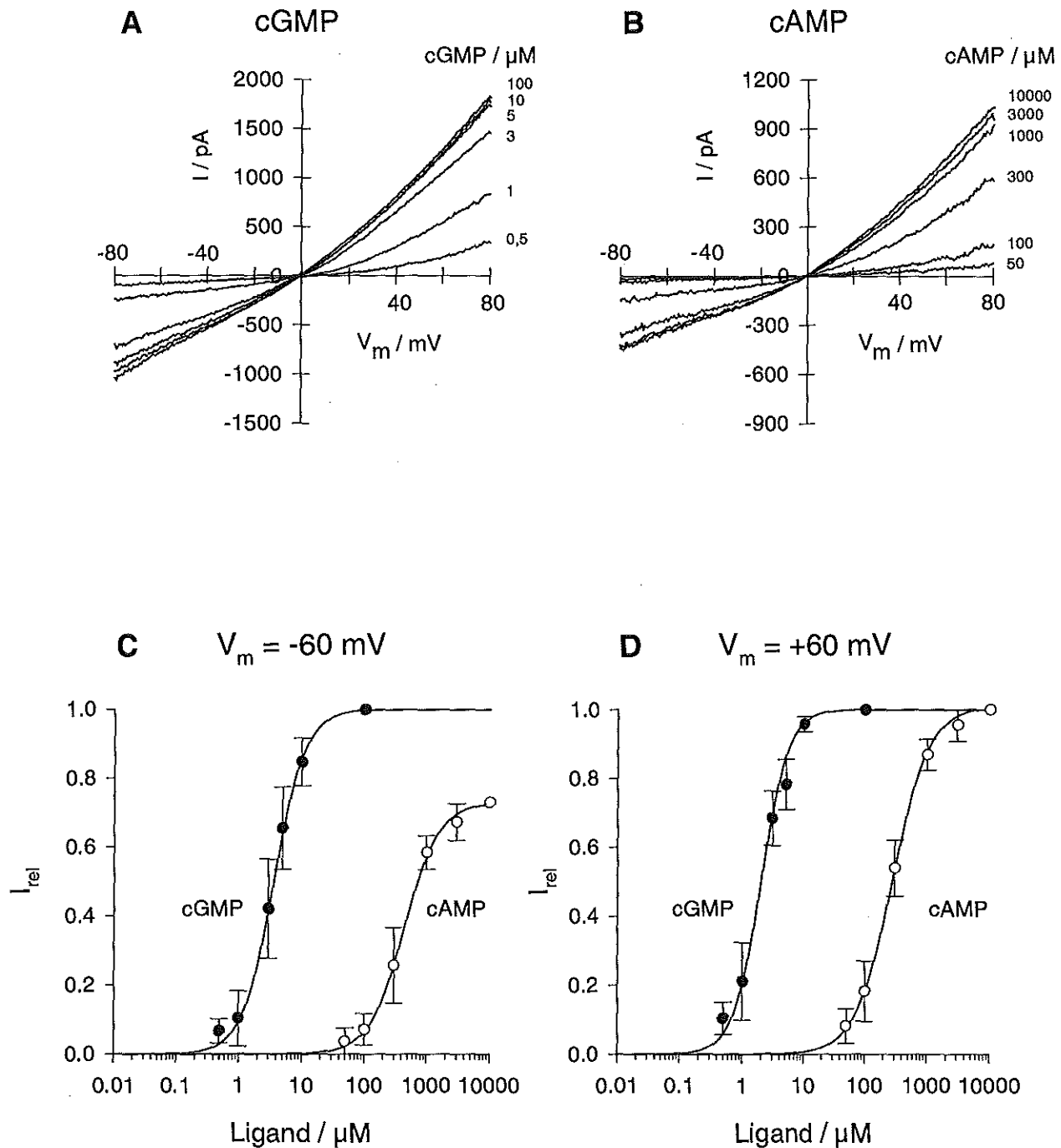


Abb. 3.3.2.1: A), B): Strom-Spannungsbeziehungen von homooligomeren rCNC α 2a-Kanälen bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen. A): cGMP in verschiedenen Konzentrationen, B): cAMP in verschiedenen Konzentrationen. Die Ströme wurden um den ohne Ligand erhaltenen Strom (Leckstrom) korrigiert. C), D): Dosis-Wirkungskurven bei einer Membranspannung von -60 mV und +60 mV mit cGMP und cAMP für rCNC α 2a-Kanäle. In die Kurven sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils sechs Versuchen eingetragen.

und +60 mV gezeigt. Alle Ströme wurden auf den Strom bei sättigender cGMP-Konzentration normiert. In die Dosis-Wirkungskurven eingetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils sechs Versuchen. In 12 Experimenten wurde das Verhältnis der Maximalströme, die durch cAMP bzw. cGMP aktiviert werden können (I_{cAMP}/I_{cGMP}) bestimmt. Der Wert liegt bei positiver Spannung bei 1. Die Kanäle sind also mit beiden Liganden gleich stark aktivierbar. Die Auswärtsrektifizierung ist mit cAMP als Ligand stärker ausgeprägt, dadurch ist der mit cAMP maximal aktivierte Einwärtsstrom kleiner als bei cGMP (siehe bei $V_m = -60$ mV).

Die folgende Tabelle zeigt die $K_{1/2}$ -Werte, Hill-Koeffizienten (n) und das Verhältnis I_{cAMP}/I_{cGMP} für die elektrophysiologisch untersuchten Kanalvarianten bei Membranspannungen von -60 mV und +60 mV. In der linken Spalte ist die Anzahl der jeweils durchgeführten Versuche in Klammern angegeben.

	$V_m = -60$ mV			$V_m = +60$ mV		
	rCNC α 2a	rCNC α 2b	rCNC α 2 Δ NT	rCNC α 2a	rCNC α 2b	rCNC α 2 Δ NT
$K_{1/2}$ (cGMP) / μ M (6)	3,65 $\pm$ 0,99	3,99 $\pm$ 1,37	2,67 $\pm$ 0,61	1,98 $\pm$ 0,41	1,69 $\pm$ 0,72	1,04 $\pm$ 0,15
n (cGMP) (6)	1,77 $\pm$ 0,19	1,68 $\pm$ 0,31	1,72 $\pm$ 0,35	2,00 $\pm$ 0,34	1,96 $\pm$ 0,28	2,06 $\pm$ 0,29
$K_{1/2}$ (cAMP) / μ M (6)	441 $\pm$ 94	613 $\pm$ 83	371 $\pm$ 54	277 $\pm$ 67	396 $\pm$ 85	202 $\pm$ 54
n (cAMP) (6)	1,57 $\pm$ 0,17	1,50 $\pm$ 0,17	1,98 $\pm$ 0,30	1,48 $\pm$ 0,12	1,49 $\pm$ 0,09	1,83 $\pm$ 0,15
I_{cAMP} / I_{cGMP} (12)	0,73 $\pm$ 0,07	0,70 $\pm$ 0,10	0,56 $\pm$ 0,12	1,01 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,07

Die $K_{1/2}$ -Werte für cGMP sind für alle drei Kanalvarianten ähnlich niedrig (1-4 μ M) und nehmen mit positiv werdender Membranspannung ab. Für cAMP sind die $K_{1/2}$ -Werte zwei Ordnungen größer und liegen im Bereich von 200-600 μ M. Die Hill-Koeffizienten für cGMP sind bei allen drei Kanälen vergleichbar und liegen zwischen 1,7 und 2. Bei rCNC α 2 Δ NT-Kanälen liegt der Hill-Koeffizient für cAMP bei 1,8-2. Für rCNC α 2a- und rCNC α 2b-Kanäle liegt dieser Wert etwas niedriger (ca. 1,5).

3.3.2.2 Ionenselektivität

CNG-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle (1.1). Um diese Eigenschaft für rCNC α 2-Kanäle zu überprüfen, wurde die Ionenselektivität durch Messung der Umkehrpotentiale V_{rev} exemplarisch für die rCNC α 2 Δ NT-Mutante bestimmt. Hierzu wurden symmetrische biionische Bedingungen gewählt. In der Pipette befanden sich 100 mM K^+ -Ionen, auf der zytoplasmatischen Seite des Patches 100 mM des entsprechenden Test-Kations (2.21). Abbildung 3.3.2.2 zeigt Strom-Spannungskennlinien für verschiedene monovalente Kationen.

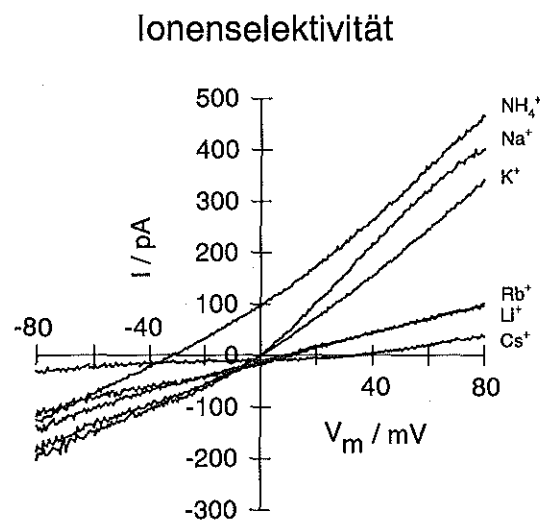


Abbildung 3.3.2.2: Ionenselektivität des rCNC α 2 Δ NT-Kanals. Die Strom-Spannungskennlinien wurden unter symmetrischen biionischen Bedingungen ermittelt. Die Pipettenlösung enthielt 100 mM KCl, die Perfusionslösungen 100 mM des entsprechenden Kations. Die cGMP-Konzentration betrug 100 μ M.

Es wurden folgende Durchschnittswerte der Umkehrpotentiale V_{rev} erhalten (Anzahl der Versuche in Klammern): NH_4^+ : $-32,0 \pm 0,9$ mV (7), Na^+ : $-0,3 \pm 0,9$ mV (7), Li^+ : $+9,4 \pm 1,6$ mV (7), Rb^+ : $+11,5 \pm 1,6$ mV (7) und Cs^+ : $+30,6 \pm 2,5$ mV (5). Obwohl es einige quantitative Unterschiede zu anderen CNG-Kanälen gibt, entspricht das ionenselektive Verhalten des rCNC α 2 Δ NT-Kanals dem bekannter, heterolog exprimierter CNG-Kanäle (bCNC α 1: Kaupp, 1989; cCNC α 2 und cCNC α 1: Bönigk et al., 1993).

3.3.2.3 Modulation durch Calmodulin

Die Modulation der Ligandenaffinität durch Calmodulin wurde ebenfalls am „inside-out“-Patch (s.o.) überprüft. Die Membranspannung wurde abwechselnd für jeweils 1 sek auf +40 mV bzw. -40 mV geklemmt und der resultierende Strom kontinuierlich aufgezeichnet.

Jedes Membranstück wurde zuerst 1 min mit Ca^{2+} -freier (10 mM EGTA) Lösung umspült, um eventuell gebundenes Calmodulin aus HEK 293-Zellen auszuwaschen. Danach wurde das Membranstück verschiedenen cGMP-Konzentrationen mit bzw. ohne Calmodulin ausgesetzt. Diese Lösungen enthielten 50 μM freies Ca^{2+} (2.21). Abb. 3.3.2.3 zeigt einen Ausschnitt eines solchen Experiments für die Spleißvariante rCNC α 2b.

Der durch 100 μM cGMP erhaltene Maximalstrom ist während der gesamten Applikationszeit für jede Spannung konstant, der auswärts gerichtete Strom (positive Stromwerte) ist aufgrund der Rektifizierung (s.o.) größer als der einwärts gerichtete. Nach Wechsel in cGMP-freie

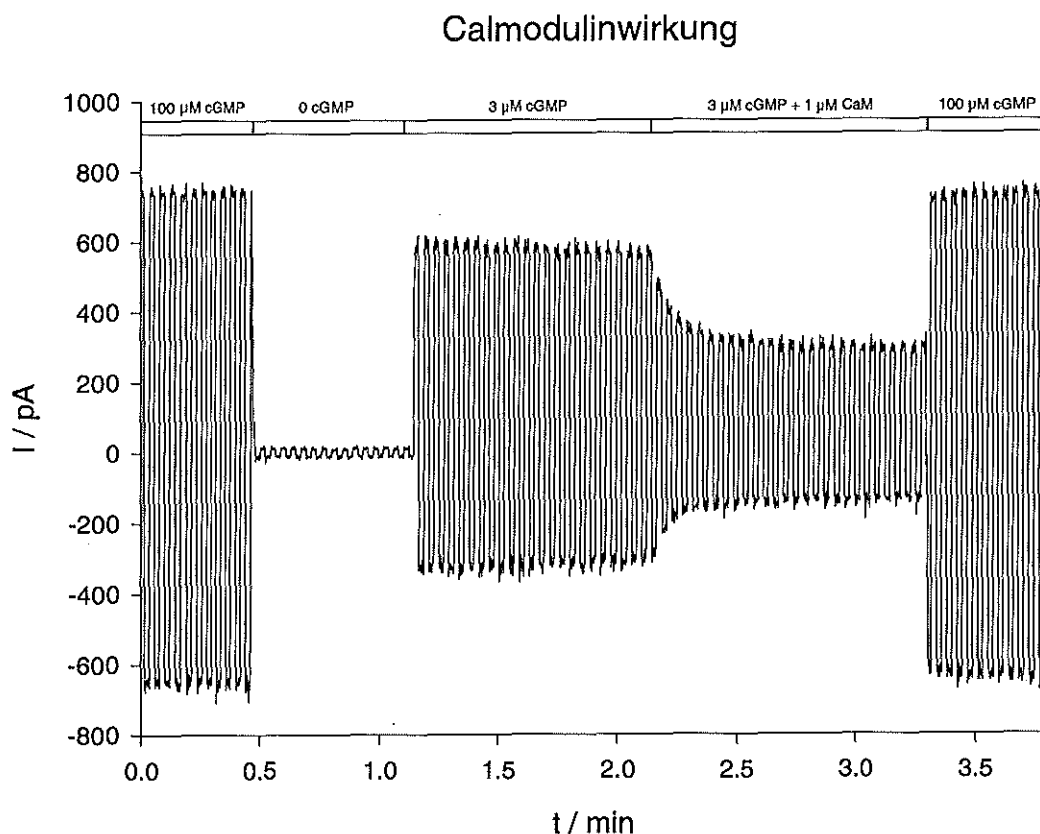


Abbildung 3.3.2.3: Wirkung von 1 μM Calmodulin auf rCNC α 2b-Kanäle (Erläuterung im Text). Am Patch wurde abwechselnd eine Membranspannung von +40 mV bzw. -40 mV für je 1 sek Dauer angelegt. Über der Stromkurve sind die verwendeten Konzentrationen von cGMP und Calmodulin angegeben. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Gesamtexperiments. Verwendete Abkürzung: CaM: Calmodulin.

Lösung bleibt ein kleiner Leckstrom übrig. Die Applikation von 3 μM cGMP aktiviert einen konstanten Strom. In Einwärtsrichtung ist er ungefähr halbmaximal. Wird 1 μM Calmodulin hinzugegeben, sinkt dieser Strom in ca. 30 sek auf etwa die Hälfte ab. Wechselt man zu 100 μM cGMP ohne Calmodulin (unter diesen Bedingungen bleibt das zuvor applizierte Calmodulin an den Kanal gebunden; hier nicht gezeigt), erhält man wieder den Maximalstrom, der genauso groß ist wie zu Beginn.

Die Calmodulinwirkung ist reversibel. Nach Auswaschen des Ca^{2+} -abhängig gebundenen Calmodulins mit EGTA ist der Strom bei 3 μM cGMP wieder so groß, wie zu Beginn (nicht gezeigt).

Diese Untersuchungen wurden an beiden Spleißvarianten (rCNC α 2a und rCNC α 2b) an je sechs Patches durchgeführt. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der durch 3 μM cGMP aktivierte Strom wird durch 1 μM Calmodulin bei rCNC α 2a-Kanälen um $52 \pm 10 \%$ (-40 mV) bzw. $46 \pm 10 \%$ (+40 mV), bei rCNC α 2b-Kanälen um $49 \pm 9 \%$ (-40 mV) bzw. $42 \pm 12 \%$ (+40 mV) reduziert. Bei Einsatz von 50 nM Calmodulin ist der Effekt schwächer, deutlich langsamer und schwerer reproduzierbar. Eine Bestimmung des $K_{1/2}$ -Wertes für Calmodulin steht jedoch noch aus.

3.3.3 Fluoreszenzoptischer Nachweis der Ca^{2+} -Aufnahme in HEK 293-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-rCNC α 2 Δ NT

Die Eigenschaft von CNG-Kanälen, Ca^{2+} zu leiten, ist physiologisch wichtig (Kaupp, 1995; Frings, 1997). Daher wurde die Ca^{2+} -Aufnahme durch heterolog exprimierte rCNC α 2 Δ NT-Kanäle mit der „ Ca^{2+} -Imaging“-Technik untersucht (2.22). Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit D. Reuter (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt.

HEK 293-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA-rCNC α 2 Δ NT (3.1.3) transfiziert und nach zwei Tagen mit „Fura-2/AM“ beladen. Es handelt sich dabei um einen membrangängigen Ester des Indikators Fura-2. In der Zelle werden die Estergruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten und der Ca^{2+} -sensitive Indikator Fura-2 freigesetzt. Dieser Indikator ändert bei Bindung von Ca^{2+} seine Fluoreszenzeigenschaften. Das Fura-2 wurde abwechselnd mit UV-Licht der Wellenlängen $\lambda = 340 \text{ nm}$ und 380 nm angeregt und die Intensität (I_e) des jeweils emittierten Fluoreszenz-Lichts bei $\lambda = 510 \text{ nm}$ bestimmt. Ist Ca^{2+} gebunden, steigt die Emission bei Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda = 340 \text{ nm}$, die Emission bei Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda = 380 \text{ nm}$ sinkt. Der Quotient $I_e(340 \text{ nm})/I_e(380 \text{ nm})$ ist ein Maß für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Das emittierte Licht wurde mit einer

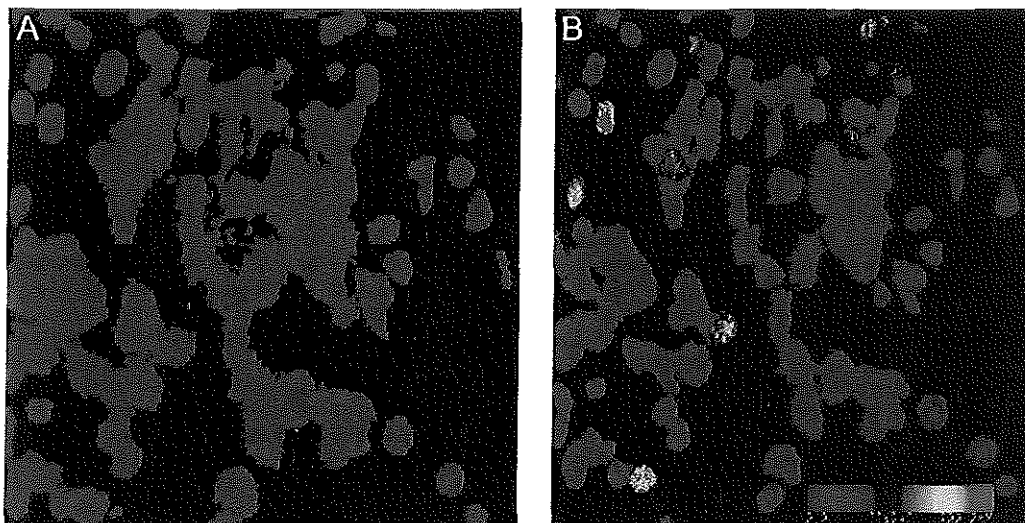


Abb. 3.3.3. Ca^{2+} -Aufnahme in pcDNA-rCNC α 2 Δ NT transfizierte HEK 293-Zellen (Erläuterung im Text). In Abbildungsteil A) sind die Zellen vor der Inkubation, in B) nach der Inkubation mit 3 mM 8-Bromo-cGMP gezeigt. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde einer Falschfarbenskala zugeordnet (rechts unten im rechten Bild): Blau entspricht $\leq 100 \text{ nM}$, Grün entspricht ca. 500 nM , Gelb entspricht ca. 600 nM und Rot entspricht $\geq 800 \text{ nM}$ Ca^{2+} . Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration betrug 3 mM .

CCD-Kamera aufgezeichnet. Aus der Intensität des emittierten Lichts wurde die Ca^{2+} -Konzentration berechnet und einer Falschfarbenskala zugeordnet („ Ca^{2+} -Imaging“). Die Fura-2 beladenen Zellen wurden anschließend in einer Lösung mit einem membrangängigen, nicht-hydrolysierbaren cGMP-Derivat (8-Bromo-cGMP) inkubiert. Durch das 8-Bromo-cGMP wurden die rCNC α 2 Δ NT-Kanäle geöffnet.

Die Ca^{2+} -Aufnahme (in HEK 293-Zellen) ist in Abb. 3.3.3 B) gezeigt. Nach ca. 3 min ist die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in ca. 4-5 % der Zellen von ca. ≤ 100 nM auf 600-800 nM gestiegen. Die geringe Zahl der Zellen mit erhöhter Ca^{2+} -Konzentration scheint der Expressionsrate von ca. 10-15 % zu widersprechen, die durch immunologische Färbung mit dem Antikörper 66 bestimmt wurde (3.3.1). Diese Diskrepanz läßt sich jedoch erklären, wenn man annimmt, daß nur ein Teil der heterolog exprimierten rCNC α 2 Δ NT-Untereinheiten funktionell ist bzw. die Transfektions-effizienz unterschiedlich war. Zudem betrug die Expressionsrate in elektrophysiologischen Messungen ebenfalls 5-10 %. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den hier gemachten Beobachtungen überein.

4 Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Untereinheit zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle aus der Retina, dem Riechepithel und dem Hoden der Ratte kloniert (3.1). Diese neue Untereinheit besitzt die größte Sequenzähnlichkeit zu den $\text{CNC}\alpha 2$ -Untereinheiten aus dem Rind, dem Menschen und dem Huhn (3.1.2). Das Expressionsmuster dieser Untereinheit ähnelt dem der $\text{CNC}\alpha 2$ -Untereinheit aus dem Rind. Beide werden in der Retina und dem Hoden exprimiert. Schließlich färbt ein gereinigter Antikörper gegen diese Untereinheit in der Immunzytochemie spezifisch Zapfenaußensegmente in der Rinder- und Rattenretina (3.2.2). Aus diesen Gründen wurde die hier beschriebene Untereinheit (der Ratte) als $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit identifiziert. Sie ist bis auf den N-Terminus identisch mit einer Untereinheit, die aus dem Epithel der Rattenzunge kloniert und als „ rCNGgust “ bezeichnet worden war (Misaka et al., 1997, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Spleißvarianten der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit gefunden. Die Expression der $\text{CNC}\alpha 2$ -Untereinheit im Riechepithel wurde hier erstmals beschrieben.

4.1 Klonierung der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Untereinheit

Aus dem Riechepithel, dem Auge und dem Hoden wurden mit Hilfe der PCR cDNA-Fragmente amplifiziert (3.1.1) und zu vollständigen Sequenzen, die für die $\text{rCNC}\alpha 2a$ - bzw. die $\text{rCNC}\alpha 2b$ -Spleißvariante kodieren, zusammengefügt (3.1.3).

Die Fragmente aus dem 3'-Bereich des Gens wurden durch „einfache“ PCR mit hoher Zyklenzahl (40 Zyklen) amplifiziert. Um Fragmente aus dem 5'-Bereich zu erhalten, mußten verschachtelte PCR-Reaktionen (zweimal 40 Zyklen) durchgeführt werden. Dies zeigt indirekt, daß die Menge der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Transkripte gering ist.

Durch PCR ließen sich große Teile der $\text{rCNC}\alpha 2$ -Sequenz isolieren. Die Nukleotide 219-2013 entsprechen bis auf ein Nukleotid (Position: 323) der „ rCNGgust “-Sequenz (Misaka et al., 1997). Die Sequenz der isolierten Fragmente wurde jeweils durch die Sequenzierung mehrerer unabhängiger PCR-Klone verifiziert. Die gefundene Abweichung (Nukleotidposition 323) zur „ rCNGgust “-Sequenz wurde so ebenfalls bestätigt. Die Abweichung ergibt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz ein Leucin anstelle eines Prolins. An der

korrespondierenden Position anderer CNC α -Untereinheiten (7.2) findet man ebenfalls ein Leucin. Vermutlich wurde die „rCNGgust“-Sequenz an der entsprechenden Position fehlerhaft sequenziert.

Bei den PCR-Experimenten konnte die Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden. Die verwendeten Primerpaare wurden so gewählt, daß die Amplifikation über Exon-Exon-Grenzen hinweg erfolgte. Es wurden keine Intronsequenzen gefunden.

Die publizierte „rCNGgust“-Sequenz enthält eine Anfangssequenz (7.1.2: Nukleotide: 1-54), die von Misaka und Mitarbeitern (1997) durch 5'-RACE-PCR bestimmt und als „unsicher“ angegeben wurde. Anhand dieser 5'-terminalen Sequenz wurden Primer synthetisiert und PCR-Experimente mit cDNA als Matrize durchgeführt. Dabei konnten keine Fragmente amplifiziert werden. Daraus muß gefolgert werden, daß das 5'-Ende der rCNC α 2-Untereinheit vom 5'-Ende der publizierten „rCNGgust“-Untereinheit abweicht. Der Beginn der, von Misaka und Mitarbeitern (1997) als „sicher“ angegebenen, Sequenz wird durch ein Nukleotid gebildet, das dem Nukleotid 219 in der rCNC α 2-Sequenz entspricht. Dieses Nukleotid repräsentiert das 5'-Ende eines Exons. Daran schließt sich (in der rCNC α 2b-Spleißvariante) 5'-wärts das Exon an, das in der rCNC α 2a-Spleißvariante fehlt. Zwischen den Nukleotiden 218 und 219 muß sich daher im Gen der rCNC α 2-Untereinheit ein Intron befinden. Die Nukleotide 218 und 219 sind zudem Teil einer Konsensussequenz für einen Exon-Exon-Übergang (3.1.1). Möglicherweise ist die publizierte, als „unsicher“ angegebene, 5'-Sequenz Teil einer Intron-Sequenz. Andererseits ist es nicht auszuschließen, daß im Zungenepithel eine weitere Spleißvariante „rCNGgust“ exprimiert wird.

Um das 5'-Ende der rCNC α 2-Untereinheit zu bestimmen, wurde eine „Oligo-dT-geprimte“ λ -ZAPII-Phagenbibliothek, die mit cDNA aus dem Riechepithel hergestellt worden war, mit einer Sonde aus dem 5'-Bereich von rCNC α 2 durchsucht. Es wurden mehr als 10^6 unabhängige Phagenklone untersucht. Dabei ließ sich kein positiver Klon detektieren. Aus der verwendeten cDNA-Bibliothek klonierten Bradley und Mitarbeiter (1994) die rCNC α 4-Untereinheit. Diese Arbeitsgruppe konnte acht vollständige rCNC α 4-Klone aus $1,8 \times 10^6$ Klonen isolieren. Die immunzytochemischen Färbungen zeigen, daß weniger als 1 % aller Riechzellen die rCNC α 2-Untereinheit exprimieren (3.2.2). In mindestens 99 % aller Riechzellen wird aber die rCNC α 4-Untereinheit exprimiert. Um aus der verwendeten cDNA-Bibliothek mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens einen vollständigen rCNC α 2-Klon zu erhalten, müßten demzufolge mindestens $2,2 \times 10^7$ Klone untersucht werden. Zudem sind in

cDNA-Bibliotheken 5'-Enden häufig unterrepräsentiert, da die reverse Transkription der RNA selten vollständig verläuft.

Die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung am Riechepithel (3.2.2) belegen die unterschiedlich starken Expressionsraten der rCNC α 2- und der rCNC α 3-Untereinheit. Die Expression der rCNC α 2-Untereinheit in nur wenigen Zellen des Riechepithels läßt indirekt auf eine geringe Anzahl von Transkripten in Gesamt-RNA und damit in Gesamt-cDNA aus dem Riechepithel schließen.

Ein 5'-Fragment der rCNC α 2-Untereinheit (5'-RACE-Fragment-Auge) wurde durch 5'-RACE-PCR mit cDNA aus dem Auge erhalten (3.1.1). Anhand dieser Sequenz wurden Primer synthetisiert und PCR-Experimente mit cDNA aus dem Riechepithel, dem Hoden und dem Auge durchgeführt. Dabei wurden die 5'-Enden der rCNC α 2a- und rCNC α 2b-Untereinheit identifiziert. Es ist möglich, daß im Riechepithel und im Hoden noch eine weitere, hier bislang noch nicht beschriebene, rCNC α 2-Untereinheit exprimiert wird. Ein 5'-Fragment dieser Variante, wird bei den PCR-Experimenten mit cDNA amplifiziert. In der Abbildung 3.1.1.3 ist das entsprechende Fragment dieser putativen Variante nicht sichtbar, da die entsprechende Bande von der „5'-Fragment-Riechepithel/Hoden“-Bande überdeckt wird. Im Vergleich zur rCNC α 2b-Spleißvariante besitzt diese Variante eine Deletion von 22 Basenpaaren (Δ 105-126). Der sich daraus ergebende N-Terminus zeigt aber keine Ähnlichkeit zu den N-Termini bekannter CNC α 2-Untereinheiten. Zudem findet man an den Grenzen der Deletion keine Konsensussequenzen für Exon-Exon-Übergänge. Daher wurde diese Variante nicht weiter untersucht.

Bei der 5'-RACE-PCR konnte kein Klon mit einem Startkodon isoliert werden. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der 5'-terminalen Nukleotide mit den N-terminalen Aminosäuresequenzen bekannter CNC α 2-Untereinheiten legt nahe, daß der gefundenen Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit nur das Startkodon fehlt (Abb. 3.1.1.2). Dies muß jedoch noch bestätigt werden. Dafür bieten sich zwei Möglichkeiten an. Zum einen könnte eine intensive Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken (Riechepithel (s.o.) bzw. Auge) Klone mit dem Startkodon liefern. Zum anderen könnten mit Hilfe von degenerierten Primern, die im 5'-nichtkodierenden Bereich bekannter CNC α 2-Untereinheiten hybridisieren, Sequenzen mit dem Startkodon amplifiziert werden.

Bei der 5'-RACE-PCR wurden keine distinkten Banden erhalten. Die PCR-Produkte verteilten sich kontinuierlich über einen Bereich von 400-2.000 bp. Viele dieser Sequenzen bestehen aus Konkatameren des Oligo-dT-Primers. Dieser Primer hybridisiert aufgrund der

Thymidylfolge oft unspezifisch. Auch Misaka und Mitarbeiter hatten bei entsprechenden Versuchen (mit cDNA aus dem Zungenepithel) keine distinkten Banden erhalten. Möglicherweise enthält daher die Sequenz der rCNC α 2-Untereinheit im 5'-nichtkodierenden Bereich Sequenzen, die die reverse Transkription frühzeitig abbrechen lassen. Die reverse Transkription könnte erschwert sein, weil dieser Bereich möglicherweise starke Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen besitzt.

Um die Transkription der rCNC α 2-Spleißvarianten in den unterschiedlichen Geweben unabhängig von PCR-Experimenten nachzuweisen, wurden Northernblot-Experimente (2.7.2) durchgeführt (nicht gezeigt). Dabei wurden keine Signale detektiert. Vermutlich sind rCNC α 2-Transkripte in zu geringer Häufigkeit in polyadenylierter RNA enthalten oder werden *in situ* überdurchschnittlich schnell abgebaut. Die Transkription der bCNC α 2-Untereinheit konnte durch Northernblot-Analyse mit DNA-Sonden bei hoher Stringenz in der Retina und dem Hoden nachgewiesen werden (Weyand et al., 1994). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Northernblot-Analysen wurden RNA-Sonden ebenfalls unter hohen Stringenzbedingungen eingesetzt (nicht gezeigt). Die Transkription sollte sich (unabhängig von PCR-Experimenten) durch Variation der Stringenzbedingungen bzw. Methoden mit höherer Sensitivität wie z. B. „RNase-protection assay“ oder durch *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen Sonden nachweisen lassen.

4.2 Eigenschaften der heterolog exprimierten rCNC α 2-Untereinheiten

Sowohl die Spleißvarianten rCNC α 2a und rCNC α 2b, sowie die trunkierte Form rCNC α 2 Δ NT wurden heterolog in HEK 293-Zellen exprimiert (3.3.1). Die Zellen wurden dabei jeweils nur mit einer Variante transfiziert. Die Kanäle lagen somit als Homooligomere vor. Alle Varianten bildeten funktionelle Kanäle, die durch Bindung von zyklischen Nukleotiden kooperativ aktiviert werden (3.3.2). Ihre Eigenschaften werden im folgenden mit denen anderer homooligomerer Kanäle aus CNC α -Untereinheiten verglichen.

Alle homooligomeren Kanäle aus CNC α 2-Untereinheiten weisen eine höhere Affinität für cGMP als für cAMP auf. Für die rCNC α 2-Kanäle liegen die Aktivierungskonstanten für cGMP im Bereich von 1-4 μ M. Die Kanäle sind damit empfindlicher für cGMP als die Kanäle, die aus cCNC α 2- ($K_{1/2}$ ca. 40 μ M; Bönigk et al., 1993) bzw. aus bCNC α 2-Untereinheiten ($K_{1/2}$ ca. 20 μ M; F. Müller, persönliche Mitteilung) gebildet werden. Die

Aktivierungskonstante der rCNC α 2-Kanäle für cAMP ist mit ca. 200-600 μ M um zwei Größenordnungen höher als für cGMP. Ähnliche Unterschiede wurden für bCNC α 2-Kanäle gefunden (Weyand et al., 1994).

Ein interessanter Unterschied ergibt sich aus dem Verhältnis der Ströme, die durch sättigende cAMP- bzw. cGMP-Konzentrationen induzierbar sind ($I_{\text{cAMP}}/I_{\text{cGMP}}$). Bei allen bisher untersuchten homooligomeren Kanälen aus CNC α 1- und auch CNC α 2-Untereinheiten lag dieser Wert bei weniger als 0,2 (bCNC α 2: Weyand et al., 1994; hCNC α 2: F. Müller, persönliche Mitteilung; bCNC α 1: Altenhofen et al., 1991). cAMP wirkt bei diesen Kanälen nur als partieller Agonist. Bei rCNC α 2-Kanälen kann dagegen bei negativen Spannungen ein Wert von 0,7, bei positiven Spannungen sogar von 1 erreicht werden. Bisher wurden solche Werte nur bei Kanälen gefunden, die aus CNC α 3-Untereinheiten aufgebaut sind (Altenhofen et al., 1991). Die molekulare Ursache für diesen Unterschied ist unklar. Da bei CNG-Kanälen der Schaltmechanismus (das „gating“) des Kanals (wahrscheinlich) durch die Interaktion von N- und C-terminalen Domänen beeinflusst wird (Varnum und Zagotta, 1997), könnten die Unterschiede durch die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen in diesen Bereichen verursacht werden. Dies könnte in zukünftigen Arbeiten durch Mutagenese untersucht werden. Die in dieser Arbeit hergestellte, verkürzte Form (rCNC α 2 Δ NT) zeigt bei negativen Spannungen einen leicht verringerten $I_{\text{cAMP}}/I_{\text{cGMP}}$ -Wert von 0,56. Ansonsten entsprechen die elektrophysiologischen Eigenschaften eines solchen homooligomeren Kanals den Eigenschaften der homooligomeren Kanäle der Spleißvarianten.

Sowohl rCNC α 2a-, als auch rCNC α 2b-homooligomere Kanäle konnten reversibel durch Ca²⁺/Calmodulin in ihrer Aktivität moduliert werden (3.3.2.3). Ströme, die durch cGMP-Konzentrationen von 3 μ M aktiviert wurden, wurden in Gegenwart von 1 μ M Ca²⁺/Calmodulin um etwa 50% verringert, Ströme bei sättigenden cGMP-Konzentrationen blieben unverändert. Das führt zu einer Verschiebung der Dosiswirkungsbeziehung zu höheren cGMP-Konzentrationen. Ein ähnliches Verhalten wurde bisher bei cCNC α 2-Kanälen beschrieben (Bönigk et al., 1993). Homooligomere bCNC α 2- (F. Müller, persönliche Mitteilung) und hCNC α 2-Kanäle (Yu et al., 1996) zeigten diesen Effekt nicht. Die beiden rCNC α 2-Spleißvarianten unterscheiden sich zwar in der Aminosäureabfolge der putativen Calmodulinbindestelle im N-Terminus. Dies scheint jedoch keinen Einfluß auf die hier untersuchten Effekte zu haben. Beide Varianten reagieren etwa gleichstark auf 1 μ M Calmodulin. Niedrigere Calmodulinkonzentrationen wurden bisher nicht systematisch ausgetestet, es kann also keine Aussage gemacht werden, ob sich die Spleißvarianten im

IC₅₀-Wert für Calmodulin unterscheiden. Es muß auch überprüft werden, wie die Calmodulinwirkung auf cAMP-aktivierte Ströme ist.

4.3 Lokalisierung der rCNC α 2-Untereinheit im Riechepithel: Gibt es eine Subpopulation von Riechzellen, die cGMP als sekundären Botenstoff verwenden?

In der vorliegenden Arbeit wurde durch immunzytochemische Färbung (3.2.2) gezeigt, daß eine Subpopulation von Riechzellen die rCNC α 2-Untereinheit exprimiert. Unklar ist, ob in dieser Subpopulation beide Spleißvarianten gemeinsam exprimiert werden. Unklar ist auch, ob zusätzlich die bislang bekannten olfaktorischen Untereinheiten exprimiert werden (rCNC α 3, rCNC α 4 und rCNC β 1b). Dies immunzytochemisch nachzuweisen wird aber durch die Tatsache erschwert, daß diese Einzelzellen, von einer Vielzahl von Zellen umgeben sind, die die rCNC α 3-, die rCNC α 4- und die rCNC β 1b-Untereinheit enthalten. Durch elektrophysiologische Untersuchung von Einzelzellen, ließe sich aufklären, ob die Zellen der Subpopulation homooligomere Kanäle aus der rCNC α 2-Untereinheit oder heterooligomere Kanäle mit anderen Untereinheiten enthalten. Hier stellt sich aber dasselbe Problem, daß diese Einzelzellen von einer Vielzahl von Zellen umgeben sind, die die rCNC α 2-Untereinheit nicht exprimieren.

Die Arbeiten von Juilfs und Mitarbeitern (1997) zeigen, daß in der Ratte eine Subpopulation von Riechzellen existiert, die die GC-D (Fülle et al., 1995) und die PDE2 exprimieren (1.2.2). In diesen Zellen ließ sich weder die Adenylylzyklase (Typ III) noch die PDE1C2 bzw. die PDE4A nachweisen (Juilfs et al., 1997). Die GC-D ist eine membranständige Rezeptor-Guanylylzyklase, die den Rezeptor-Guanylylzyklasen für natriuretische Peptidhormone bzw. für hitzestabile Enterotoxine ähnelt (Juilfs et al., 1997). Die PDE2 ist cGMP-abhängig. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Zellen einen eigenständigen Signaltransduktionsweg mit cGMP als sekundärem Botenstoff aufweisen. Die GC-D könnte einen (noch unbekannten) Stoff binden und cGMP synthetisieren. Die PDE2 könnte an der Abschaltung des cGMP-Signals beteiligt sein. Durch cGMP könnte ein CNG-Kanal aktiviert werden. Es ist noch unklar, ob die beschriebene Subpopulation mit der identisch ist, in der die rCNC α 2-Untereinheit exprimiert wird. Die immunzytochemischen Färbungen zeigen eine ähnliche Verteilung der markierten Zellen. Ko-Lokalisationsstudien mit markierten Antikörpern gegen die rCNC α 2-Untereinheit und die GC-D bzw. PDE2 sollten dies klären können.

Wenn alle diese Proteine tatsächlich in derselben Subpopulation von Riechzellen exprimiert werden, dann könnte in diesen Zellen ein CNG-Kanal, der die rCNC α 2-Untereinheit enthält, als Endglied der Signaltransduktion fungieren. Welchen Vorteil würde ein solcher Kanal für die physiologische Antwort der Zelle erbringen? Sollte cGMP die Funktion des sekundären Botenstoffs in diesen Zellen einnehmen, könnte prinzipiell der bekannte olfaktorische CNG-Kanal Endglied dieser Signaltransduktionskette sein, da der olfaktorische CNG-Kanal ähnlich empfindlich für cAMP und cGMP ist. Die Eigenschaften der heterolog exprimierten rCNC α 2-Untereinheiten (4.2) zeigen, daß diese Kanäle stark zwischen cGMP und cAMP unterscheiden können. Zellen, die CNG-Kanäle aus solchen Untereinheiten enthalten, könnten demnach zwischen cGMP- und cAMP-Signalen unterscheiden. Dies wäre notwendig, wenn in diesen Zellen z.B. ein (bislang noch nicht nachgewiesenes) cAMP-produzierendes Enzym (z.B. eine (noch) nicht identifizierte Adenylzyklase) vorhanden ist.

Andererseits zeigen die elektrophysiologischen Messungen, daß homooligomere Kanäle aus rCNC α 2-Untereinheiten eine geringere Calmodulin-Empfindlichkeit aufweisen als Kanäle, die die rCNC α 3-Untereinheit enthalten. Für die rCNC α 2-Kanäle wurden keine Dosis-Wirkungsbeziehungen für cGMP mit Calmodulin bestimmt. Der halbmaximale Strom wird jedoch durch Calmodulin im selben Maße gesenkt wie bei der rCNC α 2-Untereinheit (Bönigk et al., 1996), bei der sich die Dosis-Wirkungsbeziehung für cGMP durch Calmodulin nur wenig verschiebt. Daher kann man erwarten, daß sich die Dosis-Wirkungskurve für cGMP bei den rCNC α 2-Kanälen ebenfalls nur schwach verschiebt. Bei den meisten Riechzellen ist die Modulation des olfaktorischen CNG-Kanals durch Calmodulin der wichtigste Adaptationsmechanismus (Chen & Yau, 1994; Kurahashi & Menini, 1997). Zellen, die die rCNC α 2-Untereinheit exprimieren, desensitieren möglicherweise schwächer. Es ist auch möglich, daß die Desensitisierung in der beschriebenen Subpopulation durch den cGMP-Abbau mit Hilfe der PDE2 vermittelt wird.

Welche Funktion könnten Riechzellen haben, die die GC-D, die rCNC α 2-Untereinheit und die PDE2 koexprimieren? Über die Natur des Liganden, der an die GC-D bindet kann derzeit nur spekuliert werden. Da die GC-D Ähnlichkeit zu den Rezeptoren für Peptidhormone (atriale natriuretische Peptide) bzw. für hitzestabile Enterotoxine zeigt, können zumindest Vermutungen angestellt werden. In Säugetieren wird die Geruchswahrnehmung durch zwei anatomisch und funktionell unterschiedliche Organe vermittelt: Dem olfaktorischen Epithel („main olfactory epithelium“/ MOE) und dem vomeronasalen Organ (VNO; Überblick: Tirindelli et al., 1998). Duftstoffe werden durch die Rezeptoren des MOEs gebunden und lösen die Riechkaskade aus (1.2.2).

Die Wahrnehmung von Pheromonen findet jedoch im vomeronasalen Organ (VNO) statt. Pheromone sind Hormone, die der (sexuellen) Kommunikation innerhalb einer Spezies dienen. Das VNO wird als maßgeblich für die Pheromonwahrnehmung betrachtet, da das Entfernen dieses Organs das Reproduktionsverhalten von Nagetieren schwer beeinträchtigt (Wysocki & Lepri, 1991). Das vomeronasale Organ enthält eine Subpopulation von Zellen, die Pheromonrezeptoren exprimieren (Dulac & Axel, 1995). Diese gehören zu einer anderen Gruppe der Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren als die Duftstoffrezeptoren des MOEs (1.2.2). Die chemische Natur der meisten Pheromone ist nicht bekannt. Pheromone können zur Gruppe der Steroide und Prostaglandine gehören (Sorensen et al., 1988). Fettsäuren und Proteine können ebenfalls Pheromone sein (Henzel et al., 1988; Singer, 1991). Pheromone finden sich im Urin und in Sexualsekreten von Nagetieren (Sipos et al., 1995; Tirindelli et al., 1998). Es ist möglich, daß die GC-D (im MOE) ein Pheromon bindet und eine Signaltransduktionskaskade auslöst, bei der cGMP als sekundärer Botenstoff fungiert. Das Entfernen des VNO führt zu schweren Beeinträchtigungen des Sexualverhaltens. Daher ist es unwahrscheinlich, daß die potentiell im MOE durch die GC-D gebundenen Pheromone maßgeblich das Sexualverhalten beeinflussen. Es ist jedoch bekannt, daß Nagetiere sich am Geruch erkennen (Marr & Gardner, 1965). Möglicherweise wird dies oder eine ähnliche Funktion durch die GC-D vermittelt.

Es muß noch geklärt werden, ob möglicherweise auch die rCNC α 1-Untereinheit im Riechepithel exprimiert wird. Zudem muß überprüft werden, ob die Ergebnisse an der Ratte auf andere Spezies übertragbar sind.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die rCNC α 2-Untereinheit aus der Ratte kloniert. Diese Untereinheit wird im Riechepithel, in der Retina und im Hoden exprimiert.

Die rCNC α 2-Untereinheit existiert in zwei Spleißvarianten (rCNC α 2a und rCNC α 2b). Im Riechepithel und im Hoden wurden beide Spleißvarianten gefunden. Im Auge findet man ausschließlich die rCNC α 2a-Untereinheit. Sie wird dort in Zapfensehzellen exprimiert. Die Spleißvarianten unterscheiden sich in der abgeleiteten Aminosäuresequenz durch einen kurzen Einschub im N-Terminus, der nur in der rCNC α 2b-Spleißvariante vorkommt. Durch diesen Einschub unterscheiden sich die beiden Spleißvarianten in der abgeleiteten Aminosäuresequenz im Bereich einer putativen Calmodulinbindestelle.

Die Spleißvarianten wurden heterolog exprimiert und die homooligomeren Kanäle elektrophysiologisch charakterisiert. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle sind sehr ähnlich. Die rCNC α 2-Kanäle zeigen eine hohe Ligandenempfindlichkeit für cGMP (ca. 1-4 μ M). Die Ligandenempfindlichkeit für cAMP ist um zwei Größenordnungen geringer. Trotz unterschiedlicher Sequenz in der putativen Calmodulinbindestelle zeigen die Spleißvarianten der rCNC α 2-Untereinheit keine Unterschiede bezüglich der Wirkung von Calmodulin auf den cGMP-induzierten Strom. Calmodulin verschiebt die Dosis-Wirkungsbeziehung zu höheren cGMP-Konzentrationen. Dieser Effekt ist jedoch im Vergleich zum Effekt am bislang bekannten olfaktorischen CNG-Kanal schwächer ausgeprägt.

Im Riechepithel wurde die rCNC α 2-Untereinheit in einer sehr kleinen Subpopulation von Riechzellen lokalisiert. Diese Zellen sind möglicherweise mit der Subpopulation von Riechzellen identisch, in der die Guanylylzyklase-D (GC-D) und die cGMP-abhängige Phosphodiesterase-2 (PDE2) exprimiert werden. In diesen Zellen könnten CNG-Kanäle, die die rCNC α 2-Untereinheit enthalten, als Endglieder einer putativen Signaltransduktionskette fungieren, bei der die Bindung eines (unbekannten) (Duft)stoffes an die GC-D die Produktion von cGMP auslöst. Da die homooligomeren Kanäle der rCNC α 2-Spleißvarianten lediglich schwach Calmodulin-sensitiv sind, verläuft die Adaptation in diesen Zellen möglicherweise anders, als in anderen Riechzellen.

6 Literatur

- Altenhofen, W., Ludwig, J., Eismann, E., Kraus, W., Bönigk, W. & Kaupp, U.B. (1991). Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9868-9872.
- Anholt, R.R.H. & Rivers, A.M. (1990). Olfactory transduction: Cross-talk between second-messenger systems. *Biochemistry* **29**, 4049-4054.
- Armstrong, C.M. & Hille, B. (1998). Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* **20**, 371-380.
- Bakalyar, H.A. & Reed, R.R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* **250**, 1403-1406.
- Barnard, E.A. (1996). The transmitter-gated channels: a range of receptor types and structures. *Trends Pharm. Sci.* **17**, 305-309.
- Barnstable, C.J. & Wei, J.-Y. (1995). Isolation and characterization of the alpha-subunit of the rat rod photoreceptor cGMP-gated cation channel. *J. Mol. Neurosci.* **6**, 289-302.
- Belluscio, L., Gold, G.H., Nemes, A. & Axel, R. (1998). Mice deficient in G_{olf} are anosmic. *Neuron* **20**, 69-81.
- Benton, W.D. & Davis, R.W. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J. & Breer, H. (1990). Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J.* **9**, 2453-2458.
- Bönigk, W., Altenhofen, W., Müller, F., Dosé, A., Illing, M., Molday, R.S. & Kaupp, U.B. (1993). Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron* **10**, 865-877.
- Bönigk, W., Müller, F., Middendorff, R., Weyand, I. & Kaupp, U.B. (1996). Two alternatively spliced forms of the cGMP-gated channel α -subunit from cone photoreceptor are expressed in the chick pineal organ. *J. Neurosci.* **16**, 7458-7468.
- Bönigk, W., Bradley, J., Müller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnet, G., Kaupp, U.B. & Frings, S. (1999). The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J. Neurosci.* (in press).
- Borisy, F.F., Ronnet, G.V., Cunningham, A.M., Juilfs, D., Beavo, J. & Snyder, S.H. (1992). Calcium/calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *J. Neurosci.* **12**, 915-923.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bradley, J., Li, J., Davidson, N., Lester, H.A. & Zinn, K. (1994). Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: A subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8890-8894.
- Breer, H., Boekhoff, I. & Tareilus, E. (1990). Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* **345**, 65-68.
- Breer, H., Ramig, K. & Krieger, J. (1994). Signal recognition and transduction in olfactory neurons. *Biochim. Biophys. Acta* **1224**, 277-287.
- Breer, H., Wanner, I. & Strotmann, J. (1996). Molecular genetics of mammalian olfaction. *Behav. Genet.* **26**, 209-219.
- Brown, R.L., Snow, S.D. & Haley, T.L. (1998). Movement of gating machinery during the activation of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Biophys. J.* **75**, 825-833.
- Brunet, L.J., Gold, G.H. & Ngai, J. (1996). General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* **17**, 681-693.
- Buck, L. & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987). XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-378.
- Campbell, D.H., Leuscher, E., & Lerman, L.S. (1951). Immunologic absorbents. I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**, 575-578.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molec. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- Chen, T.-Y. & Yau, K.-W. (1994). Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* **368**, 545-548.
- Chen, T.-Y., Illing, M., Molday, L.L., Hsu, Y.-T., Yau, K.-W. & Molday, R.S. (1994). Subunit 2 (or β) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca^{2+} -calmodulin modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11757-11761.
- Cherry, J.A. & Davis, R.L. (1995). A mouse homolog of *dunce*, a gene important for learning and memory in *Drosophila*, is preferentially expressed in olfactory receptor neurons. *J. Neurobiol.* **28**, 102-113.

- Cook, N.J., Hanke, W. & Kaupp, U.B. (1987). Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 585-589.
- Cook, N.J., Molday, L.L., Reid, D., Kaupp, U.B. & Molday, R.S. (1989). The cGMP-gated channel of bovine rod photoreceptors is localized exclusively in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **264**, 6996-6999.
- Crivici, A. & Ikura, M. (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 85-116.
- Detwiler, P.B. & Gray-Keller, M.P. (1996). The mechanisms of vertebrate light adaptation: speeded recovery versus slowed activation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 440-444.
- Dhallan, R.S., Yau, K.-W., Schrader, K.A. & Reed, R.R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* **347**, 184-187.
- Dulac, C. & Axel, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**, 195-206.
- Dzeja, C., Hagen, V., Kaupp, U.B. & Frings, S. (1999). Ca^{2+} permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* **18**, 131-144.
- Eismann, E., Müller, F., Heinemann, S.H. & Kaupp, U.B. (1994). A single negative charge within the pore region of a cGMP-gated channel controls rectification, Ca^{2+} blockage, and ionic selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1109-1113.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S. & Lyubarsky, A.L. (1985). Introduction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**, 310-313.
- 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.
- Firestein, S. & Werblin, F.S. (1987). Gated currents in isolated olfactory receptor neurons of the larval tiger salamander. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6292-6296.
- Firestein, S., Darrow, B. & Shepherd, G.M. (1991). Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron* **6**, 825-835.
- Freitag, J., Ludwig, G., Andreini, I., Rössler, P. & Breer, H. (1998). Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *J. Comp. Physiol.* **183**, 635-650.
- Frings, S. (1997). Cyclic nucleotide-gated channels and calcium. An intimate relation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **31**, 75-82.

- Frings, S., Lynch, J.W. & Lindemann, B. (1992). Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. *J. Gen. Physiol.* **100**, 45-67.
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M. & Kaupp, U.B. (1995). Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **15**, 169-179.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. & Martin G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.
- Fülle, H.-J., Vassar, R., Foster, D.C., Yang, R.-B., Axel, R. & Garbers, D.L. (1995). A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3571-3575.
- Ghazi, A., Berrier, C., Ajouz, B. & Besnard, M. (1998). Mechanosensitive ion channels and their mode of activation. *Biochimie* **80**, 357-362.
- Gordon, S.E. & Zagotta, W.N. (1995). A histidine residue associated with the gate of the cyclic nucleotide-activated channels in rod photoreceptors. *Neuron* **14**, 177-183.
- Goulding, E.H., Ngai, J., Kramer, R.H., Colicos, S., Axel, R., Siegelbaum, S.A. & Chess, A. (1992). Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons. *Neuron* **8**, 45-58.
- Goulding, E.H., Tibbs, G.R., Liu, D. & Siegelbaum, S.A. (1993). Role of H5 domain in determining pore diameter and ion permeation through cyclic nucleotide-gated channels. *Nature* **364**, 61-64.
- Goulding, E.H., Tibbs, G.R. & Siegelbaum, S.A. (1994). Molecular mechanism of cyclic-nucleotide-gated channel activation. *Nature* **372**, 369-374.
- Gray-Keller, M.P. & Detwiler, P.B. (1994). The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods. *Neuron* **13**, 849-861.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
- Guy, H.R., Durell, S.R., Warmke, J., Drysdale, R. & Ganetzky, B. (1991). Similarities in amino acid sequences of *Drosophila* eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **254**, 730.
- Hallani, M., Lynch, J.W. & Barry, P.H. (1998). Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons. *J. Membr. Biol.* **161**, 163-171.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**, 85-100.

- Haynes, L.W. (1995a). Permeation of internal and external monovalent cations through the catfish cone photoreceptor cGMP-gated channel. *J. Gen. Physiol.* **106**, 485-505.
- Haynes, L.W. (1995b). Permeation and block by internal and external divalent cations of the catfish cone photoreceptor cGMP-gated channel. *J. Gen. Physiol.* **106**, 507-523.
- Haynes, L.W. & Yau, K.-W. (1985). Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. *Nature* **317**, 66-70.
- Heery, D.M., Gannon, F. & Powell, R. (1990). A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.* **6**, 173.
- Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**, 1152-1155.
- Henn, D.K., Baumann, A. & Kaupp, U.B. (1995). Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7425-7429.
- Henzel, W.J., Rodriguez, H., Singer, A.G., Stults, J.T., Macrides, F., Agosta, W.C. & Niall, H. (1988). The primary structure of aphrodisin. *J. Biol. Chem.* **263**, 16682-16687.
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. (1990). A superfamily of ion channels. *Nature* **345**, 672.
- Jones, D.T. & Reed, R.R. (1989). G_{olf}: An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* **244**, 790-795.
- Juifls, D.M., Fülle, H.-J., Zhao, A.Z., Houslay, M.D., Garbers, D.L. & Beavo, J.A. (1997). A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3388-3395.
- Kaupp, U.B. (1995). Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr. Opinion Neurobiol.* **5**, 434-442.
- Kaupp, U.B. & Altenhofen, W. (1992). Cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptor cells and olfactory epithelium. In *Sensory Transduction* (Rockefeller Univ. Press), pp.133-150.
- Kaupp, U.B. & Koch, K.-W. (1992). Role of cGMP and Ca²⁺ in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 153-175.
- Kaupp, U.B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bönigk, W., Stühmer, W., Cook, N.J., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., Miyata, T. & Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**, 762-766.
- Kellerman, O.K. & Ferenci, T. (1982). Maltose binding protein from *E.coli*. *Methods in Enzymology* **90**, 459-463.

- Kleene, S.J. (1993). Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron* **11**, 123-132.
- Kleene, S.J. (1997). High gain, low-noise amplification in olfactory transduction. *Biophys. J.* **73**, 1110-1117.
- Kleene, S.J. & Gesteland, R.C. (1991). Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. Neurosci.* **11**, 3624-3629.
- Kleene, S.J., Gesteland, R.C. & Bryant, S.H. (1994). An electrophysiological survey of frog olfactory cilia. *J. Exp. Biol.* **195**, 307-328.
- Koch, K.-W. (1995). Control of photoreceptor proteins by Ca^{2+} . *Cell Calcium* **18**, 314-321.
- Körschen, H.G., Illing, M., Seifert, R., Sesti, F., Williams, A., Gotzes, S., Colville, C., Müller, F., Dosé, A., Godde, M., Molday, L., Kaupp, U.B. & Molday, R.S. (1995). A 240 kDa protein represents the complete β subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. *Neuron* **15**, 627-636.
- Koutalos, Y. & Yau, K.-W. (1996). Regulation of sensitivity in vertebrate rod photoreceptors by calcium. *Trends Neurosci.* **19**, 73-81.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl. Acids Res.* **12**, 857-872.
- Kumar, V.D. & Weber, I.T. (1992). Molecular model of the cyclic GMP-binding domain of the cyclic GMP-gated ion channel. *Biochemistry* **31**, 4643-4649.
- Kurahashi, T. & Yau, K.-W. (1993). Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* **363**, 71-74.
- Kurahashi, T. & Menini, A. (1997). Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. *Nature* **385**, 725-729.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leinders-Zufall, T., Rand, M.N., Shepherd, G.M., Greer, C.A. & Zufall, F. (1997). Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J. Neurosci.* **17**, 4136-4148.
- Liman, E.R. & Buck, L.B. (1994). A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* **13**, 611-621.
- Liu, M., Chen, T.-Y., Ahamed, B., Li, J. & Yau, K.-W. (1994). Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Science* **266**, 1348-1354.
- Lowe, G. & Gold, G.H. (1993a). Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander. *J. Physiol.* **462**, 175-196.

- Lowe, G. & Gold, G.H. (1993b). Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* **366**, 283-286.
- Lowe, G., Nakamura, T. & Gold, G.H. (1989). Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5641-5645.
- Ludwig, J., Margalit, T., Eismann, E., Lancet, D. & Kaupp, U.B. (1990). Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* **270**, 24-29.
- Lynch, J.W. & Lindemann, B. (1994). Cyclic nucleotide-gated channels of rat olfactory receptor cells: divalent cations control the sensitivity to cAMP. *J. Gen. Physiol.* **103**, 87-106.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Marr, J.N. & Gardner, L.E. Jr. (1965). Early olfactory experience and later social behaviour in the rat: preference, sexual responsiveness, and care of young. *J. Genet. Psychol.* **107**, 167-174.
- Meinkoth, J. & Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analyt. Biochem.* **138**, 267-284.
- Meyer, T.S. & Lamberts, B.L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of *parotid saliva* proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144-145.
- Misaka, T., Kusakabe, Y., Emori, Y., Gonoi, T., Arai, S. & Abe, K. (1997). Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust. *J. Biol. Chem.* **272**, 22623-22629.
- Misaka, T., Kusakabe, Y., Emori, Y., Arai, S. & Abe, K. (1998). Molecular cloning and taste bud-specific expression of a novel cyclic nucleotide-gated channel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **855**, 150-159.
- Molday, R.S., Molday, L.L., Dosé, A., Clark-Lewis, I., Illing, M., Cook, N.J., Eismann, E. & Kaupp, U.B. (1991). The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell. Characterization and orientation of the amino terminus. *J. Biol. Chem.* **266**, 21917-21922.
- Mount, S.M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucl. Acids Res.* **10**, 459-472.
- Müller, F. & Kaupp, U.B. (1998). Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* **85**, 49-61.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, H. (1986). Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Nakamura, T. & Gold, G.H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**, 442-444.

- Nakamura, T., Lee, H.-H., Kobayashi, H. & Satoh, T.-O. (1996). Gated conductances in native and reconstituted membranes from frog olfactory cilia. *Biophys. J.* **70**, 813-817.
- Noé, J. & Breer, H. (1998). Functional and molecular characterization of individual olfactory neurons. *J. Neurochem.* **71**, 2286-2293.
- Ohara, O., Dorit, R.L. & Gilbert, W. (1989). One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5673-5677.
- O'Neil, K.T. & DeGrado, W.F. (1990). How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 59-64.
- Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y. & Lancet, D. (1985). Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* **316**, 255-258.
- Palczewski, K. & Saari, J.C. (1997). Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 500-504.
- Paoletti, P., Young, E.C. & Siegelbaum, S.A. (1999). C-linker of cyclic nucleotide-gated channels controls coupling of ligand binding to channel gating. *J. Gen. Physiol.* **113**, 17-33.
- Pfeuffer, E., Mollner, S., Lancet, D. & Pfeuffer, T. (1989). Olfactory adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **264**, 18803-18807.
- Polans, A., Baehr, W. & Palczewski, K. (1996). Turned on by Ca^{2+} ! The physiology and pathology of Ca^{2+} -binding proteins in the retina. *Trends Neurosci.* **19**, 547-554.
- Ratto, G.M., Payne, R., Owen, W.G. & Tsien, R.Y. (1988). The concentration of cytosolic free calcium in vertebrate rod outer segments measured with Fura-2. *J. Neurosci.* **8**, 3240-3246.
- Reisert, J. & Matthews, H.R. (1998). Na^{+} -dependent Ca^{2+} -extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *J. Gen. Physiol.* **112**, 529-535.
- Rho, S.-H. & Park, C.-S. (1998). Extracellular proton alters the divalent cation binding affinity in a cyclic nucleotide-gated channel pore. *FEBS Lett.* **440**, 199-202.
- Riggs, P. (1994). Expression and purification of maltose-binding protein fusions. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. et al., eds.), Greene Publishing Ass. & Wiley Int., pp. 16.6.1-16.6.14.
- Ronnett, G.V., Cho, H., Hester, L.D., Wood, S.F. & Snyder, S.H. (1993). Odorants differentially enhance phosphoinositide turnover and adenylyl cyclase in olfactory receptor neuronal cultures. *J. Neurosci.* **13**, 1751-1758.
- Root, M.J. & MacKinnon, R. (1993). Identification of an external divalent cation-binding site in the pore of a cGMP-activated channel. *Neuron* **11**, 459-466.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sautter, A., Zong, X., Hofmann, F. & Biel, M. (1998). An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel β subunit expressed in olfactory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4696-4701.
- Schandar, M., Laugwitz, K.-L., Boekhoff, I., Kroner, C., Gudermann, T., Schultz, G. & Breer, H. (1998). Odorants selectively activate distinct G protein subtypes in olfactory cilia. *J. Biol. Chem.* **273**, 16669-16677.
- Schild, D. & Restrepo, D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.* **78**, 429-466.
- Schnetkamp, P.P. & Damen, F.J. (1982). Isolation and characterization of osmotically sealed bovine rod outer segments. *Methods in Enzymology* **81**, 110-116.
- Seifert, R., Eismann, E., Ludwig, J., Baumann, A. & Kaupp, U.B. (1999). Molecular determinants of a Ca^{2+} -binding site in the pore of cyclic nucleotide-gated channels: S5/S6 segments control affinity of intrapore glutamates. *EMBO J.* **18**, 119-130.
- Sesti, F., Straforini, M., Lamb, T.D. & Torre, V. (1994). Gating, selectivity and blockage of single channels activated by cyclic GMP in retinal rods of the tiger salamander. *J. Physiol.* **474**, 203-222.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. & Huse, W.D. (1988). λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- Singer, A.G. (1991). A chemistry of mammalian pheromones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**, 627-632.
- Sipos, M.L., Wysocki, C.J., Nyby, J.G., Wysocki, L. & Nemura, T.A. (1995). An ephemeral pheromone of female house mice: perception via the main and accessory olfactory systems. *Physiol. Behav.* **58**, 529-534.
- Sklar, P.B., Anholt, R.R.H. & Snyder, S.H. (1986). The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells: differential stimulation by distinct classes of odorants. *J. Biol. Chem.* **261**, 15538-15543.
- Sorensen, P.W., Hara, T.J., Stacey, N.E. & Goetz, F.W. (1988). F-prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol. Reprod.* **39**, 1039-1050.
- Stryer, L. (1991). Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* **266**, 10711-10714.
- Terlau, H. & Stühmer, W. (1998). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* **85**, 437-444.
- Tirindelli, R., Mucignat-Caretta, C. & Ryba, J.P. (1998). Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci.* **21**, 482-486.

- Torre, V. & Menini, A. (1994). Selectivity and single-channel properties of the cGMP-activated channel in amphibian retinal rods. In *Handbook of membrane channels: molecular and cellular physiology*. Peracchia, C. (ed.), San Diego, Academic Press, pp 345-358.
- 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. USA* **76**, 4350-4354.
- Van den Bergh, V., Boens, N., De Schryver, F.C., Ameloot, M., Steels, P., Gallay, J., Vincent, M. & Kowalczyk, A. (1995). Photophysics of the fluorescent Ca^{2+} indicator Fura-2. *Biophys. J.* **68**, 1110-1119.
- Varnum, M.D. & Zagotta, W.N. (1997). Interdomain interactions underlying activation of cyclic nucleotide-gated channels. *Science* **278**, 110-113.
- Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. & Taylor, S.S. (1987). Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**, 343-351.
- Weber, I.T., Shabb, J.B. & Corbin, J.D. (1989). Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: A key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites. *Biochemistry* **28**, 6122-6127.
- Wei, J.-Y., Roy, D.S., Leconte, L. & Barnstable, C.J. (1998). Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Progr. Neurobiol.* **56**, 37-64.
- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Müller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. & Kaupp, U.B. (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**, 859-863.
- Wissinger, B., Müller, F., Weyand, I., Schuffenhauer, S., Thanos, S., Kaupp, U.B. & Zrenner, E. (1997). Cloning, chromosomal localization and functional expression of the gene encoding the α -subunit of the cGMP-gated channel in human cone photoreceptors. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 2512-2521.
- Wysocki, C.J. & Lepri, J.J. (1991). Consequences of removing the vomeronasal organ. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**, 661-669.
- Yan, C., Zhao, A.Z., Bentley, J.K., Loughney, K., Ferguson, K. & Beavo, J.A. (1995). Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9677-9681.
- Yau, K.-W. (1994). Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald lecture. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.* **35**, 9-32.
- Yau, K.-W. & Baylor, D.A. (1989). Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 289-327.

- Yu, W.-P., Grunwald, M.E. & Yau, K.-W. (1996). Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a human homolog of the cyclic nucleotide-gated ion channel of retinal cone photoreceptors. *FEBS Lett.* **393**, 211-215.
- Zagotta, W.N. & Siegelbaum, S.A. (1996). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 235-263.
- Zufall, F., Firestein, S. & Shepherd, G.M. (1994). Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 577-607.

7 Anhang

7.1 Hybridisierungsbereiche und Sequenzen der verwendeten Primer

Die Sequenzen und Nummern der verwendeten Primer sind kursiv gedruckt. Die Nummern der Primer wurden in Klammern neben die Primersequenzen gesetzt. Nicht-hybridisierende Nukleotide wurden klein gedruckt. Primer oberhalb der Nukleinsäuresequenzen weisen in 3'-Richtung, Primer unterhalb der Nukleinsäuresequenzen weisen in 5'-Richtung. Start- und Stopkodons wurden fett gedruckt. Restriktionsschnittstellen in den Primern wurden unterstrichen.

7.1.1 Sequenz der rCNC α 2-Untereinheit (rCNC α 2b)

5'-*cttctc*-

-*gagccacc***ATGG**CCAAGGTCAATACCCAATG-3' (2374)

5'-AGGTCAATACCCAATGCTCACAG-3' (2365)

5'-CAAGGTCAATACCCAATGCTC-3' (2364)

- 1 **ATGG**CCAAGGTCAATACCCAATGCTCACAGCCCTCCCGAGACAAC**TTTC**CAGTAAAGGAC
TACCGGTTCCAGTTATGGGTTACGAGTGTCGGGAGGGGCTCTGTGAAAGTCATTTCCCTG
- 61 GCCGCAGACAGAGACCTCGATCAAGTGGAGAAATGGCCTCGGCAGGTCTCACTCACCATGT
CGGCGTCTGTCTCTGGAGCTAGTTACCTCTTACCGGAGCCGTCCAGAGTGAGTGGTACA
- 121 GAGGAGACATCTTCCACAGTGCATCAGGGGATCGTCATGGAGACCGGAGAACTGGCTGGA
CTCCTCTGTAGAAGGTGTCACGTAGTCCCTAGCAGTACCTCTGGCCTCTTGACCGACCT
- 5'-cGGtaGagctcCac**ATg**ATCTCC
5'-TCATCTCC
5'-GCTTCATCATCTCC
- 181 GCCGCACAGAGTTTATTCACAAGCCAGGGGCCAGCCAGGGTGTACGCTTCATCATCTCC
CGGCGTGTCTCAAATAAGTGTTCGGTCCCCGGTCCGTCACAGTCGGAAGTAGTAGAGG
ATTCGTGCGTGGG-3' (2250)
ATTCGTGCGTG-3' (2192)
ATTC-3' (2191)
- 241 ATTCGTGCGTGGGCCCGCCAGGCACCTTACACCATGAAGACCCGACGCCTGACTCCTTTTGTG
TAAGCACGCACCCGGCGGTCCGTGAATGTGGTACTTCTGGGCTGCGGACTGAGGAAAAAC
- 301 GATCGTTTTTCATGGAGCTGAGCTTAAGGAAGTATCCAGCCAGGAAAGGAATGCCAGCCC
CTAGCAAAAGTACCTCGACTCGAATTCCTTCATAGGTCGGTCCCTTTCCTTACGGGTCGGG
- 361 AACCCAGGAGGACAGGAACCAACAGAGGGAGGGAAAGGCAGGAAGAAGGATCCCATTTGTG
TTGGGTCTCTCTGCTTGGTGGTCTCCCTCCCTTTCCGTCTTCTTCTTAGGGTAACAC
- 5'-AACATCTACTACCGCTGGC-3' (2174)
- 421 GTGGACCCCTCCAGCAACATCTACTACCGCTGGCTGACTGCCATCGCCCTCCCGGTCTTC
CACCTGGGGAGGTTCGTTGTAGATGATGGCGACCGACTGACGGTAGCGGGAGGGCCAGAAG
- 481 TATAACTGGTGTCTACTTGTGTGCAGGGCCTGTTTTGATGAGCTACAGTCAGAACACCTG
ATATTGACCACAGATGAACACACGTCCCGGACAAAATACTCGATGTCAGTCTTGTGGAC

5' -TTGTGGACATGCTGGTT
 541 AACTGTGGCTGGTCCTGGACTACTCTGCAGATGCCCTGTATGTTGTGGACATGCTGGTT
 TGTGACACCGACAGGACCTGATGAGACGTCTACGGGACATACAACACCTGTACGACCAA
 3' -CAACACCTGTACGACCAA
 3' -CTGATGAGACGTCTACGGGAC-5' (2206)
 3' -GACCTGATGAGACGTCTACG-5' (9026)
 CG-3' (2165)
 601 CGTGCCCGGACAGGTTTCCTTGAACAAGGCCTAATGGTCAGGGATACCAAGAGGCTGTGG
 GCACGGGCTGTCCAAAGGAACCTTGTTCGGATTAACAGTCCCTATGGTTCTCCGACACC
 GCAC-5' (2195) 3' -CCAGTCCCTATGGTTCTCCGAC-5'
 661 AAACATTACACAAAGACCTTGCACCTCAAGCTGGACATCCTGTCTCTCATCCCCACAGAC
 TTTGTAATGTGTTTCTGGAACGTGAAGTTCGACCTGTAGGACAGAGAGTAGGGGTGTCTG
 (2194) 3' -GGAACGTGAAGTTCGACCTGTA-5' (2193)
 721 CTGGCTTATTTGAAGTTGGGCATGAACTACCCGGAAGTGAAGTTCAATCGCCTCCTGAGG
 GACCGAATAAACTTCAACCCGTACTTGATGGGCCTTGACTCCAAGTAGCGGAGGACTCC
 5' -CCAATGTG
 781 TTCTCTCGGCTCTTTGAGTTCTTTGACCGCACGGAGACAAGGACCAACTACCCCAATGTG
 AAGAGAGCCGAGAACTCAAGAACTGGCGTGCCTCTGTTCCTGGTTGATGGGGTTACAC
 TTCAGGATAGGG-3' (9027)
 841 TTCAGGATAGGGAACTTGGTTCTGTACACCTCATTTATCATCCACTGGAACGCCTGCATC
 AAGTCCTATCCCTTGAACCAAGACATGTGGGAGTAATAGTAGGTGACCTTGCGGACGTAG
 901 TACTTTGCCATTTCCAAGTTCATCGGTTTTTGAACAGATTCTTGGGTCTATCCAAACACC
 ATGAAACGGTAAAGGTTCAAGTAGCCAAAACCTTGTCTAAGGACCCAGATAGGTTTGTGG
 961 TCCAAGCCGGAGTATGGACGCCTCTCCAGGAAGTACATTTACAGCCTCTACTGGTCCACC
 AGGTTCGGCCTCATACCTGCGGAGAGGTCTTCATGTAAATGTTCGGAGATGACCAGGTGG
 1021 TTGACCCTGACCACCATTGGGGAGACCCCGCCCCCGTGAAGGATGAGGAGTATCTCTTT
 AACTGGGACTGGTGGTAACCCCTCTGGGGCGGGGGCACTTCCTACTCCTCATAGAGAAA
 5' -GACTTCCTGGTGGGCGTCC-3' (2168)
 1081 GTGGTCATAGACTTCCTGGTGGGCGTCTGATCTTCGCCACTATAGTAGGCAATGTGGGC
 CACCAGTATCTGAAGGACCACCCGAGGACTAGAAGCGGTGATATCATCCGTTACACCCG
 3' -GAAGCGGTGATATCATCCG-5' (2166)
 1141 TCCATGATTTCCAACATGAACGCTTCCCGGGCGGAGTCCAGGCTAAGATAGATTCCATC
 AGGTACTAAAGGTTGTACTTGCGAAGGGCCCGCCTCAAGGTCCGATTCTATCTAAGGTAG
 3' -G
 1201 AAGCAGTACATGCAGTTCCGGAAGGTAACCAAGGACTTGGAGACTCGGGTTATCCGGTGG
 TTCGTATGTACGTCAAGGCCCTCCATTGGTTTCTGAACCTCTGAGCCCAATAGGCCACC
 TTCGTATGTACGTCAA-5' (2179)
 1261 TTTGACTATCTGTGGGCTAACAGGAAGACGGTGGATGAAAAGGAAGTGCTCAAAAACCTC
 AAAC TGATAGACACCCGATTGTCCTTCTGCCACCTACTTTTCTTCACGAGTTTGTGGAG
 5' -GAAAGTC
 1321 CCAGACAAGCTGAAGGCCGAGATCGCCATCAACGTGCACCTGGACACACTGAAGAAAGTC
 GGTCTGTTGACTTCCGGCTCTAGCGGTAGTTGCACGTGGACCTGTGTGACTTCTTTCAG
 CGAATCTTCCAGG-3' (9028)
 1381 CGAATCTTCCAGGACTGCGAGGCAAGGGCTTCTGGTGGAGCTGGTGCTGAAGCTTCGTCTT
 GCTTAGAAGGTCCTGACGCTCCGTCCCGAAGACCACCTCGACCACGACTTCGAAGCAGGA
 3' -GA

1441 GCTGTGTTTCAGCCCTGGGGACTACATTTTGCAAAAAGGGGGACATTGGAAGGGAGATGTAC
CGACACAAGTCGGGACCCCTGATGTAAACGTTTTTCCCCCTGTAACCTTCCCTCTACATG
CGACACAAGTCGGGAC-5' (2252)

1501 ATCATCAAGGAGGGCAAGCTGGCTGTCGTGGCTGACGATGGGGTCACCCAGTTTGTGGTC
TAGTAGTTCCCTCCCGTTCGACCGACAGCACCAGCTGCTACCCAGTGGGTCAAACACCAG

1561 CTCAGTGATGGCAGTTACTTTGGGGAGATCAGCATCTTAAACATTAAGGGGAGCAAGTCG
GAGTCACTACCGTCAATGAAACCCCTCTAGTCGTAGAATTTGTAATCCCCCTCGTTCAGC

1621 GGGAAACCGCAGGACAGCCAACATCAGGAGCATCGGCTACTCGGACCTGFTCTGCCCTCTCC
CCCTTGGCGTCCTGTCGGTTGTAGTCCTCGTAGCCGATGAGCCTGGACAAGACGGAGAGG

1681 AAGGATGACTTGATGGAGACCCTCACGGAGTACCCGGATGCTAAGAGGGCTCTGGAGGAA
TTCCCTACTGAACTACCTCTGGGAGTGCCTCATGGGCCCTACGATTTCTCCCGAGACCTCCTT
AAGGGTCGGCAGATTCTGATG-3' (2186)

1741 AAGGGTCGGCAGATTCTGATGAAGGACAACCTAATCGATGACGACCTGGTGACGGCCAGG
TTCCCAGCCGTCTAAGACTACTTCCGTGTTGGATTAGCTACTGCTGGACCACTGCCGGTCC

1801 GCAGATGCCAGGAACATCGAGGAGAAGGTGGAGTACC'TGGAGTCATCCTTGGACGGCCTG
CGTCTACGGTCCCTGTAGCTCCTCTTCCACCTCATGGACCTCAGTAGGAACCTGCCGGAC

1861 CAGACGAGGTTCGCCCCGACTCCTGGCTGAGTACAGTGCCCTCCAGATGAAGCTGAAACAG
GTCTGCTCCAAGCGGGCTGAGGACCGACTCATGTCACGGAGGGTCTACTTCGACTTTGTC

1921 CGGC'TCAGCCAGCTGGAGAGCCAGATGACCAGGAGGGGTCATGGCTTCTCACCTGACAGG
GCCGAGTCGGTCGACCTCTCGGTCTACTGGTCC'TCCCAGTACCGAAGAGTGGACTGTCC

1981 GAGAATTCCGAGGATGCTTCAAAAAGCTGACT**GA**AAAATGCAGGTGGCTCTGCC'TCCTGCTT
CTCTTAAGGC'TCC'TACGAAGTTTTTCGACTGACTT'TTACGTCCACCGAGACGGAGGACGAA
3'-CCTACGAAGTTTTTCGACTGACT**aTT**cgaACCACC-5' (2187)
3'-CCTACGAAGTTTTTCGACTGACT**taagAtc**TCCACC-5' (2251)

2041 CCCAGGGCCAGCTGCCAGTGAGACACTTTTACAGCCTCGTGGTGAAGAGT
GGGTCCCGGTCGACGGTCACTCTGTGAAATGTCGGAGCACCCTTCTCA
3'-GTCGGAGCACCCTTCTCA-5' (2169)

7.1.2 Anfangsbereich der „rCNGgust“-Sequenz (Misaka et al., 1997)

Der Sequenzbereich, der vermutlich durch Misaka und Mitarbeiter (1997) falsch bestimmt wurde, ist unterstrichen.

```

5'-ATTTCAGGATGCATCAGATGG-3' (2190)
5'-TCTTTATTCAGGATGCATC-3' (2189)
1  ATCTTTATTCAGGATGCATCAGATGGAAACATCGACCATGGTCCAAGACAACAGGGTGTCT
   TAGAAATAAGTCCTACGTAGTCTACCTTTGTAGCTGGTACCAGGTTCTGTTGTCCCACAG

ctcCacCATgATCTCCATTCGTGCGTGGG-3' (2250)
5'-TCATCTCCATTCGTGCGTG-3' (2192)
   -GCTTCATCATCTCCATTC-3' (2191)
61  ACGCTTCATCATCTCCATTCGTGCGTGGGCCGCCAGGCACCTTACACCATGAAGACCCGAC
   TGCGAAGTAGTAGAGGTAAGCACGCACCCGGCGGTCCGTGAATGTGGTACTTCTGGGCTG
5'-cGGtaGag
```

7.1.3 Sequenzierprimer

Die Sequenzierprimer, die innerhalb der rCNCα2-Sequenz hybridisieren, wurden unter 7.1.1 aufgeführt (# 9026, # 9027 und # 9028). Hier werden die Sequenzierprimer angegeben, die im Bereich der Klonierungsstellen der verwendeten Plasmide hybridisieren. Die jeweiligen Plasmide und die relative Lage der Hybridisierbereiche zur Klonierungsstelle (5' oder 3') wurden in Klammern angegeben.

```
# 9001: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (pBluescriptSK-: 5')
# 9002: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (pBluescriptSK-: 3', pcDNAIAmp: 5')
# 9003: 5'-TAAGTTGGGTAACGCCAGGG-3' (pMALc2: 3')
# 9006: 5'-AGCATTTAGGTGACACTATAG-3' (pcDNAIAmp: 3')
# 9007: 5'-CGTCAGACTGTCGATGAAGCC-3' (pMALc2: 5')
```

7.1.4 Primer für die 5'-RACE-PCR

Die Primer # 2193, # 2194 und # 2195 wurden unter 7.1.1 (s. auch 2.10.2.3) aufgeführt. Die von Boehringer bezogenen Primer werden hier aufgeführt (V= A, C oder G):

Oligo-dT-Anchor-Primer: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-(T)₁₆-V-3'

Anchor-Primer: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'

7.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen von CNC α -Untereinheiten

Alle aufgeführten CNC α -Untereinheiten wurden im Text erwähnt. Die Sequenz der hCNC α 2-Untereinheit wurde Yu und Mitarbeitern (1996) entnommen. Hier verwendete Präfixes für die Untereinheiten: B: Rind, C: Huhn, H: Mensch, PC: Pinealorgan des Huhns, R: Ratte. Die Lage der putativen transmembranalen Segmente S1-S6, der Porenregion und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle) ist jeweils durch Balken über der Nukleotidsequenz angegeben. Zusätzlich wurde der Beginn der Sequenz der verkürzten Mutante rCNC α 2 Δ NT durch einen Pfeil markiert.

RCNC α 2b	MAKVNTQCSQSPRQLSVKDA-ADRDLQVENGLGRSHSPCEETSSSTVHQGIVMETGELAGAAQSLFTSQGP-ARVSRFI	78
RCNC α 2a	MAKVNTQCSQSPRQLSVKDA-ADRDLQVENGLGR-----VSRFI	40
RCNGGUST	MHQMETSTMVQDNR-----VSRFI	19
BCNC α 2	MAKISTQYSHPTTRTHPSVR-T-MDRDLDCIENGLSRTHLPCEETSSSELQEGIAMETRGLAESRQSSFTSQGP-TRLSRLI	77
HCNC α 2	MAKINTQYSHPSRTHLEVK-T-SDRDLNRAENGLSRAHSSSEETSSVLQPGIAMETRGLADSGQGSFTGQGI-ARLSRLI	77
CCNC α 2	MAKINTQHSYPGMHGLSVR-T-TDEDIERIENGFIIRTHSLCEDTSSSELQRVISMGRHLGSGQTSPTFGRGAMARLSRFV	78
PCCNC α 2a	MAKINTQHSYPGMHGLSVR-T-TDEDIERIENGFIIRTHSLCEDTSSSELQRVISMGRHLGSGQTSPTFGRGAMARLSRFV	78
PCCNC α 2b	MAKINTQHSYPGMHGLSVR-T-TDEDIERIENGFIIRTHSLCEDTSSSELQRVISMGRHLGSGQTSPTFGRGAMARLSRFV	78
RCNC α 3	MMTEKSNQVKSPPANNHH-----HPPPSIKANGKDDHRAGSRPQSVAAADDDTSPELQRLAE-MDTPRRGRGGFQRIVRLV	75
BCNC α 1	MKKVIINTWHSFVNI PNVGPDVEKEITRMENGACSSFGDDDDASMFEESETENPHARDSFRSNTHGSGQPSQREQYL	80
RCNC α 4		0
rCNCα2ΔNT		
RCNC α 2b	ISIRAWAARHLHHEDPTPDSFLDRFHGAELKEVSSQERNAQPNPGGQEPPEGKGRKKD-----	137
RCNC α 2a	ISIRAWAARHLHHEDPTPDSFLDRFHGAELKEVSSQERNAQPNPGGQEPPEGKGRKKD-----	99
RCNGGUST	ISIRAWAARHLHHEDPTPDSFLDRFHGAELKEVSSQERNAQPNPGGQEPPEGKGRKKD-----	78
BCNC α 2	ISLRANSARHLHQEDQRPDSFLERFRGAELQEVSSRESHVQFNVGQEPDRGRSAWPLARNNTNTCNNSEKDDKAKKEE	157
HCNC α 2	FLRRWAARHVIHQDQGPDSFPDRFRGAELKEVSSQESNAQANVGSQEPADRGRSAWPLAKCNTNTSNTTEEEKTKKKD	157
CCNC α 2	VSLRSWATRHLLHHEDQRPDSFLERIRGPELVEVSSRQSNIRSLFLIREQPGGVNGPWPLARFNVNFSNNTNEDKKEKKE	158
PCCNC α 2a	VSLRSWATRHLLHHEDQRPDSFLERIRGPELVEVSSRQSNIRSLFLIREQPGGVNGPWPLARFNVNFSNNTNEDKKEKKE	155
PCCNC α 2b	VSLRSWATRHLLHHEDQRPDSFLERIRGPELVEVSSRQSNIRSLFLIREQPGGVNGQKKE-----	137
RCNC α 3	GVRIDWANKNFRBEEPRPDSFLERFRGPELQTVTTHQGGDK---GGKDGEGKGTKKKFE-----	131
BCNC α 1	PGAIAL-----FNVNNSNKEQEPKE-----	101
RCNC α 4	MSQDGKVKTTTESTPPAPTARKW-----	23
----- S1 -----		
RCNC α 2b	-----PIVVDPSNNIYYRWLTALPVPVYNWCLL	166
RCNC α 2a	-----PIVVDPSNNIYYRWLTALPVPVYNWCLL	128
RCNGGUST	-----PIVVDPSNNIYYRWLTALPVPVYNWCLL	107
BCNC α 2	KEKKEEKENPKKEEKKD-----SVVMDPSNNMYHWTALPVPVYNWCLL	205
HCNC α 2	-----AIVVDPSNNLYRWLTALPVPVYNWCLL	186
CCNC α 2	VKEEKEEKEEKEEKKDDKDDKDDKDDKDDKKEEKKKE-----VFVIDPSNNMYNWLTIAPVPVYNWCLL	228
PCCNC α 2a	-----VFVIDPSNNMYNWLTIAPVPVYNWCLL	184
PCCNC α 2b	-----VFVIDPSNNMYNWLTIAPVPVYNWCLL	166
RCNC α 3	-----LFVLDPAQDWYRWLFVIAMPVLYNWCCLL	160
BCNC α 1	KKKKKKKKSKPDDKNENKKDPEKKKKKEKDKKKKKKEKDKKEEKKVVDPSGNTYYNWLFCITLPVMYNWTMI	181
RCNC α 4	-----LPVLDPSGDYVWLNMTMVPIMYNIIV	52
----- S2 -----		
RCNC α 2b	VCRACFDELQSEHLTLWLVLVDYSADALYVVDMLVRARTGFLEQGLMVRDTKRLWKHYTKTLHFKLDILSLIPTDLAYLKL	246
RCNC α 2a	VCRACFDELQSEHLTLWLVLVDYSADALYVVDMLVRARTGFLEQGLMVRDTKRLWKHYTKTLHFKLDILSLIPTDLAYLKL	208
RCNGGUST	VCRACFDELQSEHLTLWLVLVDYSADALYVVDMLVRARTGFLEQGLMVRDTKRLWKHYTKTLHFKLDILSLIPTDLAYLKL	187
BCNC α 2	VCRACFDELQSEHLTLWLVLVDYSADILYGMMLVRARTGFLEQGLMVMDASRLWKHYTQTTLHFKLDVLSLPTDLAYFKL	285
HCNC α 2	ICRACFDELQSEYLMWLVLVDYSADVLVLDVLRARTGFLEQGLMVSDTNRLWQHYKTTTQFKLDVLSLPTDLAYLKV	266
CCNC α 2	ICRACFDELQIDHIKWLFLDYCSDIIVVDFMFRVFRFTGFLEQGLLVKDEKKLRDHYTQTQVQFKLDVLSLPTDLAYLKL	308
PCCNC α 2a	ICRACFDELQIDHIKWLFLDYCSDIIVVDFMFRVFRFTGFLEQGLLVKDEKKLRDHYTQTQVQFKLDVLSLPTDLAYLKL	264
PCCNC α 2b	ICRACFDELQIDHIKWLFLDYCSDIIVVDFMFRVFRFTGFLEQGLLVKDEKKLRDHYTQTQVQFKLDVLSLPTDLAYLKL	246
RCNC α 3	VARACFSDLRNRYFVWLVLVDYFSDTVYIADLIIRLRTGFLEQGLLVKDPKKLRDNYIHTLQFKLDVASIIPDLIYFAV	240
BCNC α 1	TARACFDELQSDYLEYWLAFDYLSVYLLDMFVRFTGTGFLEQGLLVKEERKLIDKYKSTFQFKLDVLSVPTDLLYIKF	261
RCNC α 4	VCRACFPDLQHSYLVAVFVLVDYSDLLYLLDIGVRFHTGFLEQGLLVVDKGMIASTRYVRTWSFLDLASLVPDAAVQVL	132
----- S3 -----		

	S4	S5	
RCNCa2b	GMNYPELRFNRLRFSRLFEFFDRTETRTNYPNVFRIGNLVLYTLIIHWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNTSKPEYG		326
RCNCa2a	GMNYPELRFNRLRFSRLFEFFDRTETRTNYPNVFRIGNLVLYTLIIHWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNTSKPEYG		288
RCNGGUST	GMNYPELRFNRLRFSRLFEFFDRTETRTNYPNVFRIGNLVLYTLIIHWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNTSKPEYG		267
BCNCa2	GMNYPELRFNRLKLARLFEFFDRTETRTNYPNVFRIGNLVLYTLIIHWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNVSNPEYG		365
HCNCa2	GTNYPEVRFNRLKFSRLFEFFDRTETRTNYPNVFRIGNLVLYTLIIHWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNISPEHG		346
CCNCa2	GLNYPELRFNRLRLRIARLFEFFDRTETRTNYPNVFRIGNLVLYTLIIHWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNVSPEYG		388
PCCNCa2a	GLNYPELRFNRLRLRIARLFEFFDRTETRTNYPNVFRIGNLVLYTLIIHWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNVSPEYG		344
PCCNCa2b	GLNYPELRFNRLRLRIARLFEFFDRTETRTNYPNVFRIGNLVLYTLIIHWNACIYFAISKFIGFGTDSWVYPNVSPEYG		326
RCNCa3	GIHSPVRFNRLHFMFEFFDRTETRTNYPNIFRISNLVLYTLIIHWNACIYVVISKFIGFGVDTWVYPNITDPEYG		320
BCNCa1	GWNPPEIRLRLRLRISRMFEFFDRTETRTNYPNIFRISNLVLYTLIIHWNACVYFSISKAIGFGNDTWVYPDVPDPDFG		341
RCNCa4	GPHIPTLRNLRLRPLRPLFEAFDRTETRTAYPNAFRIAKMLYIFVVIHWNCLYFALSRYLGFGRDAMVYPDPAQPGFE		212

	— Porenregion —	S6	
RCNCa2b	RLSRKYIYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDSIKQYMQF		406
RCNCa2a	RLSRKYIYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDSIKQYMQF		368
RCNGGUST	RLSRKYIYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDSIKQYMQF		347
BCNCa2	RLSRKYIYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDSIKQYMQF		445
HCNCa2	RLSRKYIYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDSIKQYMQF		426
CCNCa2	RLSRKYIYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDSIKQYMHF		468
PCCNCa2a	RLSRKYIYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDSIKQYMHF		424
PCCNCa2b	RLSRKYIYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDSIKQYMHF		406
RCNCa3	YLAREYIYCLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDALKHYMQF		400
BCNCa1	RLARKYVYSLYWSLTTLTTIGETPPPVKDEEYLFVDFLVGVLFATIVGNVGSISMNMNASRAEFQAKIDALKHYMHF		421
RCNCa4	RLRRQYLSYFYSTLILTVGDTPLPDREEYLFVMDGFLAVMGFATIMGSMSSVIYMMNTADAAFYDPHALVKYMKL		292

RCNCa2b	RKVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDKEVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLVELVLKLRPAVFSFG	486
RCNCa2a	RKVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDKEVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLVELVLKLRPAVFSFG	448
RCNGGUST	RKVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDKEVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLVELVLKLRPAVFSFG	427
BCNCa2	RKVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDKEVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLVELVLKLRPAVFSFG	525
HCNCa2	RKVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDKEVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLVELVLKLRPTVFSFG	506
CCNCa2	RKVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDKEVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLIELVLKLRPTVFSFG	548
PCCNCa2a	RKVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDKEVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLIELVLKLRPTVFSFG	504
PCCNCa2b	RKVTKDLETRVIRWFDYLWANKKTVDKEVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLIELVLKLRPTVFSFG	486
RCNCa3	RKVSKDMEAKVIRWFDYLWANKKTVDEREVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLVELVLKLRPQVFSFG	480
BCNCa1	RNVSKDMEKRVIRWFDYLWANKKTVDEREVLKKNLPDKLKAETIAINVHLDTLKKVRIQDCEAGLLVELVLKLRPQVFSFG	501
RCNCa4	QHVNRKLETRVIDWYQHLQINKKMTNEVAILQHLPERLRAEVAVSVHLSLTSRVQIFQNCESLLEELVLKLRPQVFSFG	372

	cNMP-Bindestelle	
RCNCa2b	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	566
RCNCa2a	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	528
RCNGGUST	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	507
BCNCa2	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	605
HCNCa2	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	586
CCNCa2	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	628
PCCNCa2a	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	584
PCCNCa2b	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	566
RCNCa3	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQYALLSAGSCFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	560
BCNCa1	DYICKKGDIGREMYIIKEGKLAVVADDGVTQYALLSAGSCFGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	581
RCNCa4	EYVCRKGDIGREMYIIREGQLAVVADDGVTQYAVLAGLYGGEISILNIKSGSKGNRRRTANIRSIGYSDLFCLSKDDLME	452

RCNCa2b	TLTEYPAKRALEEKGRQILMKDNLIDDLVTARADARN-IEEKVEYLESSLDGLQTRFARLLAEYSASQMKLKQRLSQL	645
RCNCa2a	TLTEYPAKRALEEKGRQILMKDNLIDDLVTARADARN-IEEKVEYLESSLDGLQTRFARLLAEYSASQMKLKQRLSQL	607
RCNGGUST	TLTEYPAKRALEEKGRQILMKDNLIDDLVTARADARN-IEEKVEYLESSLDGLQTRFARLLAEYSASQMKLKQRLSQL	586
BCNCa2	ALTEYPEAKKALEEKGRQILMKDNLIDDEELAKAGADPKD-IEEKVEHLETSLSLQTRFARLLAEYNATQMKVKQRLSQL	684
HCNCa2	ALTEYPEAKKALEEKGRQILMKDNLIDDEELAKAGADPKD-IEEKVEHLETSLSLQTRFARLLAEYNATQMKVKQRLSQL	665
CCNCa2	ALTEYPEAKKALEEKGRQILMKDNLIDDEELAKAGADPKD-IEEKIDRLETALDTLQTRFARLLAEYSSSQKVKQRLARV	707
PCCNCa2a	ALTEYPEAKKALEEKGRQILMKDNLIDDEELAKAGADPKD-IEEKIDRLETALDTLQTRFARLLAEYSSSQKVKQRLARV	663
PCCNCa2b	ALTEYPEAKKALEEKGRQILMKDNLIDDEELAKAGADPKD-IEEKIDRLETALDTLQTRFARLLAEYSSSQKVKQRLARV	645
RCNCa3	AVTEYPAKRALEEKGRQILMKDNLIDDEELAKAGADPKD-IEEKIDRLETALDTLQTRFARLLAEYSSSQKVKQRLARV	638
BCNCa1	ALTEYPAKRALEEKGRQILMKDNLIDDEELAKAGADPKD-IEEKIDRLETALDTLQTRFARLLAEYSSSQKVKQRLARV	660
RCNCa4	VLSYEPQAVMEKGRQILMKDNLIDDEELAKAGADPKD-IEEKIDRLETALDTLQTRFARLLAEYSSSQKVKQRLARV	532

RCNC α 2b	ESQMTRRGHGFSPDRENSEDASKAD	670
RCNC α 2a	ESQMTRRGHGFSPDRENSEDASKAD	632
RCNCGUST	ESQMTRRGHGFSPDRENSEDASKAD	611
BCNC α 2	ESQVKMGLPPDGDAFQTEASQP	706
HCNC α 2	ESQVKGGGDKPLADGEVPGDATKTEDKQQ	694
CCNC α 2	ETRVKKYSGSLSVGEPEPEKPEEQKKD	735
PCCNC α 2a	ETRVKKYSGSLSVGEPEPEKPEEQKKD	691
PCCNC α 2b	ETRVKKYSGSLSVGEPEPEKPEEQKKD	673
RCNC α 3	ETKMKQNHEDDYLSDGINTPEPTAAE	664
BCNC α 1	EKFLKPLIDTEFSAIEGSGTESGPTDSTQD	690
RCNC α 4	EWQTREWMPEDMGADDEAEFGEGETSKDGEGKACQAGPSGIE	575

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI) des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt mein Dank:

- Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit, seine stetige Diskussionsbereitschaft und die Korrektur der Arbeit,
- Dr. W. Bönigk und Dr. F. Müller für die fachkundige Unterstützung dieser Arbeit in allen Fragen der Molekularbiologie bzw. der Anatomie, Immunzytochemie und Elektrophysiologie und die Korrektur der Arbeit,
- A. Angele für die Messung der elektrophysiologischen Eigenschaften der rCNC α 2-Kanäle,
- Dr. F. Müller für die Anfertigung und Färbung der immunzytochemischen Schnitte,
- D. Reuter und Dr. S. Frings für die Hilfe und Anleitung beim Ca²⁺-Imaging und bei der Präparation von Riechepithel der Ratte,
- Dr. A. Baumann, Dr. S. Frings, Dr. K. W. Koch, Dr. H. Körschen und Dr. I. Weyand für hilfreiche Unterstützung und Diskussionen über alle Fragen der Molekularbiologie, Biochemie und Elektrophysiologie,
- D. Grammig für die umfangreiche Hilfe beim Erstellen der Abbildungen,
- A. Scholten und Dr. D. Weitz für die Hilfe bei der Endkorrektur,
- M. Bruns und H. Vent für die Unterstützung in der Zellkultur bzw. im Labor,
- A. Eckert und R. Esser für freundliche Hilfen bei allen organisatorischen Problemen.

Prof. Dr. H.W. Klein möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3691
August 1999
ISSN 0944-2952